UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA FAJDIGA ŠTEFANČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

ŠPELA FAJDIGA ŠTEFANČIČ

RAZVOJ POSTOPKA ZA VGRAJEVANJE PROBIOTIKOV V MIKRODELCE ZA ZDRAVLJENJE PARODONTALNE BOLEZNI

DEVELOPMENT OF PROCEDURE FOR ENCAPSULATION OF PROBIOTICS INTO MICROPARTICLES FOR PERIODONTAL TREATMENT

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Raziskovalno delo za magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. Janje Mirtič. Vsebina magistrske naloge je del raziskovalnih projektov ARRS, šifre projektov: J4-7640, J1-6746 in J1-9194.

Posnetke vzorcev z vrstično elektronsko mikroskopijo je naredila asist. dr. Špela Zupančič na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Julijani Kristl za vso strokovnost, potrpežljivost in vse koristne nasvete pri pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala gre somentorici asist. Janji Mirtič za vso prijaznost, potrpežljivost, vse nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu ter nastajanju magistrske naloge.

Največja zahvala gre mojima staršema, ki sta me finančno podprla in moralno stala ob strani skozi vsa leta študija. Hvaležna sem vama za ves trud.

Hvala Gašperju, za vso podporo, spodbudo in ljubezen. In ne nazadnje hvala sinu Ažbetu, ki mi je polepšal zaključek študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom asist. Janje Mirtič.

Ljubljana, 2018 Špela Fajdiga Štefančič

KAZALO VSEBINE

1. UVOD 1

1.1. PARODONTALNA BOLEZEN 1
1.1.1. Dejavniki tveganja 2
1.1.2. Pristopi za zdravljenje parodontalne bolezni 2
1.1.3. Probiotiki za zdravljenje parodontalne bolezni 3
1.2. MIKROKAPSULIRANJE 5
1.2.1. Izdelava mikrodelcev 6
1.2.2. Metode ekstruzije curka tekočine 7
1.2.3. Mikrokapsuliranje probiotikov 9
1.3. LIOFILIZACIJA 13
1.3.1. Proces liofilizacije 13
1.3.2. Pomožne snovi pri liofilizaciji 14
1.3.3. Stabilnost liofiliziranih vzorcev 15

2. NAMEN DELA 16

3. MATERIALI IN METODE 17

3.1. MATERIALI 17
3.1.1. Materiali za izdelavo mikrodelcev 17
3.1.2. Biološki material 17
3.1.3. Material za pripravo fosfatnega pufra s pH=7,4 19
3.2. LABORATORIJSKA OPREMA 20
3.3. METODE 21
3.3.1. Načrt eksperimentalnega dela 21
3.3.2. Celično delo 22
3.3.3. Priprava raztopin za mikrokapsuliranje 23
3.3.4. Določanje viskoznosti 25
3.3.5. Procesni parametri mikrokapsuliranja 25
3.3.6. Polielektrolitno oblaganje mikrodelcev 25
3.3.7. Izdelava različnih formulacij mikrodelcev 26
3.3.8. Liofilzacija 27
3.3.9. Vrednotenje mikrodelcev 28
3.3.10. Statistične metode 32

4. REZULTATI IN RAZPRAVA 33

4.1. OPTIMIZACIJA GOJENJA PROBIOTIKOV NAMENJENIH MIKOKAPSULIRANJU 33
4.2. VPLIV POMOŽNIH SNOVI NA RAST 37
4.2.1. Hitosan in preizkušanje njegove toksičnosti 37
4.3. VPLIV PROCESNIH PARAMETROV NA LASTNOSTI MIKRODELCEV 38
4.3.1. Vpliv velikosti šobe 39
4.3.2. Vpliv viskoznosti raztopin za mikrokapsuliranje 40

4.4. VELIKOST IN MORFOLOGIJA MIKRODELCEV 42
4.4.1. Velikost mikrodelcev 43
4.4.2. Morfologija mikrodelcev 50
4.4.3. Zeta potencial mikrodelcev 54
4.5. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE MIKRODELCEV S PROBIOTIKI 56
4.5.1. Kvantifikacija vgradnje probiotikov v liofilizirane mikrodelce 56
4.5.2. Vpliv mikrokapsuliranja in hitosanske obloge na rast celic 57
4.5.3. Stabilnost vgrajenih probiotikov v mikrodelce 60

5. SKLEP 62

6. LITERATURA 64

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava zdravega obzobnega tkiva s tkivom pri parodontalni bolezni. 1
Slika 2: Zaviranje rasti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* z *Lactobacillus bulgaricus* 4
Slika 3: Razdelitev metod za izdelavo mikrodelcev in mikrokapsul..... 7
Slika 4: Enkapsulator Inotech IE-50..... 8
Slika 5: Kemijska zgradba alginata ter njegova struktura v prisotnosti kalcijevih ionov, imenovana »škatla za jajca« 12
Slika 6: Kemijska zgradba hitosana 13
Slika 7: Agarne plošče med sušenjem v komori LAF 19
Slika 8: Shema eksperimentalnega dela 21
Slika 9: Odvisnost števila KE/mL enot od optične gostote (OD) pri 600 nm 33
Slika 10: Slike 4.1.Z celic pod optičnim mikroskopom (400 × povečava) pri različnih OD (600nm); 1. OD=0,27; 2. OD=0,58; 3. OD=1,14; 4. OD=1,50 in 5. OD=2,14..... 34
Slika 11: Hitrosti rasti, predstavljena kot optična gostota (OD) probiotikov v gojišču, v odvisnosti od časa inkubacije probiotikov v različnih pogojih: začetna količina ter vpliv shranjevanja suspenzije probiotikov v hladilniku 36
Slika 12: Preizkušanje toksičnosti raztopine hitosana v ocetni kislini in ocetne kisline same z nanosi na agarne plošče; a. nanosi v smeri urinega kazalca Milli Q vode, 1 % ocetne kisline ter hitosana v koncentracijah 1, 0,5, 0,25 in 0,125 mg/mL; b. nanosi Milli Q vode, 1 in 0,5 % ocetne kisline v dveh paralelah ter hitosana koncentracije 1 mg/mL 37
Slika 13: Primerjava mikrodelcev izdelanih s 100 (sliki a in c) in 500 µm šobo (sliki b in d) pred (sliki a in b) in po liofilizaciji (sliki c in d)..... 39
Slika 14: Viskoznost raztopin alginata brez ali z dodatki glicerola, laktoze ali trehaloze v odvisnosti od koncentracije 41
Slika 15: Mikrodelci z ″ repkom″ izdelane z nižjimi koncentracijami alginata (0,75 %), 100 µm šoba..... 42
Slika 16: Slike mikrodelcev pod optičnim mikroskopom pri 100 × povečavi; a. 10. formulacija, b. 11. formulacija, c. 19. formulacija, d. 20. formulacija..... 43
Slika 17: Odvisnost razmerja dolžina/širina mikrodelcev od koncentracije alginata..... 46
Slika 18: Oblika liofiliziranih mikrodelcev po dodatku različnih volumnov 0,9 % NaCl (1. formulacija); a. 200 µL 0,9 % NaCl; b. 500 µL 0,9 % NaCl; c. 1000 µL 0,9 % NaCl 47
Slika 19: Velikost mikrodelcev pred liofilizacijo ter po liofilizaciji in rehidrataciji v 0,9 % raztopini NaCl za 10., 11., 19. in 20. formulacijo 48
Slika 20: Odvisnost volumskega deleža mikrodelcev od njihovega hidrodinamskega premera za različne formulacije 49
Slika 21: Odvisnost volumskega deleža mikrodelcev (11. formulacija) od njihovega hidrodinamskega premera v različnih časovnih točkah merjenja le-tega z Mastersizer-jem 50
Slika 22: Različne formulacije (4., 5., 10., 11., 16., 17., 19., 20., 21. in 22.) liofiliziranih mikrodelcev v sestavi alginat, glicerol in laktoza pod stereomikroskopom..... 51

Slika 23: 20. formulacija; a. mikrodelci pred liofilizacijo v vodi; b. mikrodelci po liofilizaciji redispergirani v 0,9 % NaCl 52
Slika 24: Slike z vrstičnega elektronskega mikroskopa različnih formulacij mikrodelcev pri različnih povečavah 53
Slika 25: Primerjava specifičnih površin različnih mikrodelcev 54
Slika 26: Zeta potenciala neobloženih in obloženih mikrodelcev v odvisnosti od koncentracije alginata 55
Slika 27: Shematska predstavitev mikrodelcev, levo: neobložen mikrodelec, desno: mikrodelec obložen s hitosansko oblogo 56
Slika 28: Odvisnost števila KE/g mikrodelcev po liofilizaciji od koncentracije alginata in pomožnih snovi 56
Slika 29: Primerjava SEM slik neobloženih, obloženih mikrodelcev ter liofiliziranih 4.1.Z celic, a. 19. formulacija, b. 20. formulacija, c. in d. liofilizirane celice v 0,9 % NaCl 58
Slika 30: Odvisnost optične gostote (OD) pri 600 nm od časa inkubacije mikrodelcev in liofiliziranih 4.1.Z celic 58
Slika 31: Mikrodelec po 8 urah inkubacije v tekočem gojišču, a. neobložen mikrodelec; b. obložen mikrodelec 59
Slika 32: Odvisnost KE/g mikrodelcev različnih formulacij (alginat + glicerol + laktoza) oz. KE/g liofiliziranih celic od časa in pogojev shranjevanja 60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primer potrebnih nateht raztopin alginata, glicerola, laktoze in trehaloze v odvisnosti od želenega razmerja med njimi 24
Preglednica II: Izdelane formulacije mikrodelcev z uporabljenimi različnimi parametri: koncentracija alginata, razmerje različnih polnil in krioprotektantov, prisotnost hitosanske obloge, uporabljena velikost šobe. 27
Preglednica III: Velikosti in standardni odkloni velikosti različnih formulacij mikrodelcev 39
Preglednica IV: Povprečna velikost mikrodelcev različnih formulaciji izdelanih s 100 µm šobo pred zamrzovanjem in liofilizacijo ter dolžina, širina mikrodelcev in razmerje med njima po liofilizaciji 44
Preglednica V: Hidrodinamski premer mikrodelcev različnih formulacij v prečiščeni vodi, meritve na Mastersizer-ju 49

SEZNAM OKRAJŠAV

KE: kolonijske enote

OD: optična gostota (optical density)

SEM: vrstični elektronski mikroskop

POVZETEK

Več kot polovica odrasle populacije ima danes eno od oblik parodontalne bolezni. Gre za vnetno bolezen obzobnih tkiv, ki lahko nezdravljena privede do izgube zob. Povzročajo jo parodontalno patogene bakterije, za njen nastanek pa je običajno krivo porušeno ravnovesje v ustni mikrobioti, kjer pride do pomanjkanja dobrih probiotičnih bakterij. Ker trenutni načini zdravljenja ne privedejo do ustreznih rezultatov, so aktualni novi pristopi, kamor spada tudi lokalno zdravljenje s probiotiki, s katerimi lahko ustavimo napredovanje bolezni. Namen magistrske naloge je bil razviti dostavni sistem za predhodno izolirane in okarakterizirane probiotične bakterije iz ust zdravih posameznikov, s katerim bi lokalno dostavili probiotike v obzobni žep. Izdelovali smo mikrodelce z metodo vibrirajoče membrane iz alginata in ga premrežili s kalcijevimi ioni. Mikrodelce smo naknadno še obložili s plastjo hitosana, da bi podaljšali njihovo stabilnost in dosegli zadržano sproščanje probiotikov. V iskanju optimalne formulacije smo testirali različne koncentracije alginata (0,75–1,6 %) in različne pomožne snovi (laktozo kot polnilo, glicerol in trehalozo kot krio- in lioprotektanta). Preizkusili smo tudi različno veliki šobi. S 100 μm šobo smo naredili mikrodelce velikosti 120–150 μm, s 500 μm pa 1,2–1,4 mm. Izdelane mikrodelce z vgrajenimi probiotiki smo z namenom povečanja njihove stabilnosti ter enostavnejšega shranjevanja tudi liofilizirali. V nadaljevanju smo okarakterizirali njihovo velikost in morfologijo z elektronskim ter stereomikroskopom. Zeta potencial je bil negativen pri neobloženih in pozitiven pri s hitosanom obloženih mikrodelcih. Učinkovitost vgradnje probiotikov v mikrodelce smo določili z nanašanjem ustreznih redčitev mikrodelcev na agarne plošče. Učinkovitost vgradnje je bila visoka, saj je iz grama liofiliziranih mikrodelcev zraslo 1×10^8 kolonijskih enot (KE). Hitrost sproščanja probiotikov iz mikrodelcev je bila različna za neobložene in obložene mikrodelce. Pri obloženih je bilo sproščanje zakasnjeno za vsaj 3 ure v primerjavi z neobloženimi. Preživetje in stabilnost probiotikov v liofiliziranih mikrodelcih smo testirali po shranjevanju pri sobni temperaturi in v hladilniku. Ugotovili smo, da temperatura med shranjevanjem ne vpliva na njihovo stabilnost. Število živih celic v liofilziranih mikrodelcih se ohrani vsaj 5 mesecev. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da so na alginatu osnovani mikrodelci obetaven dostavni sistem za vnašanje probiotikov v obzobni žep pri parodontalni bolezni, saj z njimi olajšamo njihovo aplikacijo, podaljšamo stabilnost samih probiotikov, ter s hitosansko oblogo dosežemo tudi zadržano sproščanje.

Ključne besede: mikrodelci, probiotiki, parodontalna bolezen, alginat, hitosan

ABSTRACT

Nowadays, more than half of the adult population has one form of periodontal disease. It is a chronic inflammation of periodontal tissues and when untreated, can lead to a tooth loss. Periodontal disease is caused by periodonto-pathogenic bacteria and the major factor contributing to the onset of the disease is imbalance in the oral microbiota, i.e. absence of beneficial - probiotic bacteria. Because the current treatment modalities do not lead to adequate results, there are new approaches of treatment being developed, including local treatment with probiotics that can stop the progression of the disease. The aim of this master thesis was to develop a delivery system for the pre-isolated and characterized probiotic bacteria for their delivery into the periodontal pocket. Microparticles based on crosslinking of the alginate with calcium ions were produced by the vibration technology. To increase their stability during storage and to enable a sustained release of the probiotic bacteria from the microparticles, they were electrostatically coated with chitosan. We tested different alginate concentrations (0.75–1.6 %) and various excipients (lactose as filler, glycerol and trehalose as cryo- and lyoprotectants). Various nozzle sizes were also tested: 100 μm nozzle produces microparticles with diameter of 120–150 μm, and 500 μm nozzle gives 1.2–1.4 mm particles. To stabilize the microparticles with incorporated probiotics and to simplify their storage they were lyophilised. Morphology and size were characterized by stereo and electron microscope. Their zeta potential switched from negative for uncoated microparticles to positive for chitosan coated ones. The probiotic encapsulation efficiency was determined by counting the colony forming units (CFU) grown on the agar plates from the appropriate dilution of microparticles. The encapsulation efficiency was high, up to 1×10^8 of CFU per gram of dry microparticles. The rate of probiotics release from microparticles was different for uncoated and coated microparticles, showing a delay for at least 3 h for the coated microparticles. The viability and stability of incorporated probiotics in the lyophilised microparticles were tested after their storage at the room temperature and in the refrigerator. It turned out that the temperature does not affect the stability of the lyophilized product and that the number of living cells in the lyophilized microparticles is unchanged for at least 5 months of storage. We can summarize that alginate based microparticles are promising delivery system of probiotic for periodontal treatment. Microparticles enable simple application, increased stability of probiotics and their sustained release when using chitosan coating.

Key words: microparticles, periodontal disease, probiotic bacteria, alginate, chitosan

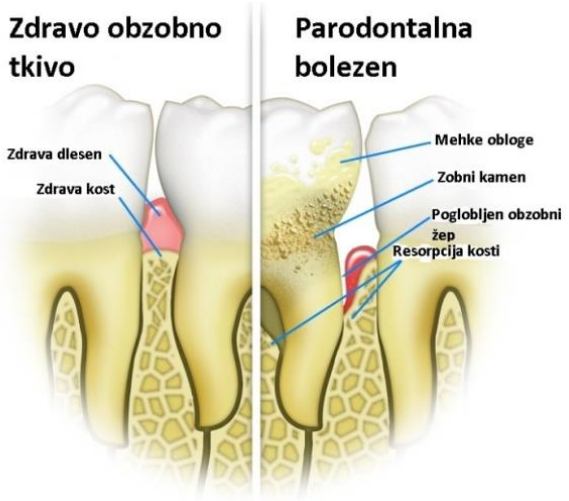
1. UVOD

1.1. PARODONTALNA BOLEZEN

Parodontalna bolezen označuje skupino vnetnih bolezni obzobnih tkiv, ki jih povzročajo patogene bakterije. Ostanki hrane tvorijo na zobeh obloge, ki so hrana za bakterije. Te se pospešeno razmnožujejo, kolonizirajo zobe in obzobno tkivo ter sproščajo lipopolisaharide, ki aktivirajo imunski sistem, kar vodi do vnetja dlesni. Pri ljudeh z dejavniki tveganja za razvoj bolezni, kot so stres, kajenje, neurejena sladkorna bolezen ali genetske predispozicije, se imunski sistem na vnetje odzove prekomerno (1). To vodi do degeneracije parodontalega ligamenta (elastična vez, ki povezuje korenino s čeljustno kostjo) in zobnega cementa, izgube kostne mase alveolarne kosti, epitelno tkivo dlesni odstopi in nastane obzobni žep globok od 4 do 12 mm, v katerem se nabirajo ostanki hrane, zobne obloge in nastaja gnoj (slika 1). Posledica je majavost ali celo izguba zob (2).

Bakterije, ki povzročajo razgradnjo čeljustne kosti ter vnetje dlesni imenujemo parodontalno patogene bakterije. Te bakterije, med katere sodijo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Treponema forsythia, Treponema denticola, Campylobacter rectus, Fusobacterium. nucleatum, Eikenella corrodens, Prevotella intermedia, Peptostreptococcus micros* in *Selenomonas spp.* morajo, da postanejo patogene, biti sposobne izločati virulentne dejavnike in kolonizirati subgingvalna področja. Nekatere od njih lahko proizvajajo tudi dejavnike, ki so pomembni za pritrditev na trdne površine (lektini, adhezini in fimbrije). Pomembna lastnost patogenih bakterij je tudi gibljivost, ki jim omogoča, da napadejo vezivna tkiva in epitelij (3).

Razširjenost parodontalne bolezni se povečuje s starostjo. Okrog 50 % odrasle populacije ima gingivitis (običajno okrog treh ali štirih zob), ki je blažja oblika bolezni, saj gre le za vnetje dlesni, brez izgube kosti okoli zoba. Obzobni žepki niso globlji od 3 mm, kaže pa se kot pordela, zadebeljena, krvaveča ter boleča dlesen.



Slika 1: Primerjava zdravega obzobnega tkiva s tkivom pri parodontalni bolezni (povzeto po 5).

Parodontozo ima 30 % populacije, ki je opredeljena kot prisotnost treh ali štirih zob z obzobnimi žepki globine 4 mm ali več. Med temi je od 5 do 15 % takih, ki imajo napredno obliko bolezni z žepki večjimi od 6 mm (4, 5).

1.1.1. Dejavniki tveganja

Za nastanek parodontalne bolezni je danes poznanih več dejavnikov tveganja. V osnovi jih delimo na dejavnike, na katere imamo vpliv in na tiste na katere ne moremo vplivati. Za preprečevanje nastanka bolezni je v prvi vrsti pomembna ustrezna ustna higiena, saj s pravilnim umivanjem zob s površin odstranimo mehke zobne obloge in preprečimo nastanek zobnega kamna in posledično razrast škodljivih bakterij v obliki biofilma. Večina oblik parodontalne bolezni nastane zaradi različnih mikrobnih infekcij. V obzobnem žepu lahko najdemo več kot 400 različnih vrst mikroorganizmov. Plak (bakterijske zobne obloge) je razdeljen na dva dela, del ki leži nad robom dlesni – supragingivalni in plak, ki leži pod robom dlesni – subgingivalni. V supragingivalnem prevladujejo bakterije vrste *Streptococcus* in *Actinomyces* (4), medtem ko se v subgingivalnem plaku nahajajo vrste *Tannerella forsythia, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens* in *Treponema denticola*. Prav *P. gingivalis* naj bi imel najpomembnejšo vlogo pri razvoju in napredovanju parodontalne bolezni (6).
Večje tveganje za razvoj bolezni imajo kadilci ter sladkorni bolniki z neurejeno sladkorno boleznijo. Razlog za nastanek parodontalne bolezni je lahko tudi stres, saj je le ta povezan s povečanim izločanjem glukokortikoidov, kar zavre imunsko funkcijo, poveča inzulinsko rezistenco in posledično poveča tveganje za nastanek bolezni. Med dejavnike, na katere nimamo vpliva sodijo bolezni srca in ožilja, pri katerih sta povišana C-reaktivni protein in interlevkin-6, ki naj bi sodelovala pri parodontalni bolezni, nekatera zdravila (antihipertenzivi, narkotiki, pomirjevala, antihistaminiki), ker bistveno zmanjšajo tok sline, osteoporoza, hematološke motnje (akutna levkemija, kemoterapija ali presaditev kostnega mozga), bolezni pri katerih je oslabljen imunski sistem (npr. AIDS) ter nosečnost (7).

1.1.2. Pristopi za zdravljenje parodontalne bolezni

Parodontalno bolezen običajno sproži oportunistična okužba. Zdravljenje je zahtevno zaradi nastalega bakterijskega biofilma, ki je odporen na protimikrobne učinkovine in imunski odziv gostitelja. V začetni fazi bolezni je vnetje omejeno na dlesen, kasneje pa se razširi v globlja tkiva, kar vodi v zatekanje in krvavenje dlesni. V pozni fazi kolagen, ki

povezuje korenino s čeljustno kostjo razpada, poteka razgradnja alveolarne kosti in epitelno tkivo dlesni odstopi, tako da nastane obzobni žep. Način zdravljenja je zato odvisen od stopnje napredovanja bolezni (2). Najpogosteje uporabljen pristop je mehansko odstranjevaje zobnih oblog, ki mu sledi terapija z antibiotiki ali antiseptiki. Slabost sistemskega zdravljena z antibiotiki so stranski učinki ter odpornost bakterij (8). Pri parodontalni bolezni ima pomembno vlogo imunski odziv, zato se za zdravljenje uporabljajo tudi imunomodulatorji. Ti vzpostavijo ravnotežje med provnetnimi in protivnetnimi citokini ter tako preprečijo ali upočasnijo napredovanje bolezni (1).

Novejši pristopi zdravljenja so usmerjeni predvsem na lokalno dostavo antibiotikov in antiseptikov. Eno od možnosti predstavljajo nanodostavni sistemi, s katerimi se izboljša biološka uporabnost učinkovine, možno je doseganje podaljšanega sproščanja in lokalnega delovanja učinkovine. Z izbiro ustreznega polimera ali lipida lahko dosežemo podaljšano zadrževaje dostavnega sistema zaradi bioadhezije ali ciljanje točno določene vrste bakterij ali specifičnih celic gostitelja. Prednost ima uporaba biokompatibilnih in biorazgradljivih materialov, ki jih po uporabi ni potrebno mehansko odstraniti iz parodontalnega žepa (9). V nadaljevanju bomo podrobneje predstavili probiotike, s katerimi spremenimo ravnotežje v ustni mikrobioti v prid »dobrim« bakterijam.

1.1.3. Probiotiki za zdravljenje parodontalne bolezni

Probiotiki so lahko v obliki zdravila ali prehranskega dopolnila, ki vsebuje za rast sposobne žive mikroorganizme, le ti pa ugodno vplivajo na zdravje človeka (10). Probiotiki normalno sestavljajo človeško mikrobioto, največ se jih nahaja v prebavilih. Probiotiki delujejo proti škodljivim bakterijam in na ta način izboljšujejo imunski sistem. Najbolj znana sta *Lactobacillus* in *Bifidobacterium.* Ta dva rodova sta sicer med najbolj poznanima in uporabljenima probiotikoma, vendar za ustno votlino nista najbolj pomembna oz. primerna. Laktobacili namreč proizvajajo lahkohlapne maščobne kisline, ki raztapljajo površino zoba in s tem povečajo tveganje za nastanek kariesa. V okviru projekta katerega del je tudi ta magistrska naloga, so iz ust izolirali še druge probiotične seve, iz rodov *Bacillus, Staphylococcus* ter en sev rodu *Stenotrophomonas* ter preverjali njihov protimikrobni učinek proti patogenima bakterijama *E. Coli* in *A. actinomycetemcomitans.* Med izoliranimi probiotiki so ravno sevi iz rodu *Bacillus* najbolj primerni za kultivacijo ter vgradnjo v dostavne sisteme, zaradi aerobne narave in nezahtevnega gojenja. Za ta rod je značilno, da ima širok spekter inhibicije, tako gramnegativnih kot tudi grampozitivnih

bakterij, gliv in kvasovk. Izloča namreč številne protimikrobne snovi (bakteriocini, lipopeptidni in peptidni antibiotiki). Poleg tega je izjemno odporen na zunanje pogoje, saj tvori spore (metabolno neaktivna bakterija) (3).

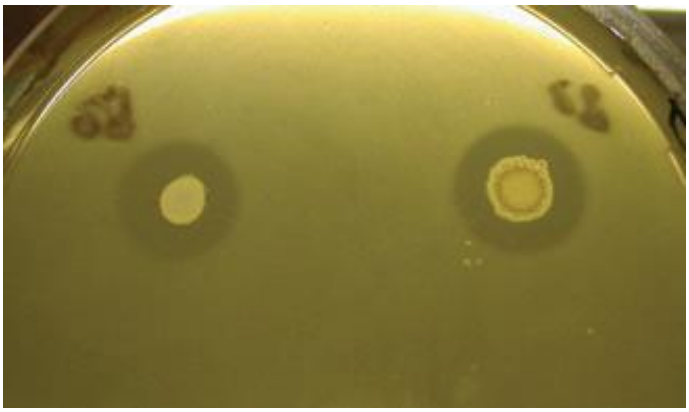
a) Načini delovanja probiotikov

Probiotiki imajo različne načine delovanja, tekmujejo s patogeni za hranila in mesta, kamor se pritrjujejo, proizvajajo protimikrobne snovi, vključno s kislinami, krepijo imunski sistem gostitelja (povečajo produkcijo IgA), zavirajo nastajanje pro-vnetnih citokinov, ki ga sprožijo patogeni in razgrajujejo toksine. Tako zavirajo adhezijo patogenov in njihovo rast (slika 2) ter hkrati vplivajo na lokalni in sistemski imunski odziv. Končni rezultat je zmanjšanje vnetja in poškodbe tkiva (11).

Za doseganje ustreznega učinka probiotikov, se morajo le ti najprej adherirati in vključiti v biofilm, v katerem prevladujejo patogene bakterije v primeru parodontalne bolezni. S patogeni tekmujejo za mesta, kamor se adherirajo oziroma se združujejo z drugimi mikroorganizmi, kar jim omogoča preživetje v obzobnem žepu in v ustih. Sposobnost adheriranja v ustih je med različnimi vrstami probiotikov različna. Probiotiki z bolj hidrofobno celično površino imajo boljšo sposobnost adheriranja (6).

Protimikrobna aktivnost probiotikov je odvisna od vrste in seva, ni pa še točno poznano, katere protimikrobne spojine proizvajajo določeni probiotiki. Med drugim izločajo v svoje okolje vodikov peroksid, mlečno kislino in bakteriocine (beljakovinske toksine**,** ki jih proizvajajo bakterije, da zavirajo razvoj podobnih ali bližnje sorodnih bakterij) ter njim podobne substance.

Naslednji način delovanja probiotikov je imunomodulacija. Probiotiki vplivajo na ravnotežje med provnetnimi in protivnetnimi citokini, ki jih izločajo epitelne celice, okrepijo naravni imunski odziv gostitelja in preko TLR (toll-like receptors) receptorjev modulirajo vnetje, ki ga povzročijo patogeni (6).



Slika 2: Zaviranje rasti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* z *Lactobacillus bulgaricus* (povzeto po 6)

b) Dostavni sistemi za probiotike

Za zdravljenje imajo poleg učinkovitosti, pomembno vlogo tudi kakovost in varnost zdravila. Z vidika varnosti moramo zagotoviti, da probiotiki v našem dostavnem sistemu niso patogeni, ne pospešujejo rasti bakterij, ki povzročajo diarejo in niso sposobni prenašati na antibiotike rezistentnih genov (10).

Za uspešno zdravljenje je pomembna njihova učinkovitost, kar lahko dosegamo z razvojem ustreznega dostavnega sistema. Pri parodontalni bolezni si želimo, da dostavni sistem deluje lokalno, torej v parodontalnem žepu in obzobnih tkivih. Pomembno je, da je dostavni sistem primernih dimenzij za vstavitev v obzobni žep, da je bioadheziven in se dovolj dolgo zadrži na mestu delovanja ter da je v tesnem stiku z obolelim tkivom (1, 8, 9).

V predstavljenem magistrskem delu smo se usmerili na razvoj mikrodelcev namenjenih dostavi probiotikov.

1.2. MIKROKAPSULIRANJE

Razvoj mikrokapsuliranja se je začel v tridesetih letih prejšnjega stoletja. Danes je njegova uporaba razširjena na številna področja, od prehrambne industrije do medicine, kozmetologije, biotehnologije in farmacije. V farmaciji mikrokapsuliranje omogoča prekrivanje neprijetnega vonja in okusa zdravilne učinkovine ter njeno nadzorovano sproščanje, ločitev dveh ali več reaktivnih sestavin zmesi, zaščito učinkovine pred okoljskimi vplivi, spremembo agregatnega stanja in pripravo bioadhezivnih oblik (12, 13).

Pri procesu mikrokapsuliranja obdamo oz. obložimo trdne delce, zračne mehurčke ali drobne kapljice s kontinuiranim slojem lipida, polimera, proteina ali drugih ustreznih snovi. Glede poimenovanja delcev nastalih z mikrokapsuliranjem najdemo v literaturi različne definicije. Širša in najbolj pogosta definicija je, da so obloženi delci mikrometrskih velikosti izdelani s postopkom mikrokapsuliranja, mikrokapsule. Po tej definiciji so mikrokapsule lahko pravilnih ali nepravilnih oblik, enojedrne, večjedrne ali ogrodne. Pri ogrodnem tipu mikrokapsul, ki jih imenujemo tudi mikrosfere, sta ogrodni material in snov, ki jo mikrokapsuliramo enakomerno razporejena po celotni prostornini (12, 13).

Ožja definicija mikrokapsul zajema tudi morfološke lastnosti nastalih delcev in jih definira kot majhne, trdne delce okroglih oblik, ki so sestavljeni iz jedra in ovojnice. Jedro je lahko tekoče, trdno ali plinasto, kar poleg procesa izdelave vpliva na morfološke lastnosti mikrokapsul. Po tej definiciji so mikrokapsule podpomenka mikrodelcev, ki so delci s

premerom 1–1000 μm, ne glede na njihovo zunanjo in notranjo strukturo. Med mikrodelce spadajo poleg mikrokapsul tudi mikrosfere, ki so mikrodelci pravilne okrogle oblike z enkapsulirano snovjo enakomerno porazdeljeno po ogrodju (12, 14).

V nadaljevanju se bomo pri poimenovanju delcev nastalih s postopkom mikrokapsuliranja držali ožje definicije. Naši delci so mikrometrskih velikosti, nimajo pa v vseh primerih obloge in po liofilizaciji niso okrogle oblike, zato jih bomo imenovali mikrodelci.

1.2.1. Izdelava mikrodelcev

Metode za izdelavo mikrodelcev lahko razdelimo na kemijske, fizikalno-kemijske ter fizikalno-mehanske (slika 3). Ne glede na metodo, ima vsaka tri osnovne korake:

1. korak: **vgradnja učinkovine**

Učinkovino vgradimo v sistem tako, da jo raztopimo, emulgiramo ali suspendiramo v raztopini ogrodnega polimera/sladkorja/lipida, ki bo kasneje tvoril jedro ali ogrodje mikrodelca.

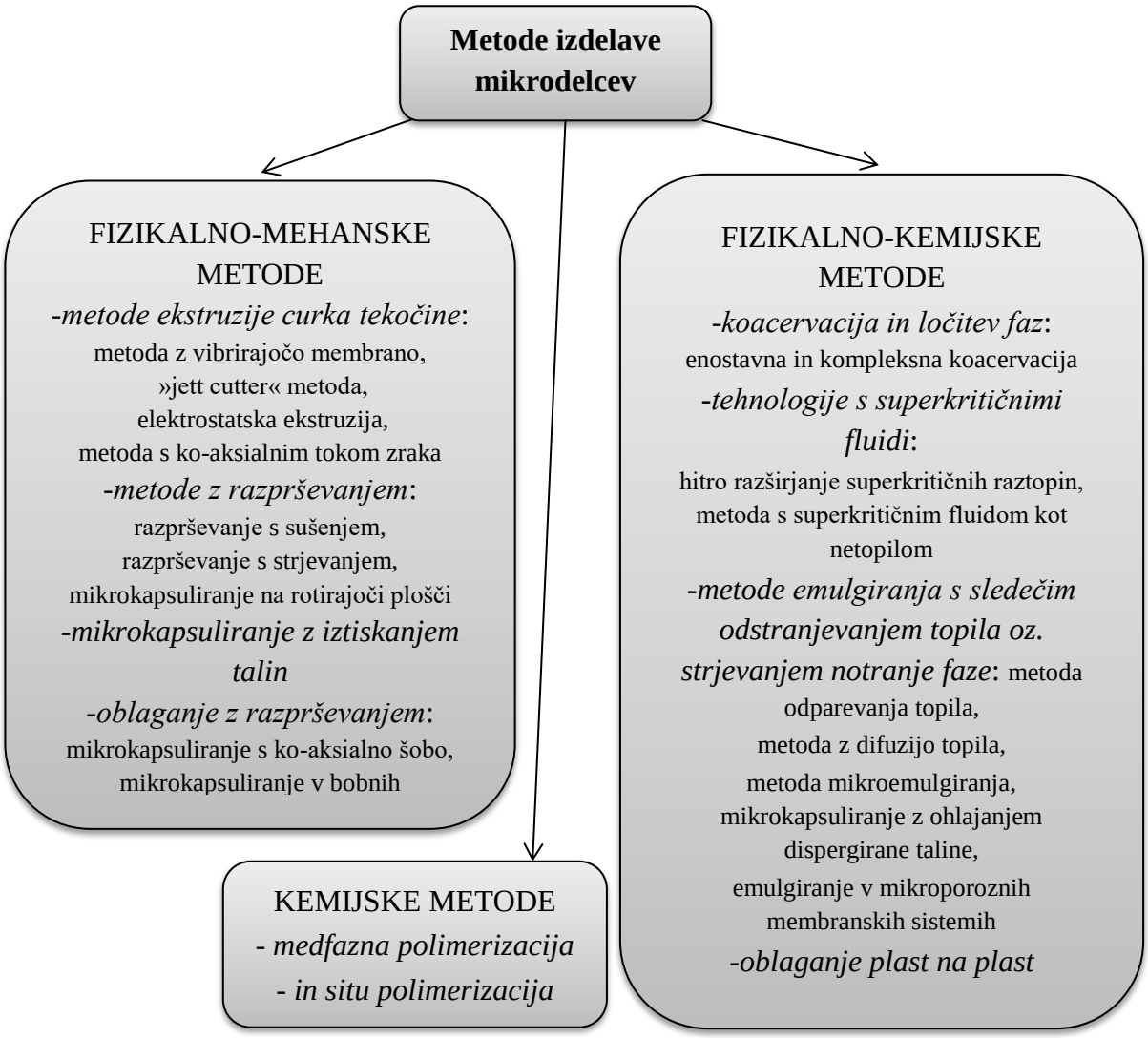
2. korak: **izdelava mikrodelcev**

V primeru, da izhajamo iz tekočega ogrodja, ga v tej fazi dispergiramo v zraku (kapljanje ali razprševanje), v drugi tekočini (emulgiranje ali mikroemulgiranje) ali v superkritični tekočini. V primeru, da izhajamo iz trdnega ogrodja, razpršujemo raztopino za oblaganje na gibajoče delce tega ogrodja (oblaganje v bobnih ali v zvrtinčenih plasteh).

3. korak: **stabiliziranje/utrjevanje izdelanih mikrodelcev**

Stabilizacijo izvedemo s fizikalnimi (sušenje, strjevanje, obarjanje), fizikalno-kemijskimi (koacervacija, geliranje) ali kemijskimi postopki (polimerizacija). Rezultat je nastanek trdnih mikrodelcev (12, 15).

Bolj podrobno se bomo v nadaljevanju posvetili metodam ekstruzije curka tekočine, ki se uporablja tudi za vgrajevanje celic. Eno izmed teh metod (metoda z vibrirajočo membrano) smo v tej nalogi tudi uporabili za vgradnjo probiotikov v mikrodelce.



Slika 3: Razdelitev metod za izdelavo mikrodelcev in mikrokapsul

1.2.2. Metode ekstruzije curka tekočine

Osnova teh metod je razbitje laminarnega curka tekočine v kapljice enakih velikosti. V primeru, ko raztopino polimera črpamo skozi enojno šobo gre za enostavno ekstruzijo. Ko pa uporabljamo koaksialno šobo, kjer skozi zunanjo šobo črpamo fazo z ogrodnim materialom za oblaganje, skozi notranjo pa fazo z jedrnim materialom, pa gre za ko-ekstruzijo. Z različnimi tehnikami razbijemo curek tekočine na majhne kapljice (tj. neutrjene mikrodelce), ki jih nato utrdimo z izhlapevanjem topila, termičnim/kemijskim premreženjem, ohlajanjem ali drugimi primernimi postopki (12).

a) Metoda z vibrirajočo membrano

Pri tej metodi se laminaren curek pod vplivom nihanja membrane, ki se nahaja nad šobo enkapsulatorja, razbije v enakomerno velike kapljice. Nastale kapljice nato potujejo skozi električno polje, kjer se njihova površina nabije, kar privede do odbojnih sil med mikrodelci, te sile pa preprečujejo, da bi se kapljice zlepile/zlile skupaj med padanjem v raztopino premreževala (npr. $CaCl_2$, v primeru alginatnega ogrodja). S spreminjanjem velikosti šobe, amplitude in frekvence nihanja membrane, hitrosti pretoka raztopine in lastnosti ogrodnega in jedrnega materiala lahko vplivamo na velikost nastalih mikrodelcev. Slabost te metode je, da je omejena z viskoznostjo tekočine, če je le ta previsoka, tlačilka namreč ne more vzpostaviti konstantnega toka. Njena glavna prednost pa je, da kot produkt dobimo mikrodelce z ozko porazdelitvijo velikosti (najpogosteje v območju od 100–5000 μm) (12, 16).

Enkapsulator IE-50 (slika 4) je naprava primerna za vgradnjo zdravilnih učinkovin, celic, mikroorganizmov ter drugih biomolekul. Izdelamo lahko mikrodelce velike od 10 μm do 1000 μm ali večje. Na velikost vpliva predvsem izbira velikosti šobe, poleg nje pa tudi relativna hitrost tlačilke (0-1000), frekvenca nihanja membrane (50–7000 Hz) in amplituda (1–7). Vse te parametre, kot tudi hitrost vrtenja mešala in električno napetost (400–1800 V), nastavljamo na kontrolni plošči enkapsulatorja. Odvisno od pogojev lahko izdelamo od 50 do 3000 mikrodelcev na minuto. Sistem z reakcijsko posodo, v kateri imamo raztopino za premreževanje, ki se meša na magnetnem mešalu, omogoča tudi avtoklaviranje delov ter izdelavo mikrodelcev v aseptičnem sistemu (17).

Na splošno velja, da pri uporabi višjih frekvenc dobimo manjše mikrodelce in obratno. Premer nastalega mikrodelca je običajno dvakrat večji od premera uporabljene šobe za razprševanje. Pri izdelavi manjših mikrodelcev navadno potrebujemo manjšo električno napetost (17).

Slika 4: Enkapsulator Inotech IE-50

b) »Jett cutter« metoda

Ta nam nasprotno od metode z vibrirajočo membrano omogoča uporabo visoko viskoznih tekočin ter večjo kapaciteto proizvodnje. Curek tekočine razbijemo s pomočjo vrtečega kolesja z rezalnimi žičkami, ki prekinjajo tok tekočine. Nastanejo mikrodelci cilindrične oblike, ki se oblikujejo v sferične zaradi površinske napetosti (12, 18).

c) Elektrostatska ekstruzija

Pri tej metodi nastanejo zelo majhni mikrodelci zaradi razbitja curka pod vplivom delovanja elektrostatskih sil. Z izbiro procesnih parametrov kot so velikost šobe, električna napetost in hitrost pretoka ter lastnostmi raztopine ogrodnega polimera, vplivamo na velikost ter naboj na površini mikrodelcev. Slaba lastnost je nizka produktivnost te metode (12, 19).

d) Metoda s koaksialnim tokom zraka

Pri metodi s koaksialnim tokom zraka skozi zunanjo šobo dovajamo zrak pod tlakom ali dušik, skozi notranjo pa raztopino ogrodnega polimera. Mikrodelci nastanejo na koncu koncentrične šobe, kjer tok zraka prekinja tok tekočine. Na velikost nastalih mikrodelcev vplivamo s spreminjanjem hitrosti pretoka zraka in tekočine ter velikostjo šobe. Tudi ta metoda ni primerna za proizvodnjo v večjem merilu (12, 18).

1.2.3. Mikrokapsuliranje probiotikov

a) Namen mikrokapsuliranja probiotikov

Glavni namen mikrokapsuliranja probiotikov je ta, da zaščitimo celice pred zunanjimi vplivi kisika, vlage in toplote ter na ta način podaljšamo čas njihove stabilnosti in preživetja. Poleg tega z vgradnjo v mikrodelce izboljšamo pretočne lastnosti produkta, kar je pomembno pri kasnejši formulaciji končnega dostavnega sistema ter proizvodnji v večjem obsegu (20). Z mikrokapsuliranjem probiotikov omogočimo lažjo aplikacijo le-teh, saj so mikrodelci običajno veliki od 10 do 1000 μm, sam probiotik pa 1 –3 μm, odvisno od vrste bakterijskih celic.

b) Dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost mikrokapsuliranja probiotikov

Pomembno je, da probiotiki preživijo sam proces mikrokapsuliranja, da z njim izboljšamo njihovo preživetje pod vplivom okoljskih dejavnikov, da je izkoristek samega mikrokapsuliranja čim večji in čas za nastanek mikrodelcev čim krajši. Na vse to vplivajo različni dejavniki:

- *Izbira ogrodnega materiala* vpliva na sam proces mikrokapsuliranja (hitrost tvorbe mikrodelcev, pogoji pri katerih nastajajo), ter preživetje probiotikov (toksičnost). Obenem mora ogrodni material omogočiti, da se probiotiki na želenem mestu sprostijo iz mikrodelcev, torej, da ti razpadejo oziroma tvorijo gel skozi katerega probiotiki lahko izraščajo ter hkrati ščititi vgrajene probiotike pred vplivi okolja. Na primer, ogrodni material pri vgrajevanju probiotikov, ko želimo da ti delujejo v tankem črevesju, mora biti tak, da razpade pod vplivom pH ali encimov v tankem črevesju in ne že prej, na poti do tja. Na učinkovitost mikrokapsuliranja vplivajo tudi kemijske in strukturne modifikacije izbranega materiala.
- Vplivata tudi *koncentracija polimera v raztopini za mikrokapsuliranje* ter posledično *velikost izdelanih mikrodelcev*. Z večanjem koncentracije polimerne raztopine in hkrati premera mikrodelcev so probiotiki bolj zaščiteni pred vplivi okolja, vendar pri oralni ali peroralni uporabi večjih mikrodelcev lahko pride do neprijetnega okusa in občutka v ustih ter hkrati težje do encimske razgradnje mikrodelcev na mestu delovanja.
- *Začetna koncentracija probiotikov* v suspenziji za kapsuliranje neposredno vpliva na število celic v mikrodelcih in sicer višja koncentracija vodi do večjega števila vgrajenih celic v končnih mikrodelcih. Vendar je potrebno paziti, da struktura mikrodelca zaradi prevelike vsebnost celic ne izgubi svoje trdnosti.
- Velik pomen ima tudi *izbira procesa izdelave mikrodelcev*, ki ima lahko škodljive vplive na probiotike, zaradi pogojev, specifičnih za posamezen proces: npr. izpostavitev visoki temperaturi, električnemu toku ali hipertoničnemu okolju (20).
- Izbira *zaščitnih sredstev* je odvisna od postopka mikrokapsuliranja ter izbranih probiotikov. Največkrat so izbrani laktoza, trehaloza, glicerol, saharoza, polietilen glikol in dekstran, ki ščitijo probiotike med procesi liofilizacije, dehidracije, sušenja z razprševanjem in drugimi (21).
- *Oblaganje mikrodelcev* z dodatno plastjo polimera izboljša njihove fizikalno-kemijske lastnosti.

c) Metode mikrokapsuliranja probiotikov

Najpogosteje uporabljene metode so že predstavljene metode ekstruzije curka tekočine, emulgiranje in sušenje z razprševanjem, kjer dobimo mikrodelce. Pogoji omogočajo, da probiotiki preživijo proces izdelave, zagotoviti pa moramo, da so uporabljena topila netoksična ter pogoji (temperatura, tlak) procesa neškodljivi za vgrajevane celice (20).

d) Materiali uporabljeni pri mikrokapsuliranju probiotikov

Vsak material, ki je v stiku z živimi celicami mora biti biokompatibilen in biorazgradljiv (22). Potencialno uporabni materiali za tvorbo ogrodja mikrodelcev so alginat, hitosan, ksantan, karagenan, želatina, celulozni acetat ftalat (CAP) in drugi (20). Uporabimo lahko posamezen polimer (alginat) ali mešanico različnih polimerov (ksantan, alginat in hitosan). Solanki s sodelavci je ugotovil, da imajo mikrodelci iz natrijevega alginata gladko površino in so okrogle oblike, medtem ko so tisti iz polimerov, ki počasneje gelirajo, pogosteje nepravilnih oblik (20). V ogrodje mikrodelcev lahko poleg polimera vgradimo še krioprotektante (npr. glicerol) ter polnila (npr. laktoza). Prvi povečajo preživetje celic med procesom izdelave in shranjevanja, polnila pa zagotovijo ustrezno voluminoznost izdelanega mikrodelca tudi po sušenju/liofilizaciji. Še dodatno lahko mikrodelce zaščitimo z oblogo polimera, s čimer lahko dosežemo tudi prirejeno sproščanje celic.

Polisaharidi so naravni polimeri, sestavljeni iz več enot ogljikovih hidratov, ki so med seboj povezani z glikozidno vezjo, njihova struktura je lahko linearna ali razvejana. Po izvoru so rastlinski ali živalski materiali, kjer imajo vlogo rezervnih (škrob, glikogen) in opornih snovi (celuloza, hitin). V farmaciji se uporabljajo naravni in polsintezni polisaharidi, med njimi so: agar, alginat, arabski gumi, guar gumi, pektin, ksantan, dekstran, hitosan, karboksimetil celuloza, mikrokristalna celuloza (23). V naslednjih podpoglavjih sta predstavljena polisaharida, uporabljena v magistrski nalogi.

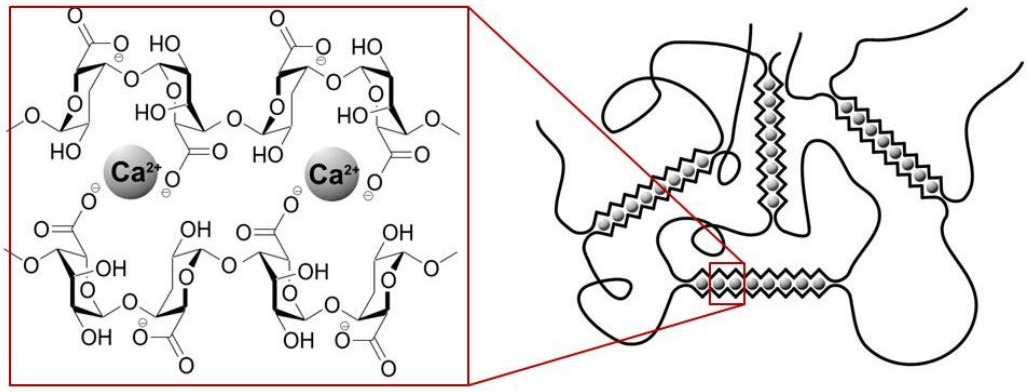
Alginat

Alginat je polisahardi, v vodi topen polianion, linearni blok ko-polimer, sestavljen iz β-D-manuronske (M blok) in α-L-guluronske kisline (G blok). Pridobivajo ga z ekstracijo iz različnih vrst rjavih alg, proizvajata pa ga tudi dve vrst bakterij, *Pseudomonas* in *Azotobacter*. Alginat zelo pogosto uporabljajo za vgrajevanje živih celic in druge biomedicinske namene. Ob dodatku kalcijevih ionov vodni raztopini alginata, se G bloki alginata med seboj povežejo z ioni kalcija in nastane struktura »škatle za jajca«. Kalcijevi

ioni so kot jajca ujeti v prostorih, ki nastanejo med povezanimi G bloki in predstavljajo ogrodje (slika 5). Alginati se razlikujejo po razmerju med M in G bloki, kar je odvisno od vrste alg iz katerih so ekstrahirani. G bloki so odgovorni za trdnost polimera, zato tisti z večjim razmerjem G:M tvorijo močnejše gele. Alginat lahko s polikationi, kot sta hitosan in poli-L-lizin, tvori polielektrolitne komplekse.

Kinetika raztapljanja alginatnih gelov ali ovojnic v *in vivo* pogojih je odvisna od razmerja G in M blokov. Do raztapljanja pride, ko se kalcijevi ioni, ki prečno povezujejo verige alginata zamenjajo z monovalentnim kationi iz telesnih tekočin. *In vitro* se alginat raztaplja v pufru (npr. fosfatni pufer brez kalcija in magnezija), zaradi izmenjave ionov ali z uporabo kelatorjev (EDTA ali natrijev citrat) (24, 25).

V količinah, prisotnih v hrani, je alginat netoksičen. Neželeni učinki se lahko pojavijo pri zaužitju večje količine alginata ali pri vdihovanju prahu, pri uporabi nizkih koncentracij pa je njegova uporaba varna (26).

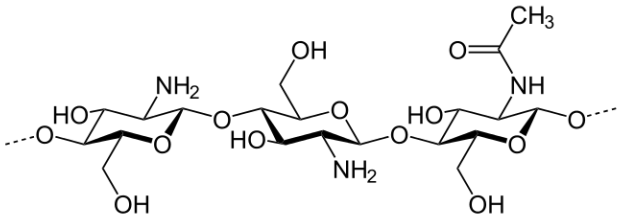


Slika 5: Kemijska zgradba alginata ter njegova struktura v prisotnosti kalcijevih ionov, imenovana »škatla za jajca« (povzeto po 27)

Hitosan

Hitosan (slika 6) je linearni polisaharid, ki ga pridobivajo s kemično modifikacijo hitina. Hitin je ena glavnih sestavin skeleta členonožcev in celične stene gliv. Sestavljen je iz verig *N*-acetil-β-D-glukozamina, urejenih v semi-kristalno zgradbo in je netopen v vodi. Hitosan pridobivajo iz hitina z deacetilacijo aminskih skupin. Pri tem nastanejo proste aminske skupine, ki se v kislih raztopinah protonirajo in s tem povečajo topnost. Stopnja deacetilacije vpliva na fizikalne, mehanske in biološke lastnosti hitosana (24). Hitosan uvrščamo med pozitivno nabite polielektrolite. Zaradi svojega naboja se uporablja za oblaganje plast-na-plast, ki omogoča nastanek več slojnih polimernih plasti z nasprotnimi naboji. Zaradi naboja ima izražene bioadhezivne lastnosti in ga pogosto uporabljajo v

farmaciji, saj podaljša čas zadrževanja učinkovine na mestu adhezije, omogoči tesnejši stik farmacevtske oblike s sluznico in poveča prehod učinkovin skozi sluznico ter tako izboljša biološko uporabnost. Vedno bolj je razširjena tudi uporaba hitosana za celjenje ran, saj naj bi ga pospešil (28).



Slika 6: Kemijska zgradba hitosana (povzeto po 29)

1.3. LIOFILIZACIJA

Za zagotavljanje podaljšane stabilnosti mikrodelcev z vgrajenimi celicami se lahko poleg utrjevanja mikrodelcev, dodatno poslužujemo postopkov, s katerimi popolnoma odtegnemo vodo, ki je glavni vzrok kemijske, fizikalne in mikrobiološke nestabilnosti. Eden izmed njih je sušenje z zamrzovanjem - liofilizacija. Slednja je farmacevtsko tehnološki postopek sušenja iz zamrznjenega stanja pri znižanem tlaku (30). Gre za postopek, pri katerem vzorec najprej zamrznemo, nato pa iz njega v dveh fazah odstranimo vodo. Uporabljajo jo za sušenje učinkovin in bioloških snovi, ki so na daljši časovni rok nestabilne v vodnih raztopinah, so pa stabilne v suhem stanju (31). Liofilizacija temelji na sublimaciji zmrznjene vode neposredno iz trdnega v plinasto stanje, ki poteče le pod trojno točko vode, to je pri temperaturi 273,16 K (0,01 °C) in tlaku 611,73 Pa. Material najprej zamrznemo, potem pa nekoliko segrejemo pri znižanem tlaku, da led sublimira (32).

1.3.1. Proces liofilizacije

Proces liofilizacije je sestavljen iz treh faz:

1. Zamrzovanje

Material je potrebno najprej zamrzniti na pravilen način, saj lahko metoda in končna temperatura zamrzovanja vplivata na uspešnost liofilizacije materiala. Mikrostruktura materiala, ki nastane med zamrzovanjem namreč običajno predstavlja tudi mikrostrukturo liofiliziranega produkta. Pri hitrem ohlajanju nastanejo manjši kristali ledu in je zato možnost, da se material (celične stene) poškoduje manjša, vendar traja dlje, da iz takega materiala z manjšimi porami v naslednji fazi odstranimo vodo (31).

2. Primarno sušenje

Ko je faza zamrzovanja zaključena, tlak v liofilizatorju znižamo s pomočjo črpalke in material segrevamo, tako da ohranjamo konstantno temperaturo. Običajno je tlak med procesom od 4 do 40 Pa in je odvisen od želene temperature materiala in lastnosti vsebnika. Tlak v komori mora biti nižji od parnega tlaka ledu, tako omogočimo sublimacijo ledu. Nastala vodna para potuje do kondenzatorja s temperaturo okrog -50 °C, kjer se odlaga v obliki ledu na spirale ali plošče (32).

3. Sekundarno sušenje

Po končani fazi primarnega sušenja v vzorcu ni več kristalov ledu, še vedno pa je prisotna vezana voda. Sušenje zato nadaljujemo pri višjih temperaturah in tlaku v komori zmanjšanem na minimum, da pride do desorpcije te vode, ki ni bila zamrznjena in je zato nismo mogli odstraniti s sublimacijo. Ta voda je močneje vezana, zato potrebujemo višje temperature (več energije), da jo odstranimo (31, 32).

1.3.2. Pomožne snovi pri liofilizaciji

Katere pomožne snovi in v kakšnih količinah jih bomo dodali formulaciji, je odvisno od vsakega izdelka posebej (od načina aplikacije, zdravilne učinkovine). Lahko dodamo eno ali več pomožnih snovi, ki opravlja eno ali več funkcij (31).

Polnila uporabimo, ko imamo v izdelku veliko vode in malo drugih pomožnih snovi ter učinkovin. Po sušenju dobimo zaradi njihovega dodatka bolj trdno pogačo. Največkrat uporabljamo sladkorje: laktozo, sorbitol, manitol in saharozo (33).

Laktoza je reducirajoč disaharid sestavljen iz ene molekule galaktoze in ene molekule glukoze, in jo najdemo v mlečnih izdelkih. V farmacevtskih oblikah je običajno količina laktoze, ki jo posameznik zaužije v enem dnevu, majhna (do 2 g), takšna količina, tudi pri večini ljudi z laktozno intoleranco, ne povzroči neželenih učinkov (26).

a) Sredstva za zaščito pred zamrzovanjem in sušenjem

Krioprotektant zaščiti učinkovino pred poškodbami zaradi zamrzovanja, lioprotektant pa pred dehidracijo med sušenjem in shranjevanjem.

Krioprotektant zniža temperaturo pri kateri biološki material zamrzne ter hkrati zniža optimalno hitrost hlajenja. Razdelimo jih lahko na dve skupini, z visoko molekulsko maso (npr. dekstran) in z nizko molekulsko maso (npr. glicerol). Tisti z nizko molekulsko maso lahko prehajajo skozi celično steno v notranjost celice, za razliko od visoko molekularnih,

ki ostanejo v zunajceličnem prostoru. Visoko molekularni krioprotektanti odtegnejo celicam vodo pri tem pa zaradi dehidracije celice stabilizirajo membrano in na ta način zmanjšujejo nastajanje ledu znotraj celice. Saharoza in trehaloza ne prehajata v celico ter sta naravna krioprotektanta, prisotna v nekaterih rastlinah in živalih, ki lahko prenašajo nizke temperature (34).

Funkcija lioprotektantov je, da nadomestijo molekulo vode. Ob koncu dehidracije se med polarnimi deli vzorca, kjer so bile vezane molekule vode in lioprotektantom tvorijo vodikove vezi. Lioprotektant tako predstavlja zamenjavo za vodno molekulo in na ta način ohrani zgradbo vzorca. Najpogosteje se uporabljajo trehaloza, manitol in saharoza (35). Pogosto ima ena spojina hkrati vlogo krioprotektanta in lioprotektanta.

Trehaloza je disaharid sestavljen iz dveh molekul D-glukoze. Je nereducirajoč sladkor, ki je običajno dostopen v obliki dihidrata. Ima hkrati vlogo krioprotektanta, lioprotektanta in polnila. Njena uporaba je varna za ljudi, če pa trehalozo dodamo celicam izboljša njihovo preživetje med zamrzovanjem in liofilizacijo (36).

Glicerol je poliol, brezbarvna, viskozna, higroskopna tekočina sladkega okusa brez vonja. Nahaja se v živalskih in rastlinskih maščobah in je tako sestavni del prehrane. Kot pomožna snov (krioprotektant), je navadno prisoten v majhni količini, zato nima nobenih neželenih učinkov in na splošno velja za netoksičnega (26).

1.3.3. Stabilnost liofiliziranih vzorcev

Več faktorjev vpliva na stabilnost liofiliziranih vzorcev, najpomembnejša sta vlaga ter kisik. V vseh vzorcih je namreč tudi po liofilizaciji prisotne nekaj vlage. Koliko vlage ostane v vzorcu je odvisno od narave vzorca in dolžine faze sekundarnega sušenja. Liofiliziran material je higroskopen in če je med shranjevanjem izpostavljen vlagi, ga to lahko destabilizira. To preprečimo s shranjevanjem v okolju z nizko vlago ali z ovojnino, ki ni prepustna za zračno vlago. Tudi kisik vpliva na stabilnost vzorca, zato mora biti ovojnina neprepustna za zrak. Škodljivi učinki kisika in vlage so odvisni od temperature, višja kot je, hitreje produkt razpade. Zato večino liofiliziranih vzorcev shranjujejo v hladilniku, na temperaturi od 4 do 8 °C (32).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je probiotični bakterijski sev 4.1.Z iz rodu *Bacillus* vgraditi v mikrodelce, osnovane na premreževanju alginata s kalcijem z metodo vibrirajoče membrane, z namenom uporabe za zdravljenje parodontalne bolezni. Parodontalna bolezen je med ljudmi vedno bolj razširjena in se običajno zdravi z antibiotiki, ki pa so pogosto neučinkoviti zaradi rezistence bakterij, ki povzročajo to bolezen. Zaradi tega iščejo nove načine zdravljenja, med njimi je tudi zdravljenje s probiotiki. Njihova aplikacija v obzobni žep je lahko zahtevna, zato jih bomo v tej nalogi vgradili v mikrodelce. V ta namen bomo najprej optimizirali gojenje probiotikov 4.1.Z, ki jih bomo v nadaljevanju mikrokapsulirali in nekatere nastale mikrodelce obložili s hitosanom. Vse bomo liofilizirali ter ovrednotili njihove fizikalno-kemijske lastnosti pred in po liofilizaciji.

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Koncentracija raztopine alginata ter velikost šobe za ekstruzijo curka vplivata na proces mikrokapsuliranja ter velikost in obliko mikrodelcev.
- Z oblaganjem alginatnih mikrodelcev s hitosanom, lahko spremenimo njihovo velikost, površinske (zeta potencial, morfologija) ter funkcionalne lastnosti (sproščanje probiotikov iz ogrodja).
- Na ponovno nabrekanje liofiliziranih mikrodelcev najbolj vplivata volumen tekočine in čas stika s tekočino.
- Izbira pomožnih snovi (krio- in lioprotektantov) ima pomembno vlogo pri zaščiti vgrajenih probiotikov med procesom liofilizacije in posledično vpliva na njihovo preživetje.
- Vgradnja probiotikov v mikrodelce spremeni hitrost sproščanja in rasti celic iz liofiliziranega delca v primerjavi s hitrostjo rasti samih liofiliziranih celic.
- Preživetje probiotikov 4.1.Z vgrajenih v mikrodelce skozi daljše časovno obdobje, se razlikuje od preživetja samih probiotikov in je odvisno od pogojev shranjevanja mikrodelcev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Materiali za izdelavo mikrodelcev

- Natrijev alginat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Kalcijev klorid dihidrat ($CaCl_2 \times 2H_2O$), EMSURE, Merck, ZDA
- Hitosan nizke viskoznosti, Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
- Ocetna kislina 100 % (CH_3COOH), EMSURE, Merck, ZDA
- Trehaloza dihidrat, Quadrant Holdings, Cambridge, Velika Britanija
- Laktoza NF 200 MESH ($C_{12}H_{24}O_{12}$), Lek d.d., Ljubljana, Slovenija
- Glicerol ($C_3H_5(OH)_3$), Lex d.o.o., Koper, Slovenija
- Milli-Q voda – ultaprečiščena voda pridobljena z aparaturo Mili-Q advantage A10 Ultrapure Water Purification System, Millipore

3.1.2. Biološki material

a) Probiotične bakterije

V nalogi smo uporabili paličaste aerobne, grampozitivne, probiotične bakterije 4.1.Z, rodu *Bacillus*, izolirane iz ust zdravega posameznika, z dokazano protimikrobnim učinkom na *Escherichia coli* (3), katerih delna sekvenca ribosomalne RNA je dostopna v GeneBank pod številko **MG890421** (37). Odvzem vzorcev je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje (številka 74/04/14), in je bil izveden na Stomatološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra.

b) Tekoče gojišče LB

- LB Broth Base (Lennox), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

Sestava na liter pripravljenega gojišča, ko 20 g praška raztopimo v 1 L vode:

Tripton……. 10 g

Kvasni ekstrakt…… 5 g

NaCl……. 5 g

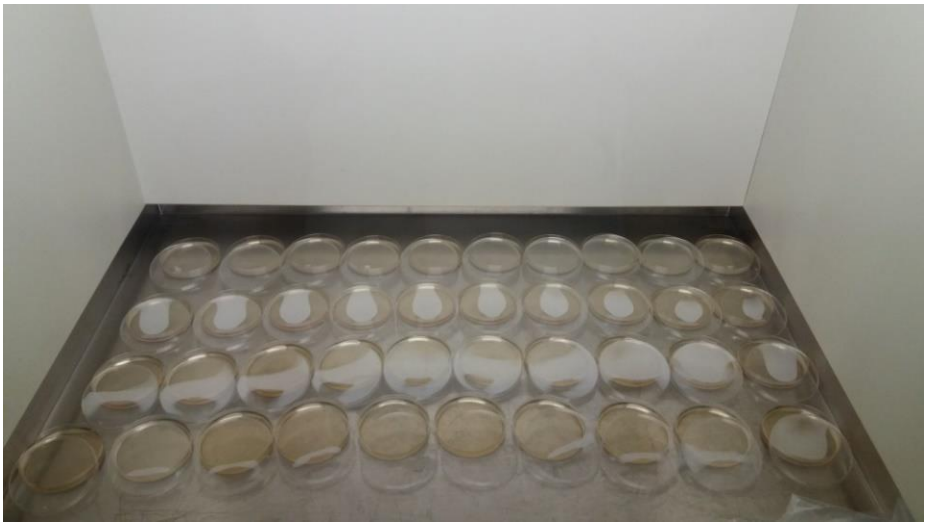
- Prečiščena voda

Tekoče gojišče smo pripravili tako, da smo natehtali 4 g gojišča LB, ki je v obliki prahu, ga stresli v steklenico z zamaškom in z merilnim valjem dolili 200 mL prečiščene vode. Vse skupaj smo premešali s pomočjo magnetnega mešala, da se je prah za pripravo gojišča LB raztopil ter sterilizirali z nasičeno vodno paro 20 minut, 121 °C, 1 bar nadtlaka. Tako pripravljeno tekoče gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku v zaprti steklenici.

c) Priprava trdnega gojišča LB

- Agar, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- LB Broth Base (Lennox), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- Prečiščena voda

Za pripravo agarnih plošč smo si najprej natehtali 8 g praška za pripravo LB gojišča in 6 g agarja, oboje smo stresli v steklenico z zamaškom, z merilnim valjem dolili 400 mL prečiščene vode (kar zadostuje za približno 20 plošč), v steklenico dodali magnetno mešalo, dobro premešali na magnetnem mešalu ter avtoklavirali. Po zaključeni sterilizaciji smo steklenico ponovno postavili na magnetno mešalo, da se je ohladila do temperature, ko smo jo lahko normalno držali in vlili plošče. Med tem časom smo si pripravili komoro LAF (z laminarnim pretokom zraka; *ang. laminar air flow*), kjer smo vlivali plošče. Komoro smo najprej dobro prebrisali s 70 % etanolom, nato smo vanjo položili v vrečki zapakirane sterilizirane petrijevke, ki smo jih predhodno obrisali s 70 % etanolom, pustili v komori, da se je etanol posušil in jih odpakirali. Ko se je gojišče z agarjem ohladilo na približno 50 °C, smo pričeli z vlivanjem. V vsako petrijevko smo vlili gojišče do višine približno 3 mm oziroma toliko, da je bilo dno dobro prekrito. Petrijevko smo le delno pokrili s pokrovčkom (slika 7), dokler se ni agar ohladil, saj se pri ohlajanju kondenzira vlaga na pokrovčku, ki bi lahko kasneje s pokrovčka kapljala na gojišče. Ko se je agar strdil in na pokrovčku ni bilo več kondenzirane vlage (cca. 30 min), smo petrijevke pokrili, obrnili, tako da je trdno gojišče zgoraj, pokrovček pa spodaj ter jih zapakirali v plastične vrečke. Tako zapakirana gojišča smo vzeli iz komore LAF ter jih do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 7: Agarne plošče med sušenjem v komori LAF

d) Priprava fiziološke raztopine

- Natrijev klorid (NaCl), EMSURE, Merck, ZDA
- Prečiščena voda

V 1000 mL bučko smo stresli predhodno natehtanih 9 g NaCl in dolili prečiščeno vodo do oznake. Pripravljeno raztopino smo sterilizirali v avtoklavu.

3.1.3. Material za pripravo fosfatnega pufra s pH=7,4

- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), EMSURE, Merck, ZDA
- Natrijev hidroksid (NaOH), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Prečiščena voda

Fosfatni pufer smo pripravili v skladu z 9. izdajo Evropske Farmakopeje. V 250 mL bučko smo pripravili 0,2 M raztopino kalijevega dihidrogenfosfata. Natehtali smo 6,804 g KH_2PO_4, stresli v bučko ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. V drugo 250 mL bučko smo pripravili 0,2 M raztopino natrijevega hidroksida, tako da smo natehtali 2,0 g NaOH in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Nato smo v 1000 mL bučko zlili 250 mL pripravljenega 0,2 M KH_2PO_4, s pipeto dodali 195,5 mL 0,2 M NaOH, dopolnili do oznake s prečiščeno vodo ter dobro premešali.

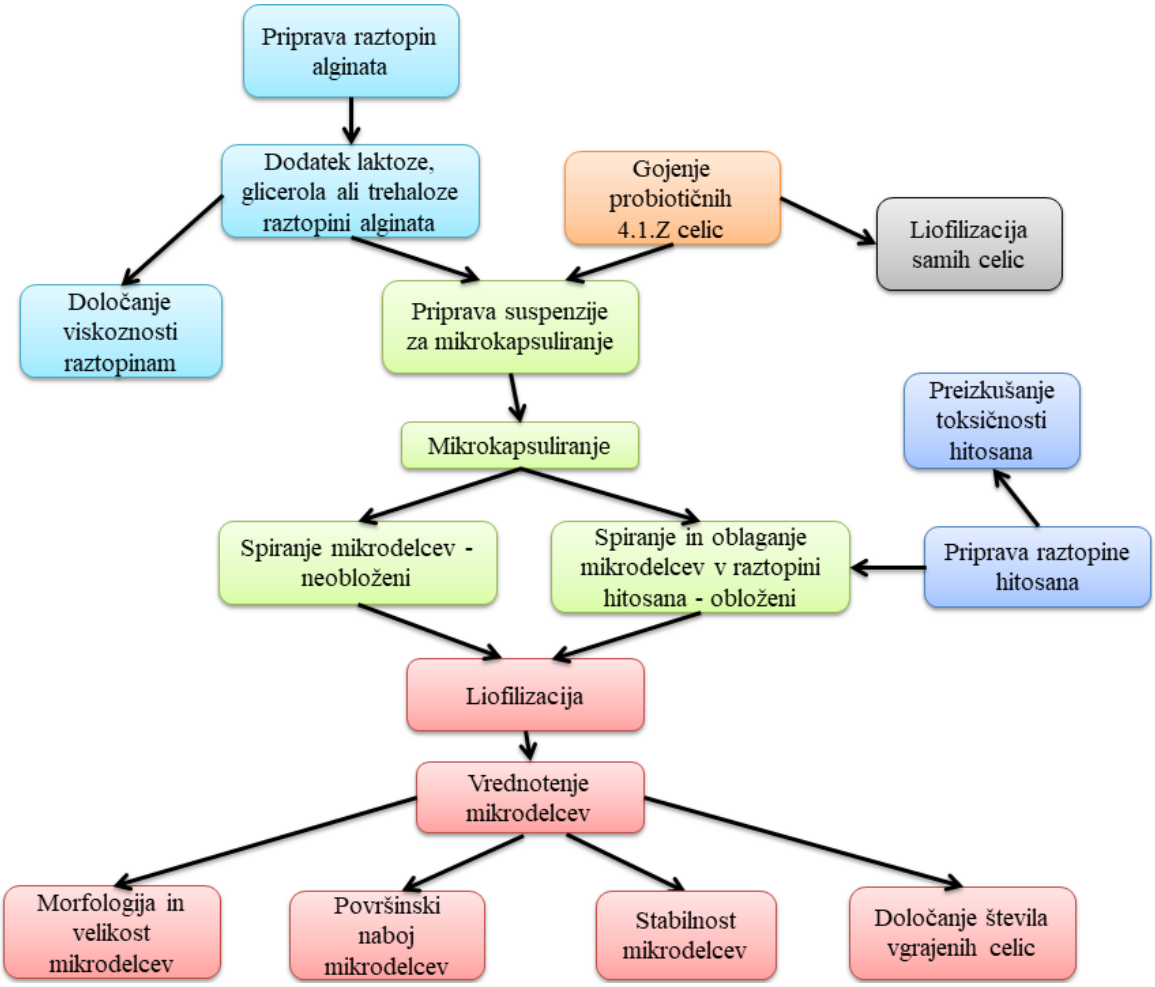
3.2. LABORATORIJSKA OPREMA

- Tehtnica: Sartorius AX623, Goettingen, Nemčija
- Analitska tehtnica: Mettler Toledo A6245, Schwerzenbach, Švica
- Centrifuga: IKA Mini G S000, Staufen, Nemčija
- Inkubator: Orbital Shaker Incubator ES-20, Grant-bio, Cambridge, Velika Britanija
- Vibracijski mešalnik: Vibromix 10, Železniki, Slovenija
- Optični mikroskop: Olympus CX41, Tokio, Japonska
- Fotoaparat: Olympus C-7070, Olympus, Tokio, Japonska
- Magnetno mešalo: RH basic 2, IKA, Staufen, Nemčija
- Rotor-stator homogenizator: IKA T25 digital ultra-turrax, Staufen, Nemčija
- Viskozimeter: Vibro viscosimeter SV-10, A&D, Tokio, Japonska
- Hladilnik: Gorenje HBS 0921, Gorenje, Velenje, Slovenija
- LAF komora: Variolab Mobilien W90, Waldner, Wangen, Nemčija
- Avtoklav: Avtoklav, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- Liofilizator: Liofilizator Christ Beta 1-8K, Martin Christ, Nemčija
- Zetasizer: Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments, Worcestershire, Velika Britanija
- Stereomikroskop: Olympus SZX12, Olympus, Tokio, Japonska; kamera Olympus XC50,Tokio, Japonska; programska oprema: Cellsens Dimension, Olympus
- UV-VIS spektrofotometer: Agilent 8453, Agilent technologies (Hewlett Packard), Santa Clara, Kalifornija, ZDA
- Enkapsulator: Enkapsulator IE-50, Inotech, Uster, Švica
- Mastersizer: Mastersizer S, Malvern instruments, Worcestershire, Velika Britanija
- Vrstični elektronski mikroskop: Supra35 VP, Carl Zeiss, Munchen, Nemčija

3.3. METODE

3.3.1. Načrt eksperimentalnega dela

Eksperimentalno delo je potekalo po načrtu, ki je predstavljen na sliki 8. V prvem koraku smo optimizirali gojenje probiotičnih 4.1.Z celic in pripravili raztopine alginata. Tem raztopinam smo nato dodali laktozo, glicerol ali trehalozo in suspenzijo z znanim številom probiotikov. V naslednji fazi je sledilo mikrokapsuliranje in oblaganje mikrodelcev v raztopini hitosana. Izdelane mikrodelce smo liofilizirali in jih v zadnjem koraku še ovrednotili z različnimi metodami.



Slika 8: Shema eksperimentalnega dela

3.3.2. Celično delo

a) Določanje števila kolonijskih enot (KE)

Za razmaz celic na trdno gojišče smo najprej osnovno suspenzijo celic 4.1.Z (celice v gojišču ali dispergirani mikrodelci v fosfatnem pufru) ustrezno redčili. Redčitve smo pripravili tako, da smo 100 µL vzorca zmešali z 900 µL 0,9 % NaCl (redčitev 10^{-1}) oziroma 10 µL vzorca z 990 µL 0,9 % NaCl (redčitev 10^{-2}) in dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo iz redčitve 10^{-2} prenesli 100 µL v 900 µL 0,9 % NaCl, premešali in tako dobili redčitev 10^{-3}. Po istem postopku smo pripravili različne redčitve, odvisno od vzorca.

Ko smo imeli pripravljene ustrezne redčitve smo petrijevko s trdnim gojiščem označili na spodnji strani ob robu. Vanjo smo ob gorilniku odpipetirali 100 µL vzorca/redčitve ter ga razmazali po površini gojišča s spatulo po Drigalskem, ki smo jo predhodno namočili v 96 % etanolu, razžarili v plamenu ter ohladili. Nato smo razmazali bakterije po celotni površini gojišča. Na koncu smo spatulo ponovno razžarili in shranili v etanolu do naslednje uporabe. Plošče smo oblepili s parafilmom ter inkubirali obrnjene z gojiščem na zgornji strani v inkubatorju na 37 °C 24 ur.

Po 24 h inkubaciji plošč, smo prešteli kolonije na vseh ploščah, kjer je bilo število kolonij med 10 in 300. Število kolonij na volumsko enoto (KE/mL) smo izračunali iz števila kolonij na ploščah, ki so imele od 30 do 300 kolonij, po naslednji enačbi *1*:

KE/mL *= število kolonij / redčitev × volumen vzorca (mL)* (enačba *1*)

b) Optimizacija postopka gojenja probiotikov

V 100 mL erlenmajerico smo ob prižganem gorilniku prelili približno 50 mL steriliziranega tekočega gojišča LB Broth. Nato smo vanjo z ezo dali nekaj kristalčkov zamrznjenih 4.1.Z celic iz zamrzovalnika (-80 °C). V nekaterih primerih pa smo nasadili kristalčke v 50 mL svežega gojišča, inkubirali čez noč, naslednji dan pa s pipeto iz te suspenzije celic vzeli 100 µL ter jo prenesli v 50 mL svežega tekočega gojišča. Erlenmajerico smo pokrili in inkubirali v inkubatorju na 37 °C in mešanju 150 rpm. V določenih časovnih intervalih smo s pipeto v vialo odvzeli 2 mL vzorca ter mu pomerili OD pri 600 nm na UV-VIS spektrofotometru. Delo s celicami je vedno potekalo ob prižganem gorilniku.

Vpliv temperature na rast 4.1.Z smo preverili tako, da smo en del suspenzije (25 mL) po treh urah inkubacije prelili v sterilno erlenmajerico, jo hranili v hladilniku 12 ur pri 8 °C in naslednji dan nadaljevali z inkubacijo na 37 °C in merjenjem OD pri 600 nm.

Optična gostota-OD (*ang. optical density*) je le v manjši meri rezultat absorpcije svetlobe, gre namreč predvsem za sipanje svetlobe zaradi prisotnosti celic. Z naraščanjem valovne dolžine se OD zmanjšuje. Na ta način je mogoče spremljati gostoto ali rast bakterij, običajno pri valovni dolžini 600 nm, kjer je absorpcija svetlobe najmanjša in merimo predvsem sipanje (38).

Pripravili smo umeritveno premico odvisnosti absorbance pri 600 nm od KE/mL suspenzije celic. Najprej smo celice v tekočem gojišču dovolj dolgo inkubirali, da je bil njihov OD približno 2. Iz te suspenzije smo nato pripravili različne redčitve s samim gojiščem in jim izmerili OD.

b) Preizkušanje toksičnosti hitosana in ocetne kisline

Na spodnjo stran petrijevke smo narisali 6 krogov, kamor smo kasneje nanesli raztopine hitosana v 1 % ocetni kislini, koncentracije 1; 0,5; 0,25 in 0,125 mg/mL ter 1 % in 0,5 % ocetno kislino. Nato smo na ploščo razmazali 100 µL suspenzije 4.1.Z celic, ki smo jo gojili čez noč in počakali, da je gojišče vpilo suspenzijo. Na področje krogcev smo s pipeto nanesli 10 µL različnih redčitev hitosana v ocetni kislini ali same ocetne kisline, pustili da se vpije, zatesnili petrijevke s para filmom ter inkubirali plošče 18 h na 37 °C. Naslednji dan smo preverili ali so na mestu kamor smo nanesli polimer ali ocetno kislino zrasle celice.

3.3.3. Priprava raztopin za mikrokapsuliranje

a) Raztopina alginata ter suspenzija za mikrokapsuliranje

V erlenmajerico z obrusom smo natehtali natrijevo sol alginata, čeprav gre za sol se v nadaljevanju v nalogi uporablja izraz alginat. Alginatu smo dolili ultraprečiščeno (Mili-Q) vodo do ustrezne mase ter pustili na magnetnem mešalu najmanj 4 ure, da se je alginat raztopil. Vedno smo naredili 200 g raztopine s sledečimi koncentracijami alginata: 0,75; 1,0; 1,1; 1,2; 1,4; 1,5 in 1,6 m/m %.

V naslednjem koraku smo pripravljeni raztopini alginata (1–1,6 %) dodali glicerol in laktozo ali trehalozo. Količina vseh štirih sestavin, vključno z raztopino alginata je odvisna od želene količine ter razmerja med posameznimi sestavinami (preglednica I). Končni

delež alginata v raztopini, ki jo mikrokapsuliramo je zanemarljivo majhen, vendar je njegova vloga tvorilca ogrodja, nujno potrebna za tvorbo mikrodelcev. Na primer, v 20 g končne raztopine alginata, laktoze in glicerola, ki smo jo pripravili iz 1,6 % raztopine alginata (16 g), kot je predstavljeno v spodnji preglednici, je masa samega alginata 0,256 g. Končne raztopine smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico z obrusom natehtali raztopino alginata, tej pa smo dodali še ustrezno količino glicerola in laktoze ali trehaloze in pustili na magnetnem mešalu, da so se dodane pomožne snovi raztopile.

Preglednica I: Primer potrebnih nateht raztopin alginata, glicerola, laktoze in trehaloze v odvisnosti od želenega razmerja med njimi

	Raztopina alginata: glicerol:laktoza	**Raztopina alginata: trehaloza**	**Raztopina alginata: trehaloza**
Masno razmerje	8:1:1	8:2	9:1
Raztopina alginata (1 – 1,6 %)(g)	16	16	18
Laktoza/ trehaloza (g)	2	4	2
Glicerol (g)	2	/	/
Skupaj(g)	20	20	20

Pripravljeni raztopini smo tik pred mikrokapsuliranjem dodali 4.1.Z probiotike, ki smo jih predhodno nagojili do ustreznega OD ter jih sprali in s tem odstranili gojišče po sledečem postopku. V sterilne epice smo odpipetirali 1,5 mL suspenzije probiotikov v gojišču in centrifugirali 5 min na 2000 g. Odlili smo supernatant, dolili 500 µL 0,9 % NaCl ter mešali na vibracijskem mešalniku 30 s, da so se celice ponovno resuspendirale. Raztopino za mikrokapsuliranje in celice smo v sterilni erlenmajerici z obrusom zmešali na magnetnem mešalu v volumskem razmerju 10:1.

b) Raztopina hitosana za oblaganje

Za oblaganje alginatnih mikrodelcev smo uporabili raztopino hitosana v 1 % ocetni kislini (1 mg/mL). V 500 mL bučko smo odpipetirali 5 mL 100 % ocetne kisline ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Nato smo v steklenico z zamaškom natehtali 500 mg hitosana, dolili 500 g pripravljene kisline in pustili na magnetnem mešalu, da se je hitosan raztopil.

3.3.4. Določanje viskoznosti

Raztopinam za mikrokapsuliranje (preglednica I) smo izmerili viskoznost na vibrirajočem viskozimetru z nizko frekvenco nihanja. Princip meritve temelji na zmanjšanju amplitude nihanja zlatih ploščic z konstantno frekvenco 30 Hz (»damping effect«). Večja viskoznost raztopine povzroči zmanjšanje amplitude nihanja ploščic, zato je potrebna dodatna energija za ohranjanje enakega nihanja. Ta sprememba v potrebni energiji je preračunana v vrednost viskoznosti. Kot referenco smo pred vsako meritvijo preiskovanih raztopin določili viskoznost uporabljene prečiščene vode, ki ima viskoznost 1.00 (± 0.03) mPa·s pri temperaturi 20 °C.

3.3.5. Procesni parametri mikrokapsuliranja

Mikrodelce smo izdelali na enkapsulatorju Inotech IE-50 z metodo ekstruzije curka tekočine s pomočjo vibrirajoče membrane. Za izdelavo smo uporabili šobi velikosti 100 in 500 µm. 20 mL suspenzije 4.1.Z probiotikov ter ostalih pomožnih snovi v alginatu smo napolnili v brizgo, ki smo jo vpeli v »črpalko/bat« na enkapsulatorju. Pred pričetkom smo nastavili pogoje: frekvenco vibriranja membrane na 1000 Hz, amplitudo na 6 in napetost na 1,50 kV, ki se niso spreminjali tekom procesa. Preizkusili smo dve različni velikosti šobe, katerima smo morali prilagajati tudi hitrost pretoka suspenzije: relativno hitrost pretoka suspenzije pri 100 µm šobi na 230, pri 500 µm pa na 990.

Nastale kapljice smo zbirali v 200 mL 200 mM raztopine $CaCl_2$, ki se je med mikrokapsuliranjem mešala na magnetnem mešalu. Mikrodelce smo po koncu izdelave še 10 minut pustili v $CaCl_2$ na magnetnem mešalu, nato pa smo jih precedili čez plastično cedilo s premerom luknjic ~ 0.5 mm, pri čemer smo se znebili večjih, neustreznih mikrodelcev, ki so nastali na začetku in koncu mikrokapsuliranja.
Počakali smo, da so se mikrodelci v $CaCl_2$ posedli na dno in nato odlili $CaCl_2$, ne da bi pri tem izgubljali mikrodelce. Sprali smo jih tako, da smo jim dolili 200 mL ultraprečiščene vode, ponovno počakali, da so se posedli in ponovili postopek.

3.3.6. Polielektrolitno oblaganje mikrodelcev

Mikrodelce smo elektrostatsko obložili s hitosanom, tako da smo spranim mikrodelcem, ki smo jih izdelali po zgoraj opisanem postopku, dolili 200 mL raztopine hitosana v 1 %

ocetni kislini (1 mg/mL). Čašo smo postavili na magnetno mešalo in mešali 10 minut. Po tem času smo čašo umaknili z mešala in počakali, da so se mikrodelci posedli. Raztopino hitosana smo odlili in ponovno 2× spirali z ultraprečiščeno vodo. Na ta način smo dobili alginatne mikrodelce z vgrajenimi 4.1.Z celicami s hitosansko oblogo. Samo oblaganje temelji na elektrostatskih interakcijah; hitosan, ki je pozitivno nabit se namreč preko elektrostatskih interakcij veže na negativno nabite karboksilne skupine alginata. Tako polielektrolitno oblaganje vodi do nastanka tankih polimernih oblog.

Pri zadnjih štirih vzorcih (preglednica II, 10., 11., 19. in 20. formulacija), ki smo jih izdelali v večjih količinah smo predhodno sterilizirali vso steklovino, epice, tipse in viale, za pripravo raztopin alginata smo uporabili ultraprečiščeno vodo. Sterilizirali smo tudi $CaCl_2$ in mikrokapsulirali v LAF komori, da bi se v čim večji možni meri izognili kontaminaciji.

3.3.7. Izdelava različnih formulacij mikrodelcev

Za pripravo vseh formulacij smo kot ogrodje kapsul uporabili raztopino alginata, ki smo ji dodali polnilo (laktoza ali trehaloza) in krioprotektant, ki je celice zaščitil pred poškodbami zaradi zamrzovanja**.** Sestavo formulacij podaja preglednica II.

Preglednica II: Izdelane formulacije mikrodelcev z uporabljenimi različnimi parametri: koncentracija alginata, razmerje različnih polnil in krioprotektantov, prisotnost hitosanske obloge, uporabljena velikost šobe.

	Konc. alginata (%)	Polnilo	Krioprotektant	Razmerje razt. alginata: (polnilo: krioprotektant)	Obloga hitosana	Velikost šobe (µm)
1. formulacija	0,75	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	500
2. formulacija	0,75	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	500
3. formulacija	0,75	Trehaloza	Trehaloza	8:2	NE	500
4. formulacija	1,1	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	100
5. formulacija	1,1	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	100
6. formulacija	1,1	Trehaloza	Trehaloza	8:2	NE	100
7. formulacija	1,1	Trehaloza	Trehaloza	8:2	DA	100
8. formulacija	1,1	Trehaloza	Trehaloza	9:1	NE	100
9. formulacija	1,1	Trehaloza	Trehaloza	9:1	DA	100
10. formulacija	1,2	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	100
11. formulacija	1,2	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	100
12. formulacija	1,2	Trehaloza	Trehaloza	8:2	NE	100
13. formulacija	1,2	Trehaloza	Trehaloza	8:2	DA	100
14. formulacija	1,2	Trehaloza	Trehaloza	9:1	NE	100
15. formulacija	1,2	Trehaloza	Trehaloza	9:1	DA	100
16. formulacija	1,4	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	100
17. formulacija	1,4	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	100
18. formulacija	1,4	Trehaloza	Trehaloza	9:1	NE	100
19. formulacija	1,5	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	100
20. formulacija	1,5	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	100
21. formulacija	1,6	Laktoza	Glicerol	8:1:1	NE	100
22. formulacija	1,6	Laktoza	Glicerol	8:1:1	DA	100

3.3.8. Liofilzacija

Izdelane mikrodelce smo napolnili v stehtane 20 mL viale. V vsako smo natančno natehtali 3-5 g mikrodelcev s čim manj vode (približno do polovice volumna viale) ter jih zamrznili v zamrzovalniku pri -80 °C.

Pred liofilizacijo smo čez odprtino namestili filter papir, ki smo ga pritrdili z elastiko in naluknjali z iglo, s čimer smo preprečili izgube posušenih mikrodelcev, ki bi jih drugače

zaradi vakuuma ter njihove majhne teže potegnilo iz vsebnikov. Vsebnike z zamrznjenimi mikrodelci smo položili na polico v liofilizatorju, ki smo jo prav tako ohladili na -20 °C pred začetkom liofilizacije. Liofilizirali smo 24 ur. V prvi fazi sušenja je bila temperatura police -5 °C in podtlak 0,630 mbar, v drugi fazi smo temperaturo police dvignili na 20 °C. Po končani liofilizaciji smo viale zaprte z gumijastimi zamaški zatesnili še s parafilmom in jih shranili v hladilnik (razen vzorcev za spremljanje stabilnosti na sobni temperaturi).

Po enakem postopku smo liofilizirali tudi same celice, ter celice z dodatkom glicerola (10 %). Najprej smo jih nagojili čez noč in jim pomerili OD. V stehtane falkonke smo s pipeto odmerili 10 mL suspenzije celic in centrifugirali 5 min na 3000 rpm. Odlili smo supernatant, stehtali falkonko s celicami in jih resuspendirali z vibracijskim mešalnikom v 500 µL 0,9 % NaCl. Celice smo nato prelili v označeni viali ter v eno od vial dodali 50 µL glicerola. V zamrzovalniku smo jih zamrznili na -80 °C in kasneje liofilizirali.

3.3.9. Vrednotenje mikrodelcev

a) Morfologija in velikost mikrodelcev

Optična mikroskopija

Takoj po mikrokapsuliranju in spiranju smo mikrodelce opazovali pod optičnim mikroskopom, kjer smo spremljali njihovo obliko in velikost. Mikroskopski preparat smo pripravili, tako da smo na objektno stekelce kapnili 10 µL mikrodelcev v vodi ter pokrili s krovnim stekelcem. Preparat smo tudi slikali in kasneje pomerili velikost najmanj 100 mikrodelcem pred liofilizacijo s pomočjo programa ImageJ 1.50i (39).

Na enak način smo pomerili tudi velikost liofiliziranim mikrodelcem (najmanj 100), ki smo jih resuspendirali v 0,9 % NaCl. V 1,5 mL epico smo dali konico spatule liofiliziranih mikrodelcev in dolili 1 mL 0,9 % NaCl. Počakali smo 1 minuto, nato pa po enakem postopku, kot je opisan zgoraj, pripravili preparate, jih slikali ter jim zmerili velikost.

V 1,5 mL epico smo natehtali 10 mg mikrodelcev in jim s pipeto postopoma dodajali vedno večji volumen 0,9 % NaCl (najprej je bil skupni dodan volumen 200 µL, nato 500 µL in na koncu 1 mL). Na ta način smo ugotovili, kolikšen volumen 0,9 % NaCl moramo dodati liofiliziranim mikrodelcem, da pridobijo nazaj obliko, ki so jo imeli pred liofilizacijo. Po vsakem dodatku NaCl smo pripravili preparat ter obliko mikrodelcev

spremljali pod optičnim mikroskopom. Raztopino NaCl smo dodajali, dokler niso delci pridobili nazaj svoje prvotne oblike.

Stereomikroskop

S stereomikroskopom smo vrednotili samo obliko liofiliziranih mikrodelcev in preko slik, ki smo jih posneli, s programom ImageJ izmerili tudi velikost najmanj stotim mikrodelcem. Na objektno stekelce smo s spatulo razporedili nekaj mikrodelcev, tako da so bili enakomerno razporejeni. Stekelce smo namestili na mizo stereomikroskopa, pogledali in tudi slikali mikrodelce pri različnih povečavah. S programom ImageJ smo jim izmerili velikost, dolžino in širino in iz dobljenih vrednosti izračunali vrednost razmerja dolžina/širina, ki predstavlja samo obliko mikrodelcev. Bližje kot je ta vrednost 1, bolj je delec okrogle oblike.

Vrstični elektronski mikroskop

Obliko liofiliziranih mikrodelcev smo poleg stereomikroskopa opazovali tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM – *ang. scanning electron microscopy*). Zaradi velikih povečav smo na ta način ovrednotili tudi njihove morfološke lastnosti. Mikrodelce smo z obojestranskim prevodnim lepilnim trakom prilepil na nosilce za SEM ter odvečno količino odstranili s prepihovanjem s stisnjenim zrakom. Pri elektronski mikroskopiji se kot vir valovanja uporabljajo elektroni. Elektroni imajo namreč kratko valovno dolžino in zato omogočajo veliko boljšo ločljivost od vidne svetlobe. V notranjosti elektronskega mikroskopa je potrebno zagotavljati vakuum, ker je zaradi majhne mase elektronov njihova pot v zraku omejena. Izsevane elektrone (vir je v zgornjem delu mikroskopa) elektromagnetne leče v kondenzorju zberejo v ozek snop-curek elektronov, ki ga detektor v vrsticah vodi po površini preparata. Ob stiku elektronov s površino vzorca pride do različnih reakcij, tudi do izbijanja različnih vrst sekundarnih elektronov s površine vzorca, kar zazna detektor. Nastali elektroni in ostali produkti reakcij na površini vzorca so odvisni od kemične sestave vzorca ter njegove površine (40).

Določanje hidrodinamske velikosti mikrodelcev v suspenziji

Z napravo Mastersizer S smo določili hidrodinamsko velikost liofiliziranih mikrodelcev, dispergiranih v vodi v različnih časovnih točkah, njihovo distibucijo ter specifično površino. Ta naprava določa velikost delcev na podlagi laserske difrakcije. Merimo lahko

delce velike od 0,05 µm do 900 µm. Trden vzorec v celici dispergiramo v ustrezni količini vode, s pomočjo magnetnega mešala »pošljemo« disperzijo delcev skozi merilno celico, kamor laser seva monokromatsko svetlobo. Delci, odvisno od njihove velikosti, sipajo svetlobo pod različnimi koti, detektor pa zaznava sipanje. Na podlagi algoritmov, ki temeljijo na predpostavki, da so delci sferični, dobimo rezultat hidrodinamske velikosti delcev izražen kot premer krogle, ki bi imela enak volumen kot analiziran delec. Izmerjene hidrodinamske velikosti mikrodelcev se tako razlikujejo od velikosti mikrodelcev izmerjenih pod mikroskopom, zato rezultati niso direktno primerljivi. Pri meritvah na Mastersizer-ju je pomembna koncentracija vzorca v merilni celici in morebitni aglomerati, saj lahko zaradi tega pridemo do napačnih rezultatov (41).

Hitrost magnetnega mešala smo uravnali na 1200 rpm. Kot referenčni vzorec smo uporabili prečiščeno vodo. Ko je Mastersizer izmeril ozadje smo direktno v celico, kjer je bila prečiščena voda dodali ustrezno količino mikrodelcev, da smo dosegli želeno stopnjo zatemnitve (10–20 %), pomešali s spatulo in takoj pričeli z meritvami. Velikost in specifično površino smo merili v različnih časovnih točkah (0, 15, 30, 60, 90, 150, 300, 420 in 900 sekund), s čimer smo poskušali spremljati nabrekanje izdelanih mikrodelcev v tekočem mediju in posledično spreminjanje hidrodinamskega premera mikrodelcev v odvisnosti od časa stika s tekočino. Kot rezultat so podana povprečja vsaj treh meritev.

b) Površinski naboj – zeta potencial

Zeta potencial mikrodelcev v vodi smo merili z aparatom Zetasizer Nano SZ. V plastično kiveto smo dali konico spatule liofiliziranih mikrodelcev, s pipeto dodali 1 mL prečiščene vode ter dobro pretresli. Zeta potencial smo merili z Zeta Dip Cell pri temperaturi 25 °C.

Zeta potencial daje oceno naboja delca v določenem mediju, v našem primeru vodi. Od naboja delcev je odvisna fizikalna stabilnost disperzije, ker se delci z enakim nabojem odbijajo med seboj, imajo manjšo težnjo po agregaciji ter flokulaciji in je zato taka disperzija bolj stabilna (42). Naboj naših delcev izhaja iz funkcionalnih skupin alginata oz. hitosana, ki se nahajajo na površini delcev.

Zetasizer Nano določi zeta potencial z merjenjem hitrosti delcev, medtem ko se ti gibljejo zaradi elektroforeze. Delci z nabojem se zaradi ustvarjenega električnega polja gibljejo proti elektrodi. Hitrost gibanja je proporcionalna moči polja ter zeta potenciala delcev. Ker je moč polja poznana, aparat meri le hitrost gibanja z uporabo Dopplerjeve elektroforeze, in nato iz tega izračuna zeta potencial (42).

c) Določanje števila vgrajenih celic in spremljanje hitrosti rasti celic iz mikrodelcev

Količino celic, ujetih v mikrodelce, smo ugotavljali z nanašanjem vzorcev na trdno gojišče takoj po mikrokapsuliranju ter določanjem KE (poglavje 3.3.2.). V 10 mL čašo smo natehtali 100 mg mikrodelcev s čim manj vode ter do 10 g dolili fosfatni pufer s pH = 7,4. Čašo smo pokrili z aluminijasto foljo, pustili 15 min in nato mikrodelce razbili z rotor-stator homogenizatorjem, 30 s na 6200/min. Iz tega vzorca smo pripravili ustrezne redčitve, ki smo jih nanašali na agarne plošče po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.2.
Po enakem postopku smo na plošče nanašali liofilizirane mikrodelce, le da smo v čašo natehtali 10 mg mikrodelcev in do 10 g dolili fosfatni pufer, vse ostalo je potekalo po postopku opisanem zgoraj.

Hitrost rasti celic iz liofiliziranih mikrodelcev in samih liofiliziranih celic smo spremljali na podoben način kot smo optimizirali postopek gojenja probiotikov v poglavju 3.3.2. V 50 mL gojišča smo natehtali 10 mg mikrodelcev oziroma količino celic z ekvivalentnim KE/g. V epico smo natehtali 5 mg liofiliziranih celic, dolili 500 µL 0,9 % NaCl ter premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo ta vzorec redčili, tako da smo v novo epico odmeril 100 µL prejšnega vzorca, dodali 900 µL gojišča ter ponovno premešali. Tako smo vzorec liofiliziranih celic redčili na 10^{-3}. Število KE/g liofiliziranih celic je namreč v rangu 10^{9}, mikrodelcev pa 10^{6}. Pripravljen vzorec smo zlili v 50 mL gojišča in nato v določenih časovnih intervalih merili OD pri 600 nm.

d) Preživelost probiotikov v liofiliziranih mikrodelcih v času shranjevanja (stabilnost)

Na način, opisan v predhodnem poglavju, smo preverjali tudi preživetje vgrajenih probiotikov oziroma stabilnost liofiliziranih mikrodelcev skozi čas. Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije je stabilnost farmacevtskega izdelka sposobnost, da izdelek skozi čas roka uporabnosti ohranja svoje značilnosti znotraj specificiranih meja. Za mikrodelce s probiotiki je zato pomembno predvsem, da vgrajene celice v obdobju roka uporabnosti preživijo, ker lahko le tako zagotovimo učinkovitost izdelka. ICH smernice ne definirajo natančne temperature shranjevanja biotehnoloških izdelkov med preskušanjem stabilnosti, ker je ta odvisna od izdelka (43). Ker za naše mikrodelce in vgrajene probiotike optimalna temperatura še ni določena, smo iste formulacije hranili v hladilniku in na sobni temperaturi. Tako smo po eno vialo vzorcev, ki smo jih izdelali v večji količini, postavili v eksikator z dodano nasičeno raztopino soli magnezijevega klorid heksahidrata, ki ohranja

relativno vlažnost na 33 %, saj lahko tudi nizka oz. visoka relativna vlažnost vpliva na stabilnost. V eksikator smo postavili tudi termometer in ob vsakem nanosu mikrodelcev na plošče odčitali temperaturo in relativno vlažnost. Drugo vialo z istimi vzorci pa smo hranili v hladilniku na 4–8 °C. Frekvenca testiranja stabilnosti ni predpisana, zato smo na začetku vzorčili vsak teden, ker pa se število KE/g mikrodelcev ni spreminjalo smo ta interval najprej povečali na 1 mesec, nato na 2 in 3. Vzorce smo nanašali na plošče po enakem postopku, opisanem v poglavju 3.3.2.

Stabilnost smo preizkušali tudi liofiliziranim celicam, ki smo jih hranili v hladilniku (4-8 °C) in jih takoj po liofilizaciji, po 1, 2, 3 in 4 tednih ter 2, 4 in 6 mesecih nanašali na plošče. V sterilizirano 1,5 mL epico smo natehtali 5 mg celic, dodali 500 µL 0,9 % NaCl in mešali z vibracijskim mešalom 10 s. Iz tega smo pripravili ustrezne redčitve, ki smo jih nanašali na plošče, po 24 h prešteli kolonije in izračunali KE/g po postopku opisanem v poglavju 3.3.2.

3.3.10. Statistične metode

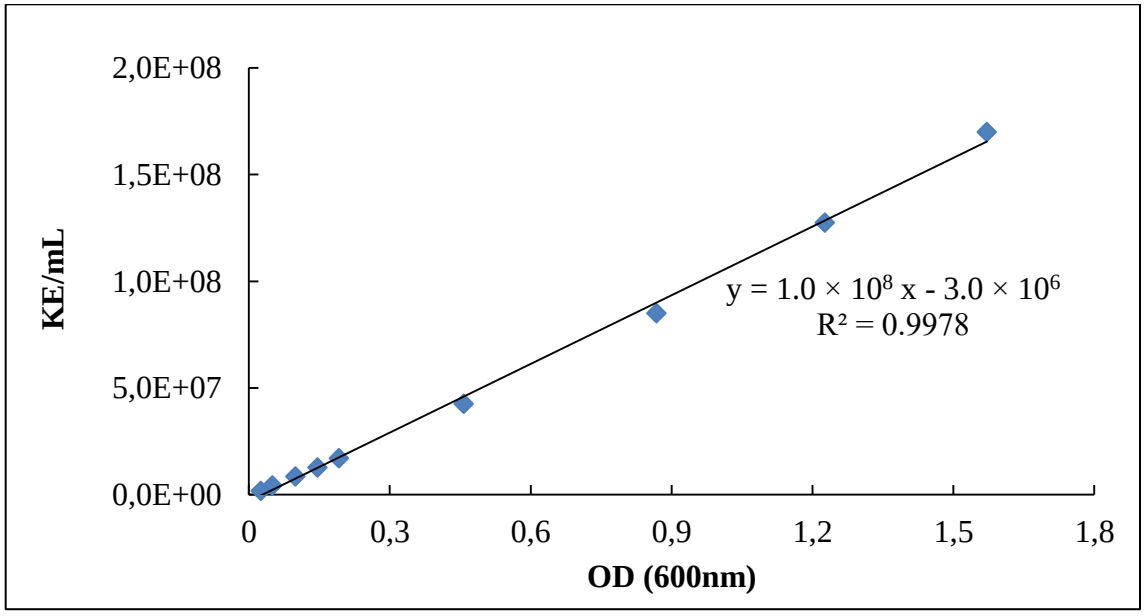
S t-testom za dva neodvisna vzorca smo ugotavljali ali obstaja statistično značilna razlika med povprečno vrednostjo velikosti neobloženih ter obloženih mikrodelcev ter med velikostjo mikrodelcev takoj po izdelavi in velikostjo že liofiliziranih mikrodelcev, resuspendiranih v 0,9 % NaCl. Za statistično in grafično obdelavo je bil uporabljen program Excel (MS Office).

4. REZULTATI in RAZPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA GOJENJA PROBIOTIKOV NAMENJENIH MIKOKAPSULIRANJU

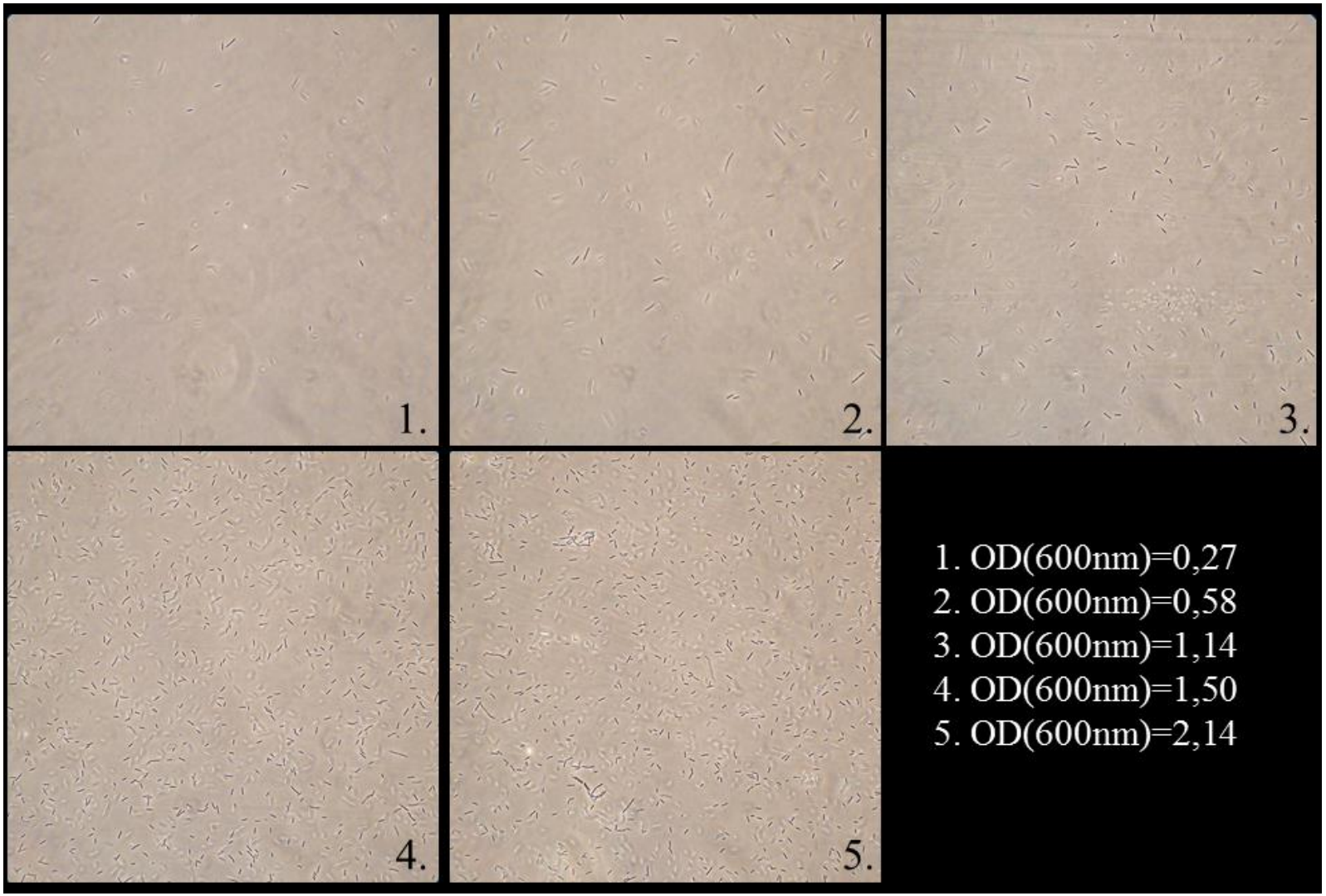
Gojenje probiotikov je specifično in malo opisano. V našem primeru, ko imamo opravka s probiotičnimi celicami 4.1.Z, iz rodu *Bacillus*, izoliranimi iz ust zdravega posameznika, pa je bila ta neznanka še toliko večja. Rast celic lahko spremljamo z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm, prav tako pa lahko posredno določimo število celic oziroma število KE (kolonijske enote) pri določenem OD.

Za določanje točnega števila celic pri določenem OD smo pripravili umeritveno krivuljo, tako da smo suspenzijo celic po 6 h inkubacije redčili, redčitvam izmerili OD ter po 100 µL nanašali na trdno gojišče. Po 24 urni inkubaciji plošč pri 37 °C smo prešteli število kolonij in izračunali KE/mL. Tako smo dobili rezultate, ki nam povedo, kakšno je število celic oz. KE v mililitru suspenzije z določeno optično gostoto (OD) (slika 9).



Slika 9: Odvisnost števila KE/mL enot od optične gostote (OD) pri 600 nm

Iz slike 9 je vidimo, da število KE/mL linearno narašča z višanjem OD, kar smo opisali z linearno enačbo premice: $KE/mL=1.0\times10^{8}OD - 3.0\times10^{6}$ (enačba *2*), ki smo jo kasneje uporabljali za izračun KE/mL pri izmerjenem OD.



Slika 10: Slike 4.1.Z celic pod optičnim mikroskopom (400 × povečava) pri različnih OD (600nm); 1. OD=0,27; 2. OD=0,58; 3. OD=1,14; 4. OD=1,50 in 5. OD=2,14

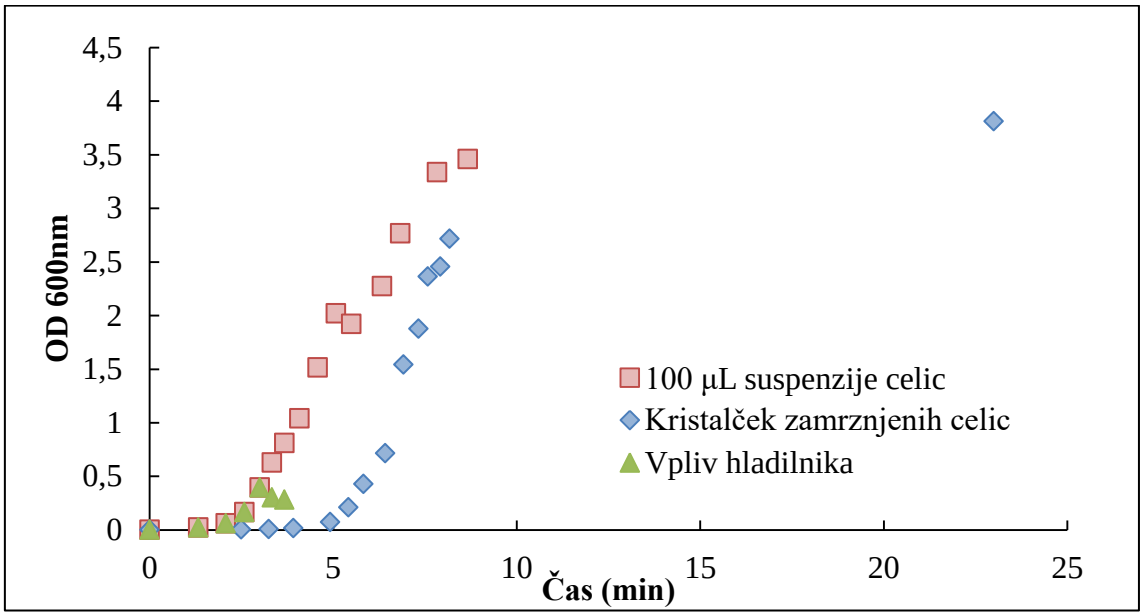
Optimalno gostoto probiotikov za mikrokapsuliranje smo ocenili z opazovanjem celic v suspenzijah z različno OD pod optičnim mikroskopom. Za mikrokapsuliranje je pomembno, da je dovolj celic na prostorninsko enoto, da jih v mikrodelce vgradimo v čim večjem številu, hkrati pa jih ne sme biti preveč, ker lahko agregirajo in tvorijo skupke.
Iz slike 10 je razvidno, da je pri OD do 0,5 celic malo, z večanjem OD pa se njihovo število povečuje. Kot optimalno gostoto suspenzije celic smo ocenili OD med 0,9 in 1,5, kjer je gostota celic v suspenziji dovolj velika, v sredini eksponentne faze rasti, in celice še ne tvorijo skupkov. Pri višjih OD se celice združujejo v skupke (slika 10; 5.). Torej, suspenzija celic z želenim OD med 0,9 in 1,5 ima, izračunano iz enačbe *2*, KE/mL med $8{,}7\times10^{7}$ in $1{,}5\times10^{8}$, kar smo ocenili kot zadostno količino celic za vgrajevanje v mikrodelce.

Zanimalo nas je, kako hitro rastejo celice, če jih nasadimo v 50 mL svežega gojišča iz »aktivne« suspenzije celic (iz kulture, ki se je 14 ur inkubirala na 37 °C) ali iz zamrznjenega vzorca celic iz zamrzovalnika. Rast smo spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm.
Za rast bakterijskih celic je značilna rastna krivulja, ki jo razdelimo v več faz. Prva faza, ki jo imenujemo faza prilagajanja ali lag faza nastopi, ko celice prenesemo v sveže gojišče. Celice se v tej fazi prilagajajo na nove okoljske pogoje, so metabolično aktivne, vendar se ne delijo. Naslednja faza, v kateri celice rastejo in se delijo, se imenuje eksponentna oziroma logaritemska faza. V tej fazi je naklon krivulje največji. Eksponentni fazi sledi stacionarna faza, kjer OD ne narašča več, temveč doseže plato. V tej fazi začne v gojišču primanjkovati hranil, celice zato upočasnijo metabolizem in delitev, v gojišču pa se začno pojavljati tudi odmrle celice (stopnja delitve je enaka stopnji odmiranja celic). Zadnja faza rastne krivulje je faza odmiranja, v kateri se celice niso več sposobne deliti in odmirajo, njihovo število se eksponentno zmanjšuje (44).

Rezultati, prikazani na sliki 11, kažejo, da potrebujejo celice iz »aktivne« suspenzije celic do faze eksponentne rasti 2 uri. V primeru, ko smo v gojišče nasadili zamrznjen vzorec celic iz zamrzovalnika so le-te potrebovale najmanj 2 uri več časa, da so prišle v fazo eksponentne rasti, v primerjavi s celicami, ki so bile gojene direktno iz »že aktivne« suspenzije celic. V obeh primerih je naklon krivulje rasti podoben (slika 11).

Celice iz suspenzije, ki je bila 12 ur pri 37 °C, so že v fazi rasti in se nemoteno delijo naprej, ko jih nasadimo v novo gojišče. Tiste iz zamrzovalnika pri temperaturi -80 °C potrebujejo najprej nekaj časa, da se prilagodijo na nove pogoje okolja ter zato potrebujejo več časa, da dosežejo eksponentno fazo rasti. Ni pomembno le to, ali vzamemo celice iz zamrzovalnika ali iz suspenzije, velik vpliv ima tudi njihovo začetno število. Večje je število celic, ki se nahajajo v kristalčku ali suspenziji, ki jih nasadimo, hitreje bodo celice dosegle eksponentno fazo rasti. Količina celic se namreč po vsaki delitvi podvoji.

Pri preverjanju vpliva temperature na rast 4.1.Z celic je bil OD izmerjen po 12 urnem shranjevanju suspenzije v hladilniku nižji od zadnjega izmerjenega pred shranjevanjem v hladilniku in je tudi po 20 minutah inkubacije na 37 °C padal (slika 11). Celice izpostavljene 8 °C tudi po 4 urah niso zares prešle v eksponentno fazo rasti.
Ti rezultati kažejo na to, da je suspenzija celic 4.1.Z občutljiva na nizko temperaturo (8 °C), saj sploh niso dosegle eksponentne rasti. Tudi po tem, ko smo celice inkubirali na 37 °C, je njihov OD še vedno padal. Iz tega sklepamo, da celice v suspenziji ne preživijo shranjevanja pri temperaturah 4–8 °C. Če bi preživele, bi se pri inkubaciji začele ponovno deliti in bi njihov OD naraščal. Posledično smo vsakič nagojili svežo suspenzijo probiotikov za mikrokapsuliranje s KE/mL med $8{,}7\times10^{7}$ in $1{,}5\times10^{8}$, brez vmesnega shranjevanja v hladilniku.



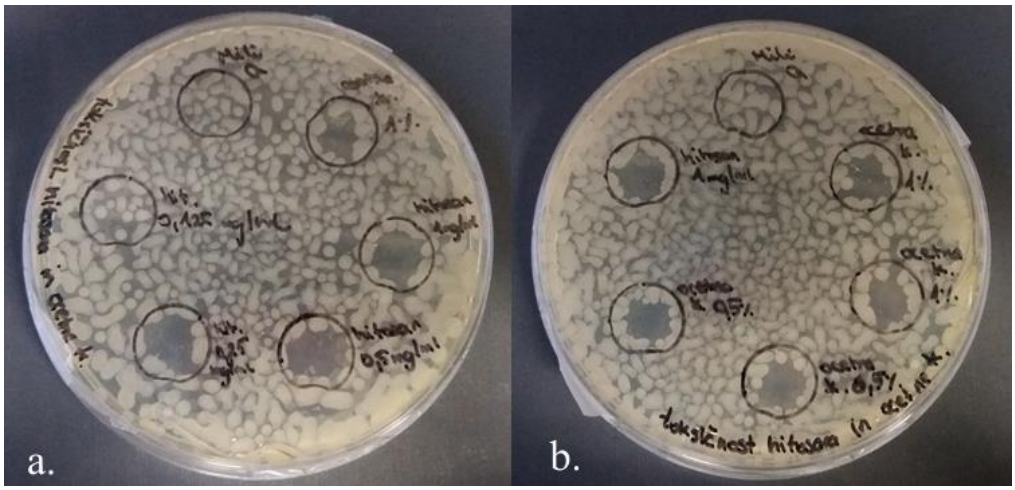
Slika 11: Hitrosti rasti, predstavljena kot optična gostota (OD) probiotikov v gojišču, v odvisnosti od časa inkubacije probiotikov v različnih pogojih: začetna količina ter vpliv shranjevanja suspenzije probiotikov v hladilniku

4.2. VPLIV POMOŽNIH SNOVI NA RAST

Vsako zdravilo mora biti kakovostno, varno in učinkovito. Da je zdravilo varno, ni dovolj le, da je varna učinkovina ali probiotik, varne morajo biti tudi vse dodane pomožne snovi. Za učinkovitost probiotičnega zdravila je bistveno, da ostane probiotik viabilen in učinkovit/aktiven med izdelavo, shranjevanjem in uporabo. V ta namen smo najprej proučili odgovor probiotikov, ki ga povzročijo posamezne pomožne snovi, načrtovane za vgrajevanje v mikrodelce. V našem primeru trehaloza, laktoza, glicerol, alginat in hitosan ne smejo izkazovati toksičnih lastnosti niti za ljudi niti za vgrajene celice. V literaturi smo našli podatke o netoksičnosti alginata, laktoze, glicerola in trehaloze (26, 36). Hitosan v peroralnih in dermalnih pripravkih je za ljudi netoksičen, uporablja se lahko na zdravem in okuženem predelu kože ter je poleg tega tudi biorazgradljiv (26). Za druge primere uporabe hitosana pa so si ti podatki nasprotujoči, zato smo se odločili, da sami preverimo njegovo toksičnost na bakterije 4.1.Z.

4.2.1. Hitosan in preizkušanje njegove toksičnosti

Raztopino za oblaganje smo pripravili z raztapljanjem hitosana v 1 % ocetni kislini, saj se hitosan raztaplja le pri kislem pH, ki zagotovi ioniziranost aminskih skupin. Obstaja možnost, da je za celice toksičen sam hitosan ali pa kisel pH raztopine (pH (hitosan v 1 % ocetni kislini, 1 mg/mL) = 3,07). Da bi to ugotovili, smo na trdno gojišče s 4.1.Z celicami nanašali različne koncentracije raztopine hitosana ter samo 1 % ocetno kislino (slika 12).



Slika 12: Preizkušanje toksičnosti raztopine hitosana v ocetni kislini in ocetne kisline same z nanosi na agarne plošče; a. nanosi v smeri urinega kazalca Milli Q vode, 1 % ocetne kisline ter hitosana v koncentracijah 1, 0,5, 0,25 in 0,125 mg/mL; b. nanosi Milli Q vode, 1 in 0,5 % ocetne kisline v dveh paralelah ter hitosana koncentracije 1 mg/mL (v smeri urinega kazalca)

Pri koncentracijah hitosana 1 mg/mL (1 % ocetna kislina), 0,5 mg/mL (0,5 % ocetna kislina) in 0,25 mg/mL (0,25 % ocetna kislina) na mestu nanosa ni zrasla nobena celična kolonija, pri najnižji koncentraciji (0,125 %) pa so celice prerastle tretirano območje. Prav tako na mestu nanosa 1 in 0,5 % ocetne kisline ni zrasla nobena kolonija. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je ocetna kislina toksična za celice, najverjetneje zaradi nizkega pH. Ne moremo pa tega reči za hitosan. Čeprav celice na mestu nanosa niso zrasle, je razlog za to lahko ocetna kislina in ne sam hitosan. Težava določanja toksičnosti hitosana z izbrano metodo je, da hitosana drugače kot v kislini ne moremo raztopiti in posledično preskusiti njegove toksičnosti brez vpliva nizkega pH.

Kean in Thanou v članku poročata, da pri mikrokapsuliranju celic ledvic mladiča hrčka, pri katerem so uporabili alginat in hitosan (ena plast), kot v našem primeru, niso opazili škodljivih vplivov obloge (45).

Glede na to, da traja oblaganje mikrodelcev z raztopino hitosana relativno kratek čas (10 min), to najverjetneje ni vplivalo na preživetje celic v njih, kljub nizkem pH ocetne kisline, saj smo v nadaljevanju z nanašanjem obloženih mikrodelcev na trdno gojišče dokazali, da so probiotiki v njih živi. Celice ujete v notranjost mikrodelcev so zaščitene z oblogo alginata, zato se je lahko zmanjšalo preživetje le tistih celic, ki so bile neposredno na površini in posledično v stiku z raztopino hitosana. Če tudi je po oblaganju v mikrodelcih nekaj manj preživelih 4.1.Z celic, to ne vpliva na končni učinek, saj zanj niti ni tako pomembno točno število celic, ampak predvsem to, da je celic dovolj, da kolonizirajo obzobni žep.

4.3. VPLIV PROCESNIH PARAMETROV NA LASTNOSTI MIKRODELCEV

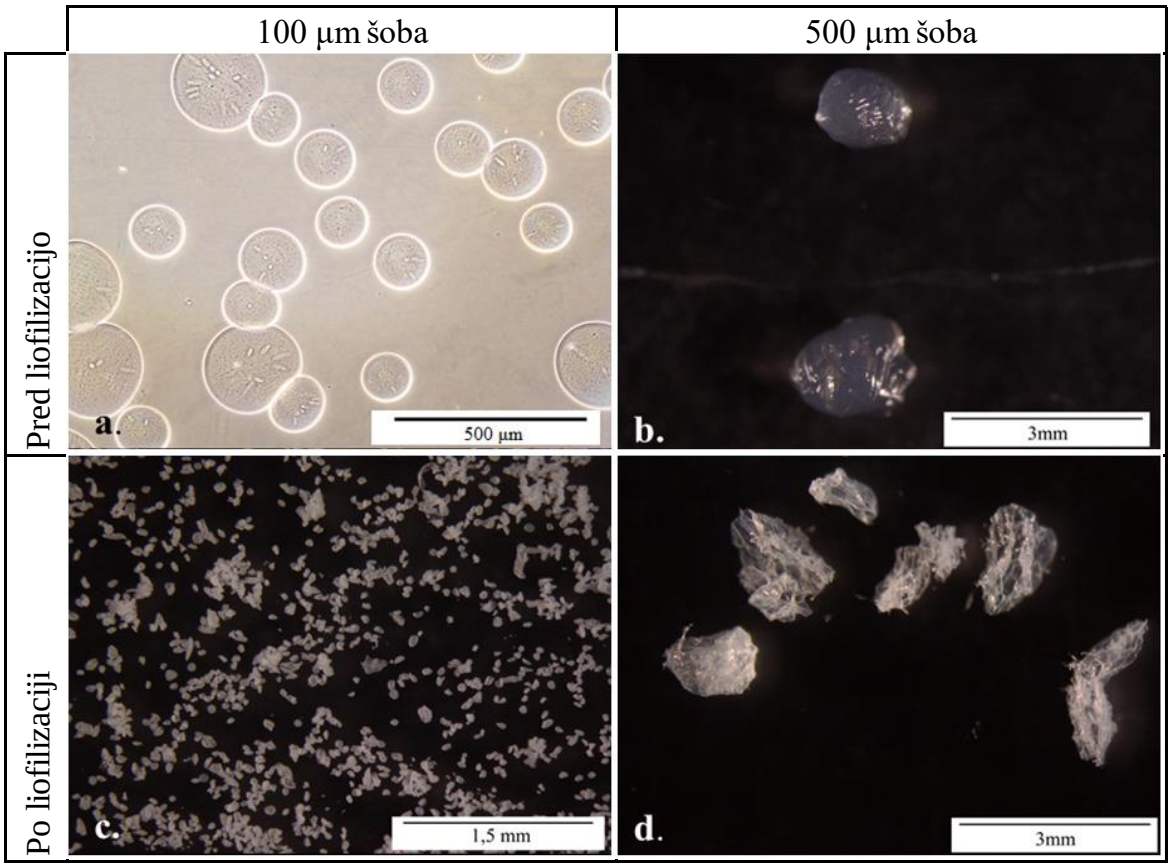
Pri izdelavi mikrodelcev z enkapsulatorjem Inotech IE-50 R lahko na obliko in velikost mikrodelcev vplivamo s spreminjanjem parametrov na sami aparaturi in sicer s frekvenco, nihanjem membrane, amplitudo, električno napetostjo ter velikostjo šobe, kot najpomembnejšimi parametrom. Na končne lastnosti mikrodelcev, pa vplivajo tudi lastnosti raztopine oz. suspenzije, ki jo mikrokapsuliramo, kot so njena viskoznost, gostota ter koncentracija polimera.

4.3.1. Vpliv velikosti šobe

Na samo velikost izdelanih mikrodelcev vpliva predvsem velikost izbrane šobe. Pri izdelavi smo zato vedno vzdrževali enake pogoje (frekvenca 1000 Hz, amplituda 6, napetost 1,50 kV, relativna hitrost pretoka suspenzije 230 za 100 µm šobo in 990 za 500 µm šobo, ki so bili izbrani kot najbolj primerni). Uporabili smo dve različno veliki šobi, 100 µm in 500 µm. V preglednici III so predstavljene velikosti različnih formulacij mikrodelcev izdelanih s tema dvema šobama.

Preglednica III: Velikosti in standardni odkloni velikosti različnih formulacij mikrodelcev

	1. formulacija	**2. formulacija**	**3. formulacija**	**4. formulacija**	**5. formulacija**	**6. formulacija**
Šoba	500 µm	500 µm	500 µm	100 µm	100 µm	100 µm
Velikost MD (µm)	1212	1296	1308	125	143	142
SD (µm)	186	165	289	37	54	43



Slika 13: Primerjava mikrodelcev izdelanih s 100 (sliki a in c) in 500 µm šobo (sliki b in d) pred (sliki a in b) in po liofilizaciji (sliki c in d), (a in c 11. formulacija; b. in d. 2. formulacija; a. optični mikroskop; b., c., d. stereomikroskop)

Velikost mikrodelcev izdelanih s 100 µm šobo so 120–150 µm, tistih s 500 µm pa 1,2–1,4 mm, kar ni popolnoma v skladu s teorijo, da nastanejo 2-krat večji mikrodelci od velikosti šobe (slika 13).

Mikrodelci so po procesu liofilizacije manjši kot takoj po samem mikrokapsuliranju (slika 13), vendar ob stiku s tekočino (npr. 0,9 % NaCl) nabrekajo in pridobijo nazaj svojo prvotno obliko. Zato je smiselno upoštevati mesto končne aplikacije, npr. obzobni žep, in velikost hidratiranih/nabreklih mikrodelcev. Žep pri parodontalni bolezni je običajno velik nekaj mm. Cilj bi bil take mikrodelce aplicirati v obzobni prostor, kjer bi se adherirali in v času razpadli ter sprostili vgrajene probiotike, ki bi delovali lokalno na želenem mestu. V nadaljevanju smo izdelovali mikrodelce le s 100 µm šobo, saj so nastali delci manjši in bi po aplikaciji lažje ostali v obzobnem žepu. Večji mikrodelci lahko zaradi svoje velikosti uidejo iz žepa ali pa jih vanj sploh ne moremo aplicirati in posledično ne dosežemo želenega učinka. Težava je lahko tudi sama aplikacija. Imeti bi morali ustrezno veliko brizgo, da bi mikrodelci večji od 1 mm sploh lahko aplicirali, ne da bi se pri tem brizga zamašila. Hkrati pa brizga ne sme biti prevelika, saj lahko ovira samo aplikacijo.

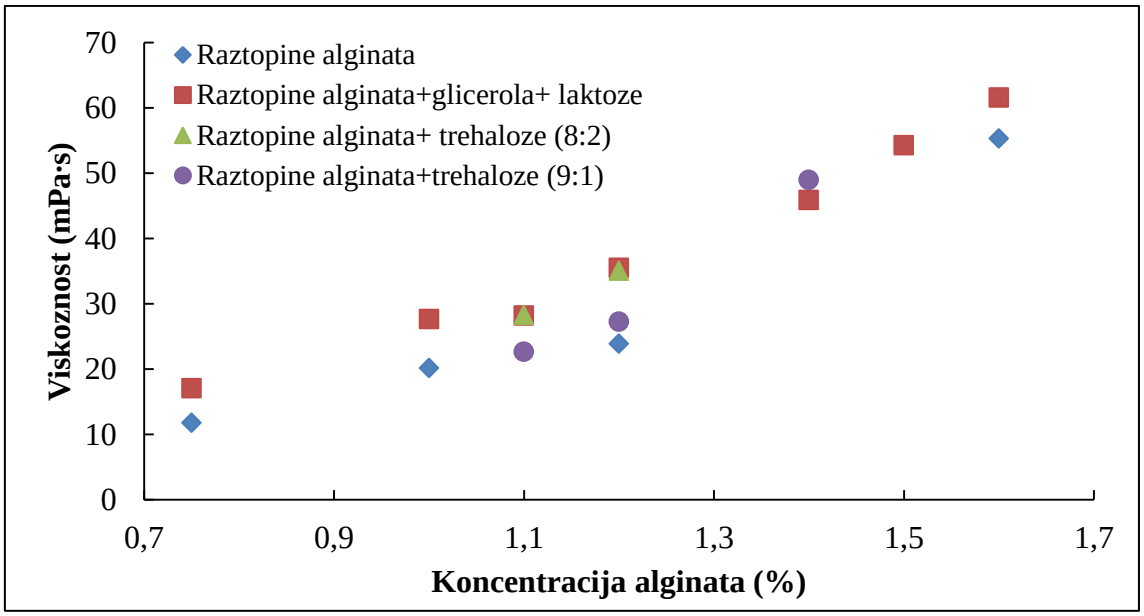
4.3.2. Vpliv viskoznosti raztopin za mikrokapsuliranje

Poleg različnih šob smo za izdelavo mikrodelcev uporabili različne koncentracije alginata in pomožnih snovi v raztopinah, ki predstavljajo ogrodje mikrodelcev.

Najpomembnejša lastnost, ki vpliva na uspešnost procesa, je viskoznost raztopin za mikrokapsuliranje. Viskoznost narašča z naraščajočo koncentracijo alginata ter dodanega polnila in krioprotektanta (slika 14). Viskoznost je odvisna od temperature, zato smo meritve izvajali vedno pri enaki temperaturi (24 ± 1 °C).

Viskoznost linearno narašča z naraščajočo koncentracijo alginata, od 11,8 mPa·s pri 0,75 % raztopini samega alginata do 55,3 mPa·s pri 1,6 % raztopini. Prav tako linearno narašča pri raztopinah alginata z enakim dodatkom glicerola in laktoze (podobno pri dodatku trehaloze) od 17,1 mPa·s pri 0,75 % raztopini alginata do 61,6 mPa·s pri 1,6 %. Viskoznosti teh raztopin z dodatkom polnila ali krioprotektanta so višje od viskoznosti raztopine samega alginata prav zaradi dodanih snovi, ki dodatno povečajo viskoznost. To opazimo tudi pri raztopinah alginata in trehaloze, kjer je viskoznost raztopine alginata z 1 delom dodane trehaloze manjša od viskoznosti raztopine z enako koncentracijo alginata in

z dvema deloma trehaloze (pri 1,1 % raztopini alginata in 1 delu trehaloze je 22,7 mPa·s, pri 2 delih trehaloze pa 28,3 mPa·s).



Slika 14: Viskoznost raztopin alginata brez ali z dodatki glicerola, laktoze ali trehaloze v odvisnosti od koncentracije

Z naraščajočo koncentracijo alginata in viskoznostjo so nastali mikrodelci bolj okrogle oblike. Mikrodelci izdelani iz raztopin z nižjo viskoznostjo so ohranili obliko kapljic; na sliki, pridobljeni z optičnim mikroskopom, je viden repek (slika 15). Proces mikrokapsuliranja z uporabljeno metodo pa ne omogoča enkapsuliranja zelo viskoznih raztopin, ki so povzročale nekonstanten pretok skozi šobo ter pogosto mašenje. V takem primeru je bilo potrebno šobo večkrat očistiti, kar je zahtevalo dodaten čas in večjo možnost mikrobiološke kontaminacije. Pri formulacijah izdelanih iz alginata, glicerola in laktoze ter šobo 500 µm je najvišja koncentracija, pri kateri se šoba še ni mašila pri 0,75 % alginata. Pri enaki sestavi s 100 µm šobo je ta koncentracija 1,5 %. Večje težave z mašenjem šobe smo imeli pri formulacijah s trehalozo. Pri 100 µm šobi in razmerju med raztopino alginata in trehalozo 8:2, se je šoba mašila že pri 1,2 % alginatu. Zato smo zmanjšali razmerje in dodali trehalozo v razmerju 9:1. Kljub temu se je pri koncentraciji 1,2 % šoba mašila, čeprav je viskoznost nižja kot pri enaki koncentraciji alginata z dodatkom glicerola in laktoze, pri kateri nismo imeli težav. Težave tako pripisujemo sami trehalozi. Čeprav je po strukturi trehaloza disaharid, enako kot laktoza, in je njena topnost glede na literaturo v vodi celo večja od topnosti laktoze, se je v našem primeru izkazala za neustrezno, kar bi lahko bila posledica tvorbe drugačnih povezav s topilom – vodo, ki

vplivajo na samo strukturo vode. Trehaloza namreč v primerjavi z drugimi disaharidi raje tvori vodikove vezi z molekulami vode kot z drugimi molekulami trehaloze. Poleg tega zaradi večje konformacijske fleksibilnost, v primerjavi s podobnimi sladkorji, tvori manj intramolekularnih vezi in ima zato na voljo več prostih skupin za tvorbo vezi z molekulami vode. Trehaloza na ta način prekinja tetrahedralno mrežo molekul vode, tako so molekule vode prisiljene, da se preorientirajo glede na hidroksilne skupine, ki jih vsebuje trehaloza. Vse to je razlog, da trehaloza bolj upočasni dinamiko vode kot ostali disaharidi (46).

Zaradi težav pri mikrokapsuliranju raztopin s trehalozo in nobene zaznane prednosti v primerjavi z glicerolom in laktozo, smo se odločili za izdelavo večjih količin mikrodelcev, ki smo jih potrebovali za izvedbo študij stabilnosti, v sestavi raztopine alginata, glicerola in laktoze, to so formulacije, označene s številkami 19–21 (preglednica II).

Slika 15: Mikrodelci z ″ repkom″ izdelane z nižjimi koncentracijami alginata (0,75 %), 100 µm šoba (optični mikroskop, 400 × povečava)

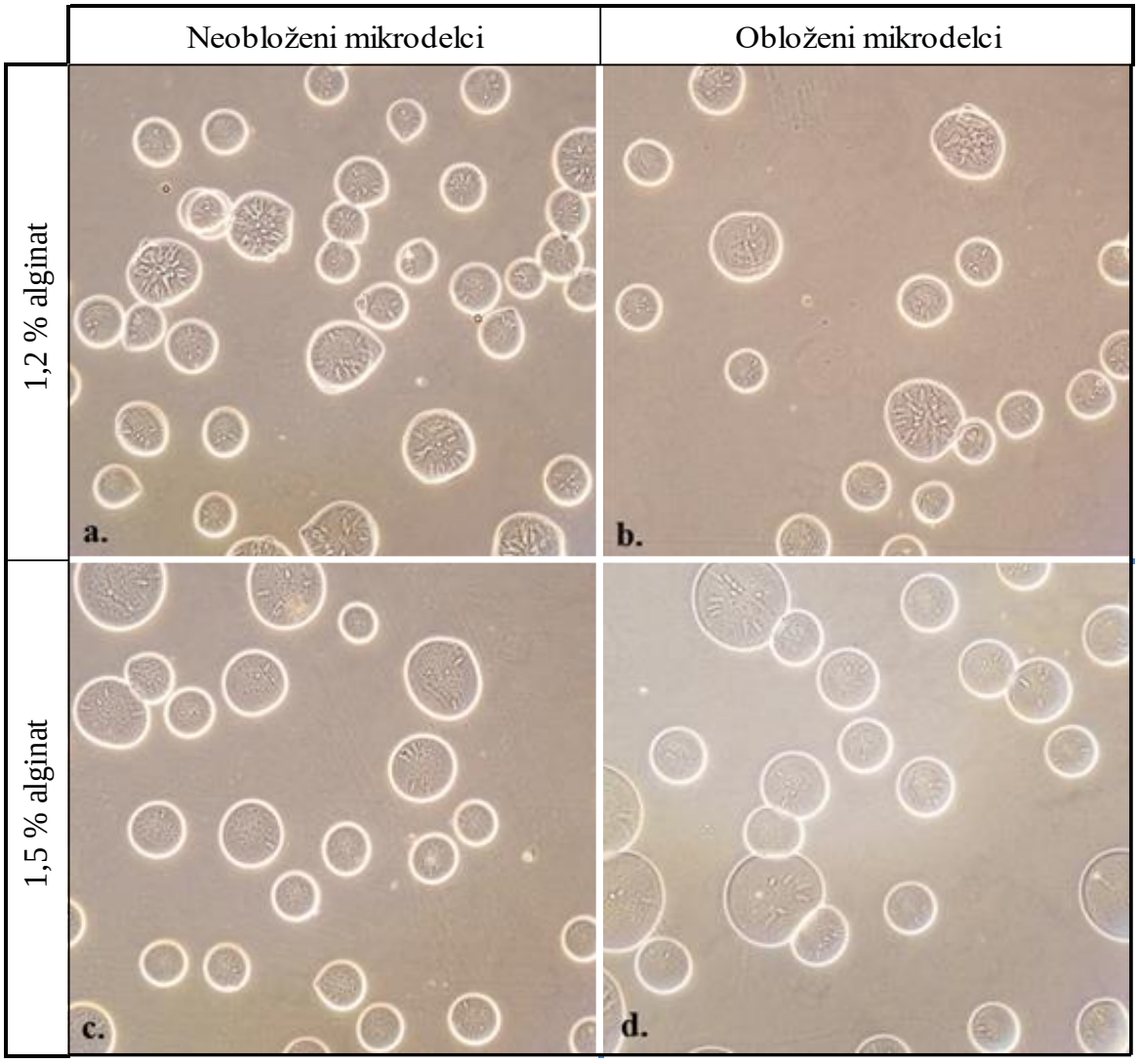
4.4. VELIKOST IN MORFOLOGIJA MIKRODELCEV

Obliko in velikost mikrodelcev, izdelanih, liofiliziranih in redispergiranih, smo ocenili z optičnim in stereomikroskopom. Mikrodelce smo preučevali takoj po izdelavi, po liofilizaciji ter po ponovnem redispergiranju v mediju za dostavo mikrodelcev. Oblika in velikost liofiliziranih mikrodelcev, je pomembna lastnost, ki lahko vpliva na pretočne lastnosti praška proizvedenih mikrodelcev in posledično na enostavnost nadaljnje obravnave izdelanega praška. Velikost redispergiranih mikrodelcev pa igra vlogo predvsem pri končni aplikaciji, kjer lahko vpliva na samo uspešnost dostave zdravila s probiotikom.

4.4.1. Velikost mikrodelcev

a) Velikost pred liofilizacijo

Takoj po mikrokapsuliranju, oblaganju in spiranju (slika 16) smo mikrodelce slikali in s pomočjo programa ImageJ izmerili njihovo velikost ter primerjali različne formulacije med seboj. Rezultati meritev velikosti so predstavljeni v preglednici IV.



Slika 16: Slike mikrodelcev pod optičnim mikroskopom pri 100 × povečavi; a. 10. formulacija, b. 11. formulacija, c. 19. formulacija, d. 20. formulacija

Preglednica IV: Povprečna velikost mikrodelcev različnih formulacij, izdelanih s 100 µm šobo pred zamrzovanjem in liofilizacijo ter dolžina, širina mikrodelcev in razmerje med njima po liofilizaciji

Formulacija	Velikost MD pred liofilizacijo (µm)	SD (µm)	Dolžina MD po liofilizaciji (µm)	Širina MD po liofilizaciji (µm)	Razmerje širina/dolžina MD po liofilizaciji
4.	125	37	81	41	1,97
5.	143	54	98	44	2,24
6.	142	43	84	45	1,86
7.	135	36	96	51	1,86
8.	139	35	80	44	1,82
9.	141	27	98	56	1,73
10.	124	42	90	60	1,49
11.	130	35	84	51	1,64
12.	148	35	105	68	1,55
13.	142	48	99	59	1,67
14.	144	32	84	49	1,73
15.	142	48	90	51	1,75
16.	148	34	108	74	1,47
17.	145	31	80	51	1,58
18.	149	40	96	59	1,63
19.	148	44	77	58	1,31
20.	127	36	84	59	1,41
21	136	29	93	73	1,28
22.	152	43	93	68	1,38

*MD, mikrodelci

Velikost med nekaterimi formulacijami pred zamrzovanjem in liofilizacijo se razlikuje tudi za 30 µm, opazimo trend naraščanja velikosti z naraščajočo koncentracijo alginata, od 125 µm pri mikrodelcih izdelanih z 1,1 % raztopino alginata do 150 µm z 1,6 % raztopino. Vendar je standardni odklon velik, zato to naraščanje ni signifikantno. Signifikantna razlika se pojavi pri nekaterih formulacijah neobloženih in obloženih mikrodelcev, izdelanih z enako koncentracijo alginata in pomožnih snovi, kar smo potrdili s t testom za dva neodvisna vzorca. Postavljena hipoteza, ki pravi, da so med neobloženimi in obloženimi mikrodelci enake koncentracije alginata in pomožnih snovi, statistično značilne razlike v velikosti takoj po izdelavi, se je izkazala za resnično v primeru formulacij 19 in 20 (1,5 % alginat) z vrednostjo $P < 0,05$. Pri primerjavi 10. in 11. formulacije, ki se od formulacij 19 in 20 razlikujeta le po nižji koncentraciji alginata (1,2 %), pa je vrednost P >

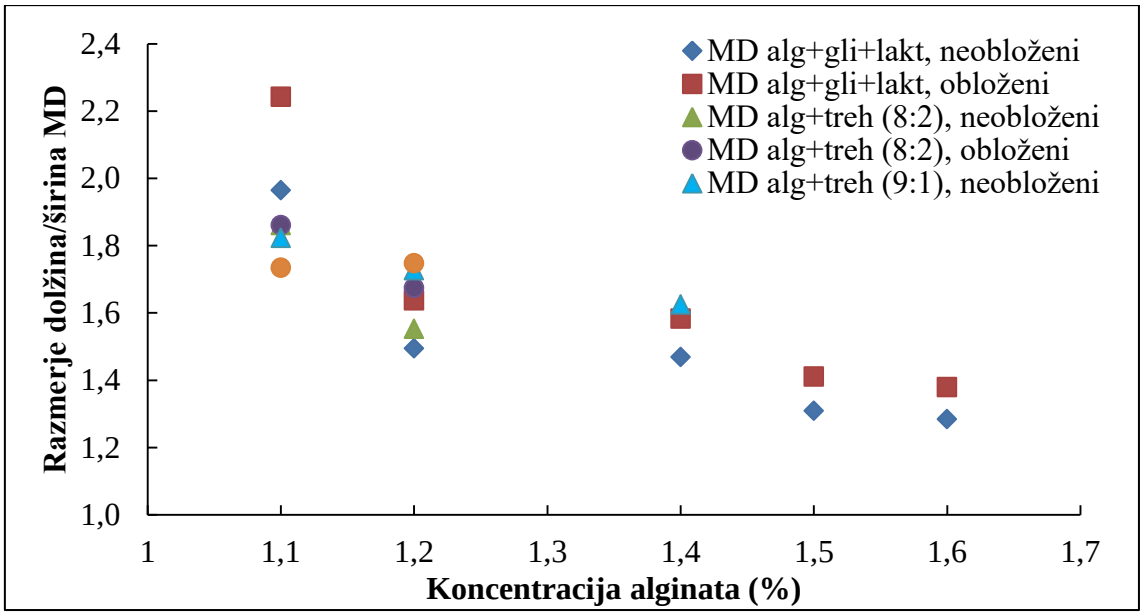
0,05, kar pomeni, da med tema formulacijama ni statistično značilnih razlik v velikosti mikrodelcev takoj po izdelavi.

Kot vidimo, so med nekaterimi neobloženimi in obloženimi mikrodelci enake koncentracije alginata in pomožnih snovi statistično značilne razlike v velikosti takoj po izdelavi, med nekaterimi pa teh razlik ni. Celokupno gledano nismo zaznali statistično značilne razlike v velikosti med obloženimi in neobloženimi mikrodelci. To lahko razložimo s samo naravo oblog, ki se tvorijo s polielektrolitnim kompleksiranjem. Tu gre pravzaprav za premreženje površinskih verig alginata s posameznimi verigami prostega hitosana, ki vodi do tvorbe obloge nanometrskih velikosti. Tako lahko zaključimo, da samo oblaganje nima pomembnega vpliva na velikost mikrodelcev, ampak na druge lastnosti opisane v nadaljevanju.

b) Velikost po liofilizaciji

Liofilizacijo lahko uporabljamo za povečanje stabilnosti, že izdelanega dostavnega sistema, kot so naši mikrodelci s probiotiki, saj na ta način odstranimo od 95 % do 99,5 % vode. Brez procesa liofilizacije bi celice v mikrodelcih ostale aktivne, se delile, porabljale hranila, dokler bi bila na voljo, in nato odmrle. Tako v končni formulaciji ne bi imeli živih probiotikov, s katerimi želimo doseči učinek. Raziskovalci poročajo, da z liofilizacijo lahko zagotovimo preživetje celic tudi do 30 let, odvisno od njihove vrste (47–49).

Po liofilzaciji so mikrodelci zaradi izgube vode, ki predstavlja velik delež mikrodelcev, manjši kot pred njo. Poleg velikosti pa se spremeni tudi njihova oblika, mikrodelci niso več okrogli, pač pa podolgovati. Oblika je bolj podrobno predstavljena v poglavju 4.4.2. in na sliki 22. Bolj kot sama oblika je za nas pomembna velikost mikrodelcev, saj želimo da so dovolj majhni za aplikacijo v obzobni žep. Liofiliziranim mikrodelcem smo izmerili dolžino in širino (preglednica IV) ter rezultate predstavili kot razmerje med njima (slika 17).



Slika 17: Odvisnost razmerja dolžina/širina mikrodelcev od koncentracije alginata (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; treh, trehaloza; MD, mikrodelci)

Razmerje med dolžino in širino liofiliziranih mikrodelcev pada z naraščajočo koncentracijo alginata, kar pomeni, da so tisti z nižjimi koncentracijami bolj podolgovati od tistih z višjimi. Bližje kot je to razmerje 1 bolj so namreč mikrodelci okrogli. Pri vrednosti 1 je dolžina enaka širini in mikrodelec je okrogel.

Pri liofilizaciji voda sublimira in ostanejo le suhe snovi. Mikrodelci, ki vsebujejo višjo koncentracijo alginata, imajo v svoji strukturi več trdnih snovi in manjši delež vode v primerjavi s tistimi z nižjo koncentracijo alginata, zato po sušenju bolj ohranijo prvotno obliko.

Tako opazimo, da sama koncentracija alginata nima signifikantnega vpliva na velikost izdelanih mikrodelcev, je pa bistvena, pri doseganju ustrezne oblike liofiliziranih mikrodelcev, kar je potem pomembno pri nadaljnji obdelavi v končno farmacevtsko obliko.

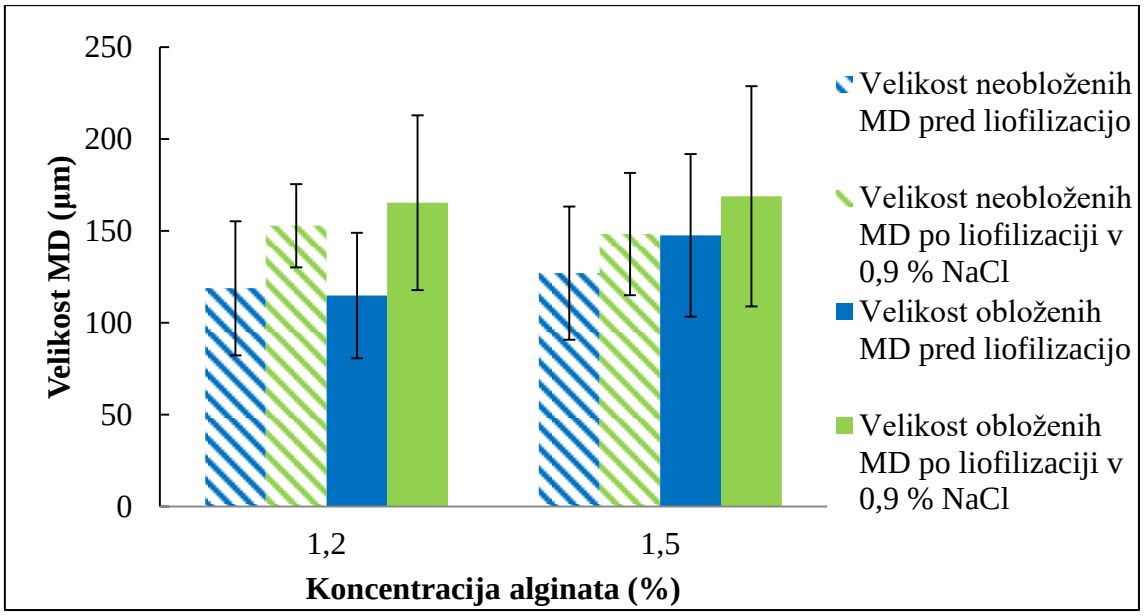
c) Velikost liofiliziranih mikrodelcev resuspendiranih v 0,9 % NaCl

Pred samo uporabo liofiliziranih mikrodelcev bi jih tik pred aplikacijo resuspendirali v ustreznem volumnu medija (prečiščena voda ali 0,9 % NaCl), ter nato s pomočjo brizge vbrizgali v parodontalni žep. Preverili smo njihovo velikost in obliko po redispergiranju v mediju (0,9 % NaCl) in ugotovili, da je oblika odvisna od dodanega volumna fiziološke raztopine (slika 18).

Slika 18: Oblika liofiliziranih mikrodelcev po dodatku različnih volumnov 0,9 % NaCl (1. formulacija); a. 200 µL 0,9 % NaCl; b. 500 µL 0,9 % NaCl; c. 1000 µL 0,9 % NaCl (optični mikroskop, 400 × povečava)

Ko dodamo 10 mg liofiliziranih mikrodelcev 200 µL fiziološke raztopine, ostane njihova oblika podobna obliki brez dodane raztopine – podolgovata. Iz mikrodelcev smo namreč z liofilizacijo odstranili vso vodo, zato potrebujejo dovolj tekočine, da pridobijo nazaj svojo prvotno obliko, ki pa je ob tako majhnem dodanem volumnu disperznega medija ne pridobi. Ko smo dodali 500 µL so mikrodelci že nekoliko večje in bolj okrogle oblike. Popolnoma pa dobijo nazaj obliko, ki so jo imeli pred liofilizacijo, že v 1 minuti po dodatku 1 mL 0,9 % raztopine NaCl. Zato je pomembno, da bi pred aplikacijo mikrodelcev v obzobni žep le-te resuspendirali v zadostnem volumnu fiziološke raztopine. Tako bi zagotovili, da mikrodelci nabreknejo, nato v žepu razpadejo in v tem procesu sprostijo vgrajene probiotične bakterije. Fiziološko raztopino bi uporabili zaradi vgrajenih probiotikov, ki se boljše odzivajo na izotonično okolje, kot pa hipotonično, ki bi ga imeli v primeru prečiščene vode.

Pri primerjavi velikosti mikrodelcev takoj po mikrokapsuliranju z velikostjo liofiliziranih v 0,9 % raztopini, opazimo, da so te mogoče malenkost večje od tistih takoj po izdelavi (slika 19), vendar ta razlika ni statistično značilna.



Slika 19: Velikost mikrodelcev pred liofilizacijo ter po liofilizaciji in rehidrataciji v 0,9 % raztopini NaCl za 10., 11., 19. in 20. formulacijo (MD, mikrodelci)

d) Hidrodinamski premer liofiliziranih mikrodelcev redispergiranih v prečiščeni vodi

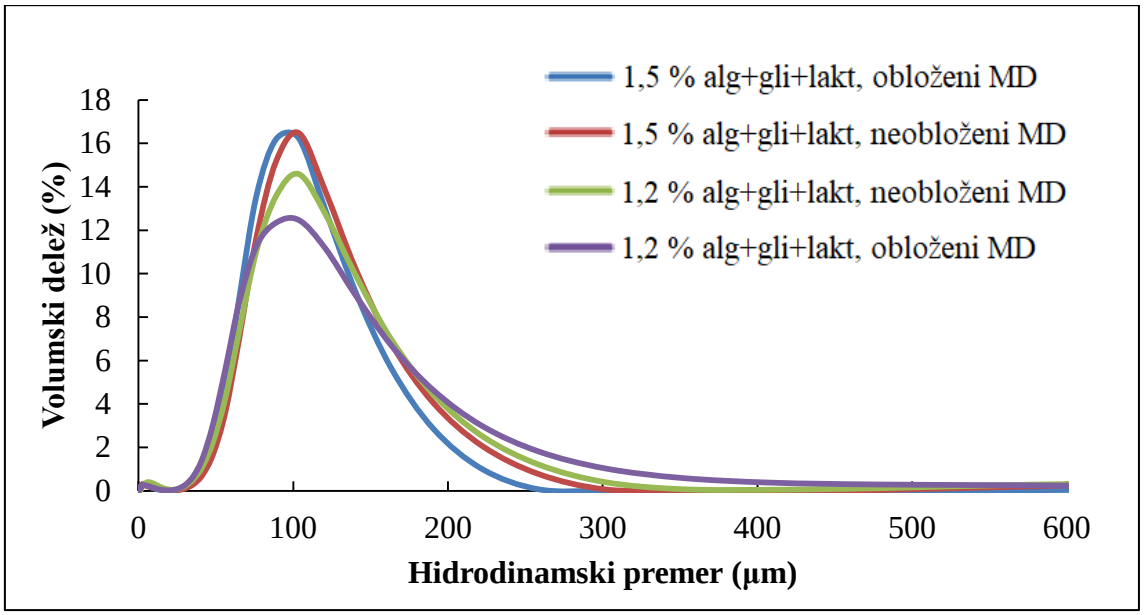
Liofiliziranim mikrodelcem smo velikost izmerili tudi z napravo Mastersizer, s katero ugotavljamo hidrodinamski premer mikrodelcev, to je premer krogle z enakim volumnom kot merjeni delec, ki se v mediju giblje na enak način kot merjeni delec, zato ne moremo direktno primerjati teh velikosti s tistimi določenimi z mikroskopijo. Poleg tega smo z Mastersizer-jem merili velikost v vodi, kjer so suhi liofilizirani mikrodelci ob stiku s tekočino nabrekli in je zato njihova velikost večja od velikosti mikrodelcev, merjenih na zraku.

Iz preglednice V vidimo, da je mediana hidrodinamskega premera neobloženih mikrodelcev nekoliko večja od mediane obloženih. To se vidi tudi na sliki 20, kjer sta vrhova neobloženih mikrodelcev pomaknjena nekoliko v desno v primerjavi z vrhovoma obloženih. Razlog je lahko ta, da obloženi, zaradi hitosanske obloge ob stiku z vodo ne nabreknejo do enake mere kot neobloženi in posledično se tudi njihov premer v vodi ne zveča toliko kot se zveča premer neobloženih. Ne glede na vzrok, pa je razlika zanemarljiva.

Preglednica V: Hidrodinamski premer mikrodelcev različnih formulacij v prečiščeni vodi, meritve na Mastersizer-ju

Formulacija	**10**	**11**	**19**	**20**
Sestava	1,2 % alg+gli+lakt, neobloženi	1,2 % alg+gli+lakt, obloženi	1,5 % alg+gli+lakt, neobloženi	1,5 % alg+gli+lakt, obloženi
Hidrodinamski premer MD – mediana (µm)	92,9	91,3	94,1	88,4
RSD (%)	1,1	0,9	1,4	0,9

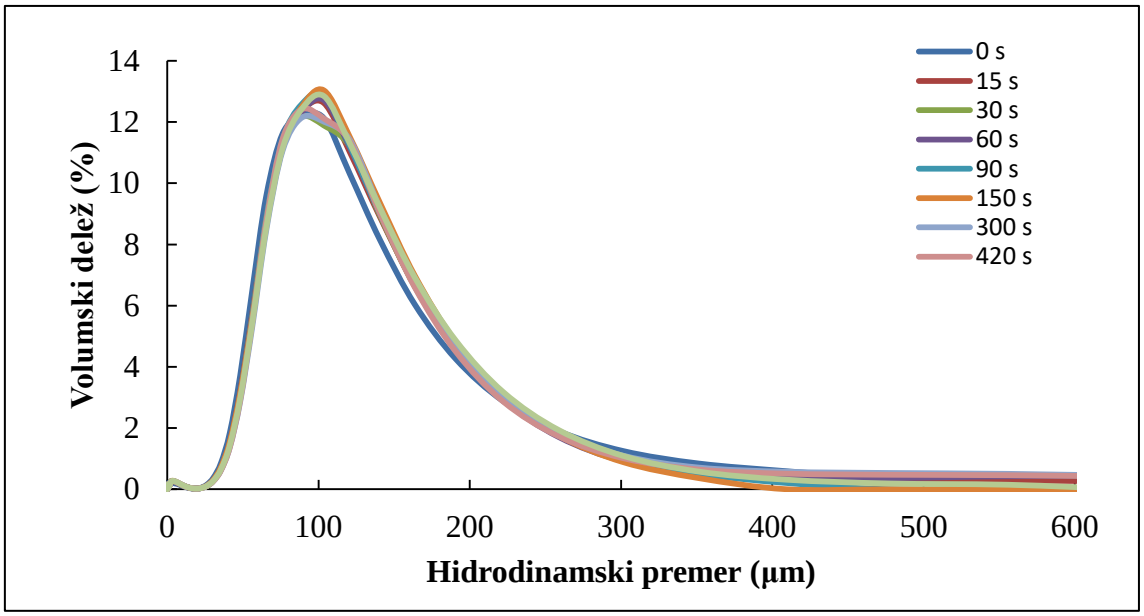
*****alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; MD mikrodelci



Slika 20: Odvisnost volumskega deleža mikrodelcev od njihovega hidrodinamskega premera za različne formulacije (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza)

Ob stiku s prečiščeno vodo, mikrodelci takoj nabreknejo, kar vidimo na sliki 21. Slika namreč prikazuje odvisnost volumskega deleža mikrodelcev (11. formulacija) od njihovega hidrodinamskega premera v različnih časovnih točkah hidratacije. Vsaka krivulja predstavlja drugo časovno točko in kot vidimo, se krivulje med seboj prekrivajo, kar pomeni, da se mikrodelcem hidrodinamski premer skozi čas ni povečeval in so nabrekli v hipu ob stiku z vodo. V primeru aplikacije mikrodelcev s 4.1.Z probiotiki v obzobni žep bi bilo zato najbolje, da bi mikrodelce redispergirali v tekočini (0,9 % NaCl) tik pred samo aplikacijo. Na ta način namreč ohranimo stabilnost/preživetje celic v liofiliziranih mikrodelcih, delci pa najverjetneje zaradi svoje higroskopnosti pridobijo nazaj volumen in

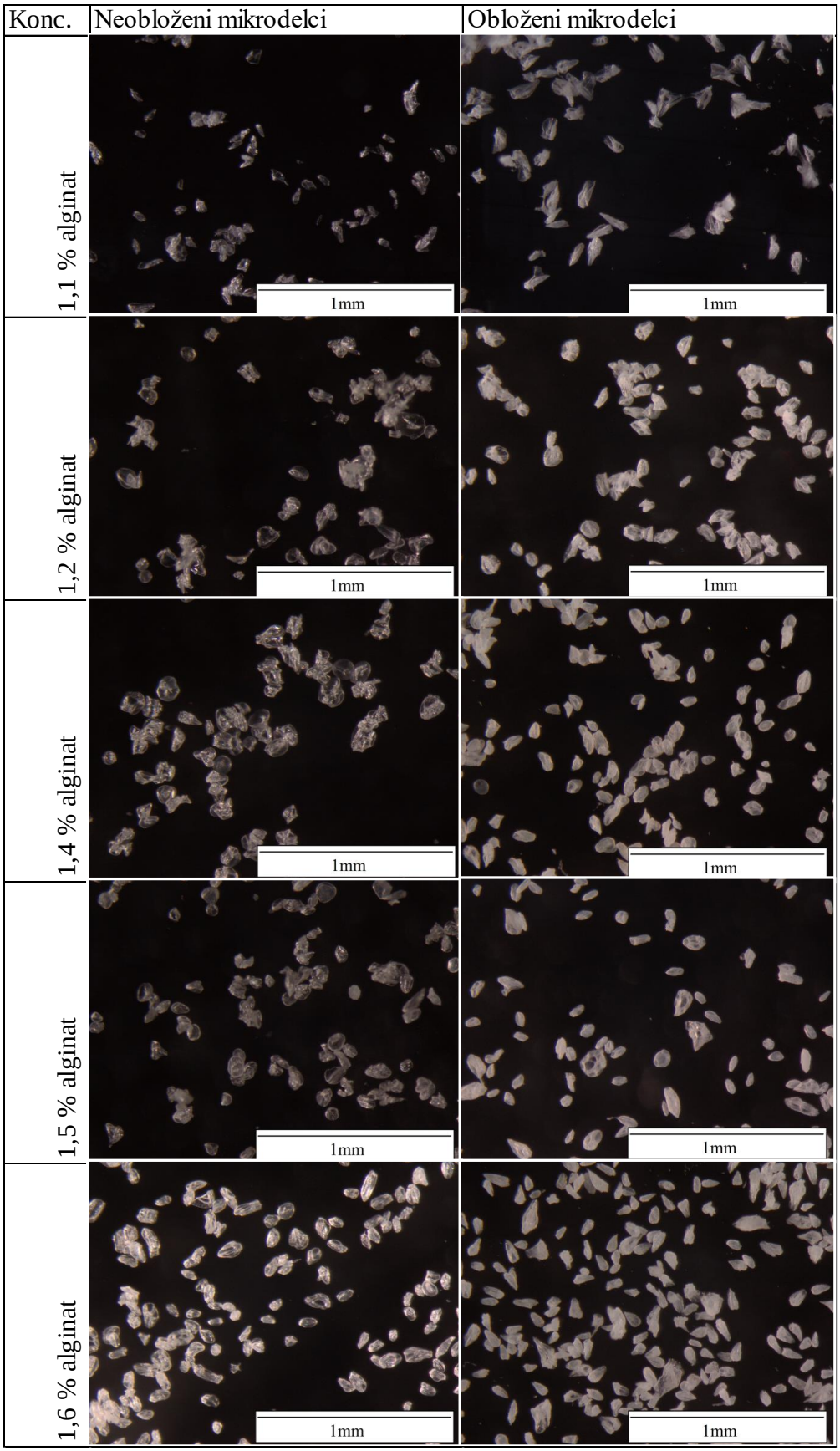
obliko, ki so jo imeli pred liofilizacijo, takoj ob stiku s tekočino in so takoj primerni za aplikacijo.



Slika 21: Odvisnost volumskega deleža mikrodelcev (11. formulacija) od njihovega hidrodinamskega premera v različnih časovnih točkah merjenja le-tega z Mastersizer-jem

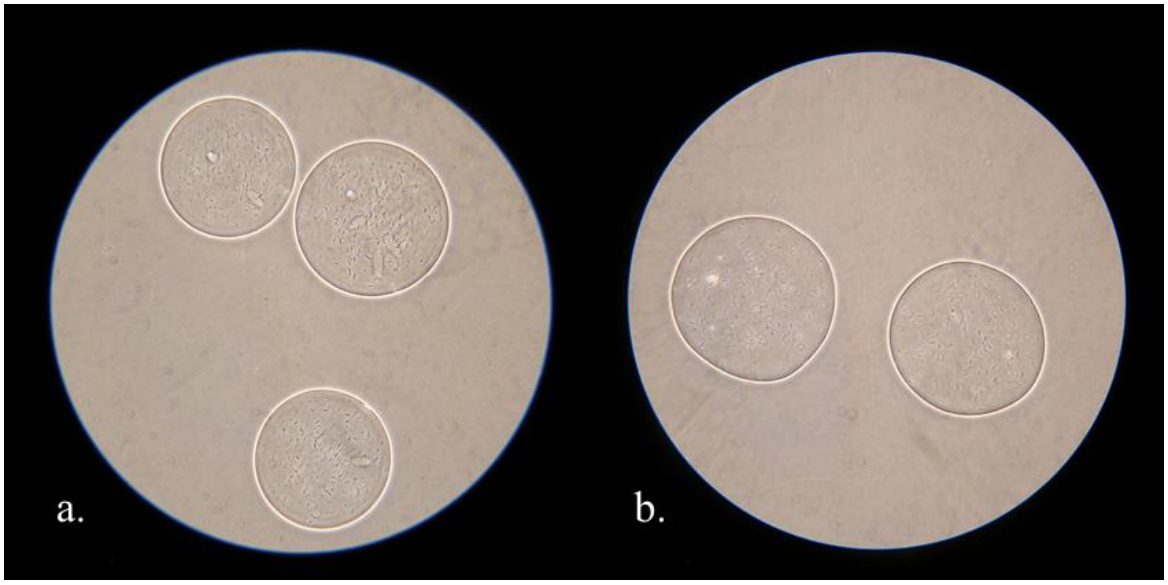
4.4.2. Morfologija mikrodelcev

Oblika mikrodelcev se razlikuje med formulacijami že takoj po mikrokapsuliranju, še bolj pa je ta razlika očitna pri liofiliziranih mikrodelcih. Tisti z nižjimi koncentracijami alginata so po sušenju bolj nepravilnih, ploščatih oblik od tistih z višjimi koncentracijami. Pri uporabljenih nižjih koncentracijah alginata v primerjavi z višjimi, je v mikrodelcih takoj po izdelavi manj alginata in več vode, ki se pri sušenju izgubi. Zato tudi mikrodelci izgubijo okroglo obliko in postanejo igličasti. Ravno obratno je pri višjih koncentracijah, vendar so tudi ti mikrodelci še vedno podolgovate oblike (slika 22). Bolj kot so mikrodelci, nepravilnih oblik, slabše so njihove pretočne lastnosti in posledično je industrijska proizvodnja zahtevnejša, kot poročajo raziskovalci (50).



Slika 22: Različne formulacije (4., 5., 10., 11., 16., 17., 19., 20., 21. in 22.) liofiliziranih mikrodelcev v sestavi alginat, glicerol in laktoza pod stereomikroskopom

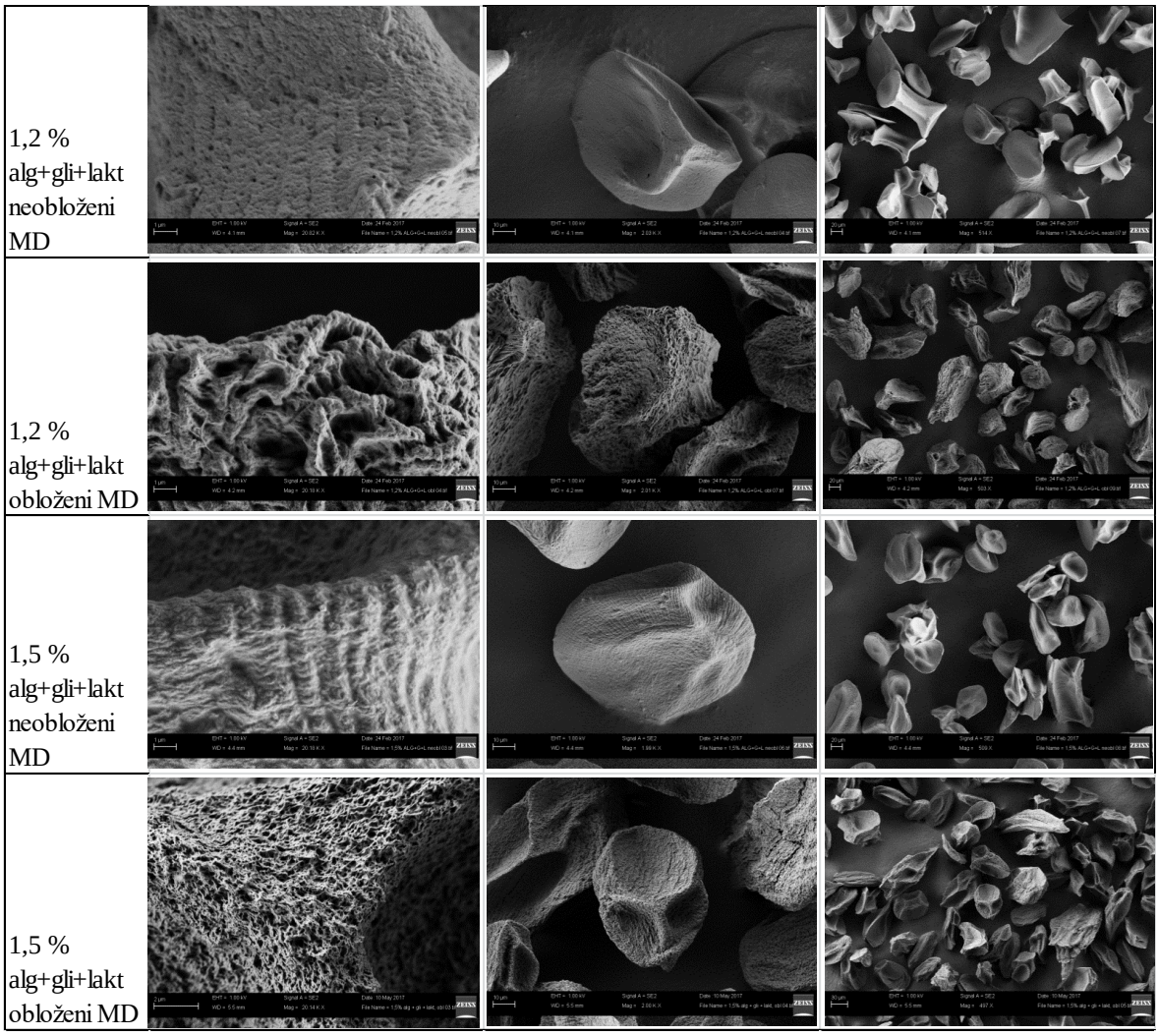
Takoj po mikrokapsuliranju so mikrodelci z nižjimi koncentracijami alginata bolj kapljičastih oblik, vendar pa razlika med različnimi koncentracijami ni tako velika kot po liofilizaciji. Na sliki 23 vidimo, da po resuspendiranju liofiliziranih mikrodelcev v 0,9 % NaCl pridobijo nazaj obliko, ki so jo imeli pred liofilizacijo.
Med neobloženimi in obloženimi mikrodelci, pri enaki sestavi formulacije, v obliki ni pomembne razlike.



Slika 23: 20. formulacija; a. mikrodelci pred liofilizacijo v vodi; b. mikrodelci po liofilizaciji redispergirani v 0,9 % NaCl (optični mikroskop, 400 × povečava)

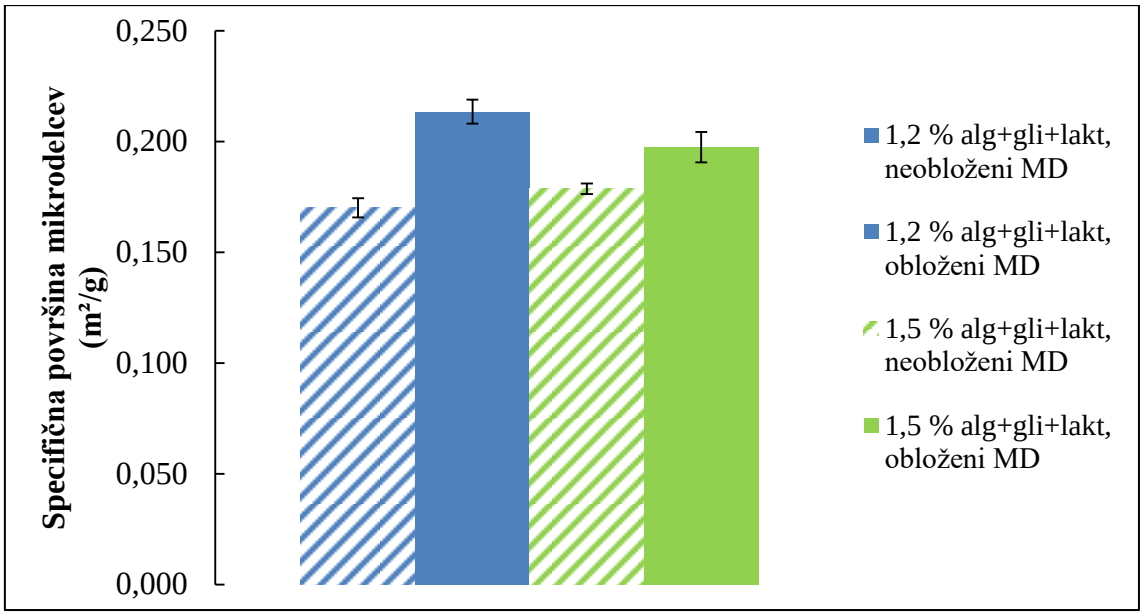
Pri opazovanju pod stereomikroskopom smo mikrodelce lahko opazovali le pod 90 × povečavo, zato si nismo mogli natančno pogledati površine in morfologije. Kot vidimo na sliki 22 je edina razlika v površini mikrodelcev ta, da so obložene bolj »mat« barve od neobloženih. Zato smo mikrodelce pogledali še pod elektronskim vrstičnim mikroskopom (SEM). Tako smo bolj natančno videli razlike v morfologiji med različnimi formulacijami mikrodelcev.

Na sliki 24 vidimo, da je največja razlika v morfologiji mikrodelcev med neobloženimi in obloženimi s hitosansko oblogo. Površina obloženih je namreč veliko bolj nagubana kot pri neobloženih. Medtem ko med formulacijami brez obloge in z uporabljenimi različnimi koncentracijami alginata v morfologiji ni razlik. Enako velja tudi za obložene mikrodelce.



Slika 24: Slike z vrstičnega elektronskega mikroskopa različnih formulacij mikrodelcev pri različnih povečavah, od leve proti desni: 20 000 ×, 2 000 × in 500 × povečava (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; MD, mikrodelci)

Razlike v površini mikrodelcev brez in z oblogo, smo potrdili tudi z meritvami na Mastersizer-ju, ki nam poleg hidrodinamskega premera poda tudi približno vrednost specifične površine delcev, ki je definirana kot površina na enoto mase (m^2/g). Specifična površina neobloženih mikrodelcev je približno 0,17 m^2/g, obloženih pa 0,2 m^2/g (slika 25), torej z oblogo mikrodelcev vplivamo predvsem na njihovo specifično površino.



Slika 25: Primerjava specifičnih površin različnih mikrodelcev (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; treh, trehaloza; MD, mikrodelci)

4.4.3. Zeta potencial mikrodelcev

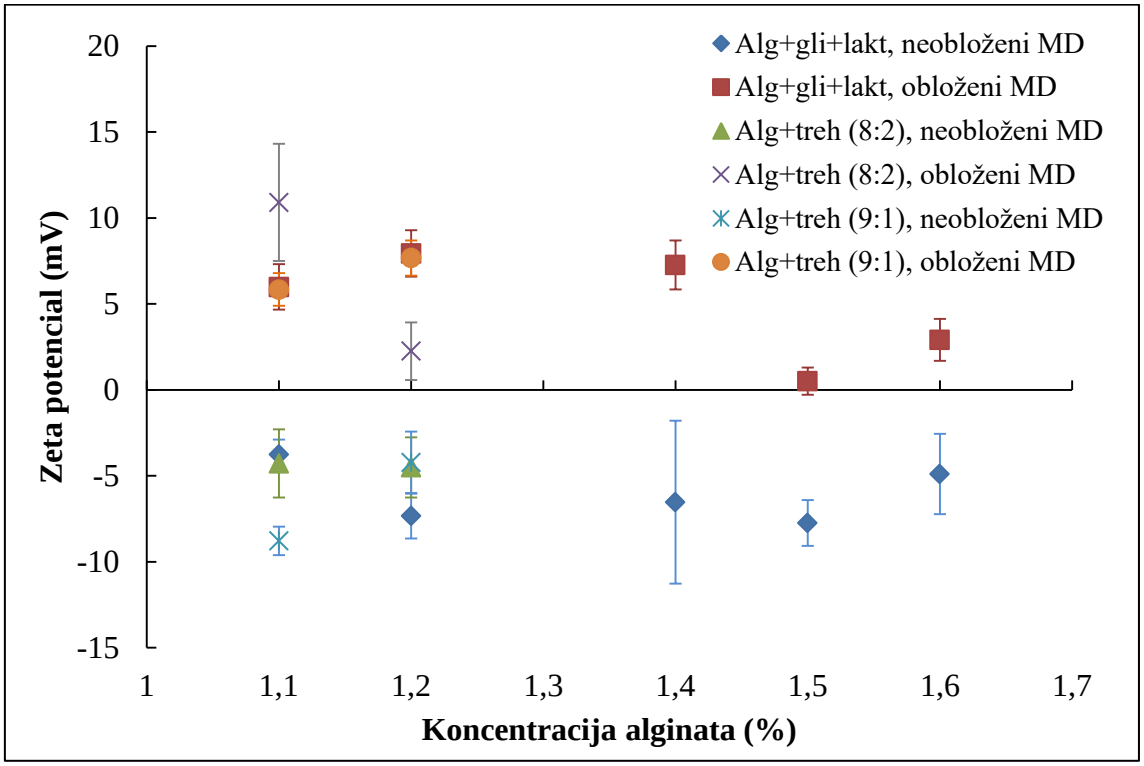
Glavni namen oblaganja mikrodelcev s hitosanom je bil, da bi obloga izboljšala preživetje celic med dolgoročnim shranjevanjem mikrodelcev. Poleg tega naj bi hitosan izkazoval tudi boljše bioadhezivne lastnosti v primerjavi z alginatom, kar pomeni, da se bolj veže na sluznico (v našem primeru ustno). Med pozitivno nabitim hitosanom in negativno nabitimi skupinami mucina se namreč ustvarijo elektrostatske sile (51). Da smo se prepričali, ali so mikrodelci obloženi, smo liofiliziranim mikrodelcem izmerili zeta potencial v prečiščeni vodi. Rezultati so prikazani na sliki 26.

Iz spodnjega grafa vidimo, da je zeta potencial pri neobloženih mikrodelcih vedno negativen, medtem ko je pri tistih z oblogo hitosana vedno pozitiven. Ni pa nobenega zaznavnega trenda povezanega z višanjem koncentracije alginata.

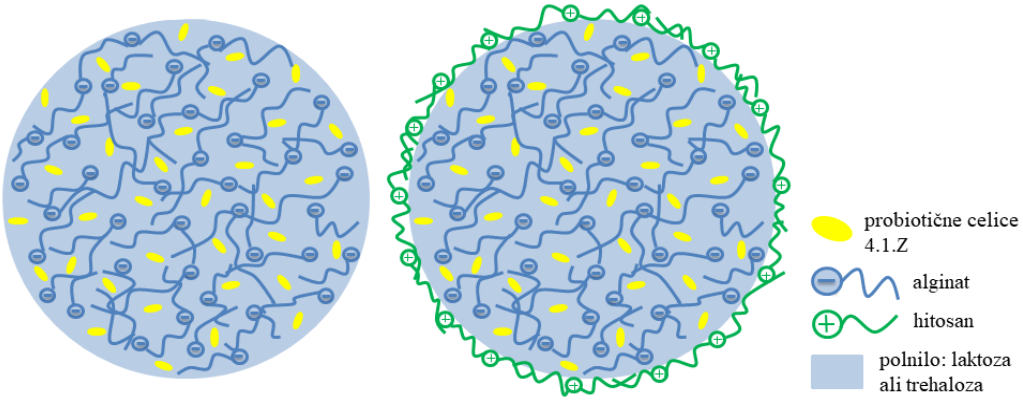
Pri neobloženih mikrodelcih predstavlja ogrodje kot tudi površino mikrodelcev alginat, ki je negativno nabit polimer zaradi svojih karboksilnih skupin (slika 27). Posledično je tudi izmerjeni zeta potencial negativen. Ko mikrodelcem dodamo raztopino hitosana v ocetni kislini, se hitosan, ki je pozitivno nabit, preko elektrostatskih interakcij veže na alginat. Na površini mikrodelcev se tako nahaja hitosan s svojimi aminskimi skupinami (slika 27) in posledično je zeta potencial pozitiven. S tem ko je izmerjeni potencial pri vseh neobloženih

mikrodelcih negativen, pri obloženih pa pozitiven, smo dokazali, da smo mikrodelce uspešno obložili.

Pričakovali bi, da bo zeta potencial neobloženih mikrodelcev z naraščajočo koncentracijo alginata vedno bolj negativen, ker imamo pri višjih koncentracijah tudi več ioniziranih karboksilnih skupin. Vendar temu ni tako. Razlog je najverjetneje v tem, da so uporabljene koncentracije nizke, razlika med njimi pa majhna. Prav tako je uporabljena koncentracija kalcijevih ionov v velikem presežku, kar pomeni, da vedno pride do popolnega premreženja alginatnih verig in vodi do enakega zaostanka prostih karboksilnih kislin, ki dajejo površini mikrodelcev naboj. Tako med različnimi koncentracijami alginata ni statistično značilnih razlik v vrednostih zeta potenciala.



Slika 26: Zeta potenciala neobloženih in obloženih mikrodelcev v odvisnosti od koncentracije alginata (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; treh, trehaloza; MD, mikrodelci)

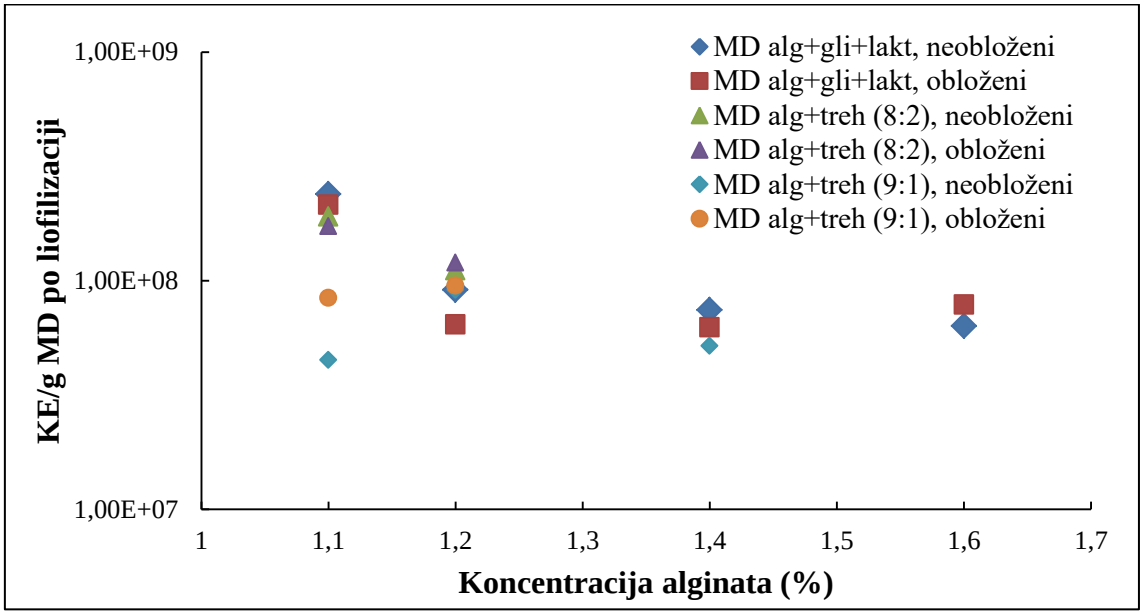


Slika 27: Shematska predstavitev mikrodelcev, levo: neobložen mikrodelec, desno: mikrodelec obložen s hitosansko oblogo

4.5. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE MIKRODELCEV S PROBIOTIKI

4.5.1. Kvantifikacija vgradnje probiotikov v liofilizirane mikrodelce

Po tem ko smo mikrodelce liofilizirali, smo jih še isti dan nanašali na trdna gojišča, da bi videli ali različne formulacije vplivajo na preživetje celic. V literaturi navajajo, da trehaloza bolj učinkovito zaščitili celice med zamrzovanjem kot glicerol. Bolj ohrani membransko strukturo celic, stabilizira lipidni dvosloj in preprečuje agregacijo delcev v membrani v primerjavi z glicerolom (52). Na sliki 28 so predstavljeni naši rezultati.



Slika 28: Odvisnost števila KE/g mikrodelcev po liofilizaciji od koncentracije alginata in pomožnih snovi, N = 3 (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; treh, trehaloza; MD, mikrodelci)

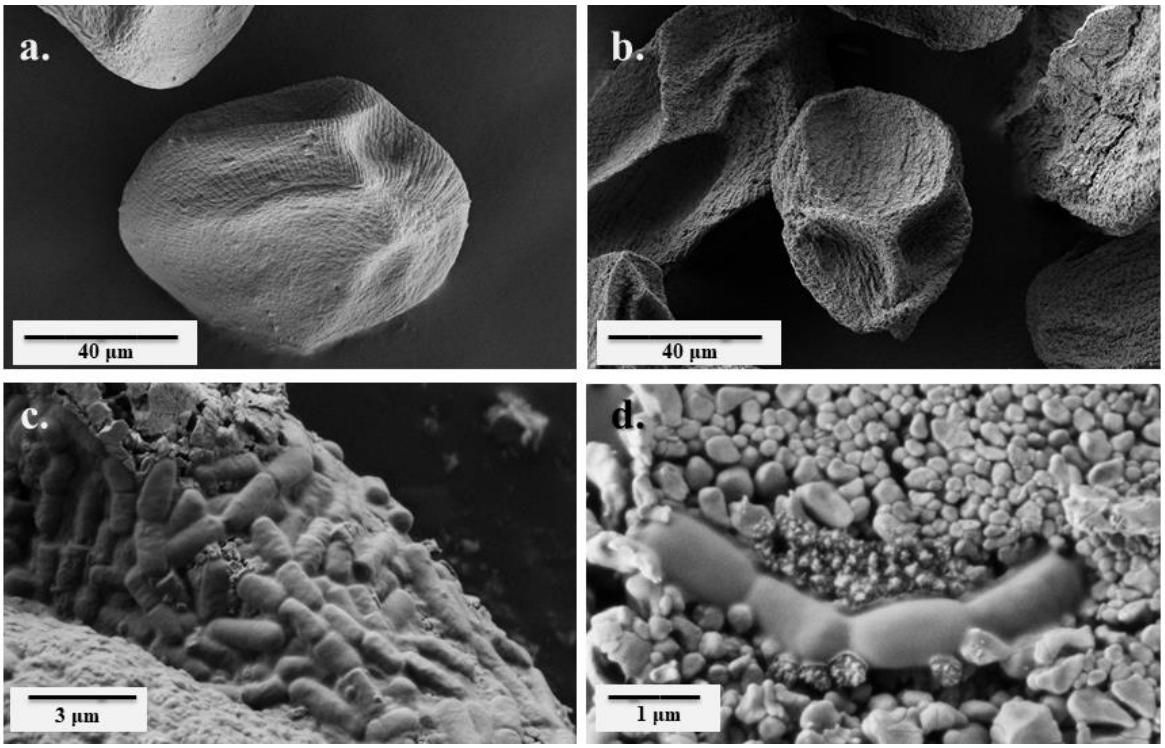
Število KE/g mikrodelcev različnih formulacij je v območju med $4{,}5\times10^7$ in $2{,}4\times10^8$. Pri nekaterih formulacijah se z višanjem koncentracije alginata zmanjšuje vrednost KE/g mikrodelcev. Ena od razlag bi lahko bila, da imamo pri nižjih koncentracijah alginata v posušenih mikrodelcih manj alginata in več celic na gram mikrodelcev, pri višjih koncentracijah pa več alginata in manj celic. Pri nanašanju na trdna gojišča mikrodelce natehtamo, zato imamo pri nižjih koncentracijah več celic kot pri enaki masi mikrodelcev z višjo koncentracijo alginata in število KE/g je posledično višje.

Bolj kot koncentracija uporabljene raztopine alginata, ki je v vseh primerih precej nizka, lahko na število KE/g liofiliziranih mikrodelcev vpliva število probiotikov v začetni suspenziji probiotikov. Torej je KE/g odvisen od izmerjene optične gostote (OD) suspenzije celic, ki jo vgrajujemo v mikrodelce. Izmerjeni OD suspenzij, ki smo jih vgrajevali v mikrodelce so bili v območju med 1,2 in 1,4. Izračunano iz enačbe *2* je torej število KE/mL suspenzije med $1{,}17\times10^8$ in $1{,}37\times10^8$, ker je ta razlika, med najvišjim in najnižjim KE/mL, v našem primeru majhna, najbrž nima pomembnega vpliva na KE/g mikrodelcev po liofilizaciji.

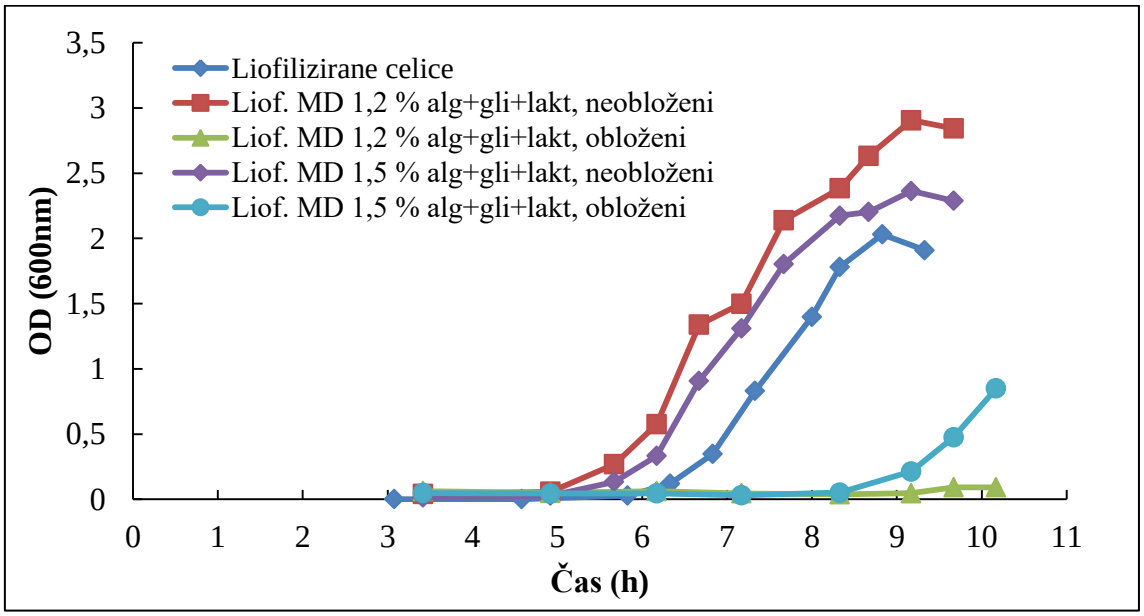
KE/g liofiliziranih mikrodelcev se med formulacijami z različnimi pomožnimi snovmi bistveno ne razlikuje. Pri nekaterih formulacijah (1,1 % alginat) je pri enako velikem dodatku trehaloze oz. glicerola preživetje celic v mikrodelcih z glicerolom celo nekoliko boljše, vendar je ta razlika majhna. Ne moremo pa potrditi, da bi trehaloza naše celice bolj učinkovito zaščitila med zamrzovanjem kot glicerol.

4.5.2. Vpliv mikrokapsuliranja in hitosanske obloge na rast celic

Za aplikacijo in učinek probiotikov pri parodontalnih boleznih je pomembno, da se ti zadržijo v obzobnem žepu, kamor jih apliciramo, ga čim hitreje kolonizirajo in tako učinkujejo. Da bi videli kako hitro celice izraščajo iz mikrodelcev in pridejo v eksponentno fazo rasti, smo v sveže gojišče natehtali enake količine 10., 11., 19. in 20. formulacije ter ekvivalentno količino liofiliziranih celic (slika 29). Z merjenjem OD pri 600 nm smo spremljali rast v različnih časovnih točkah, rezultati so predstavljeni na sliki 30.



Slika 29: Primerjava SEM slik neobloženih, obloženih mikrodelcev ter liofiliziranih 4.1.Z celic, a. 19. formulacija, b. 20. formulacija, c. in d. liofilizirane celice v 0,9 % NaCl



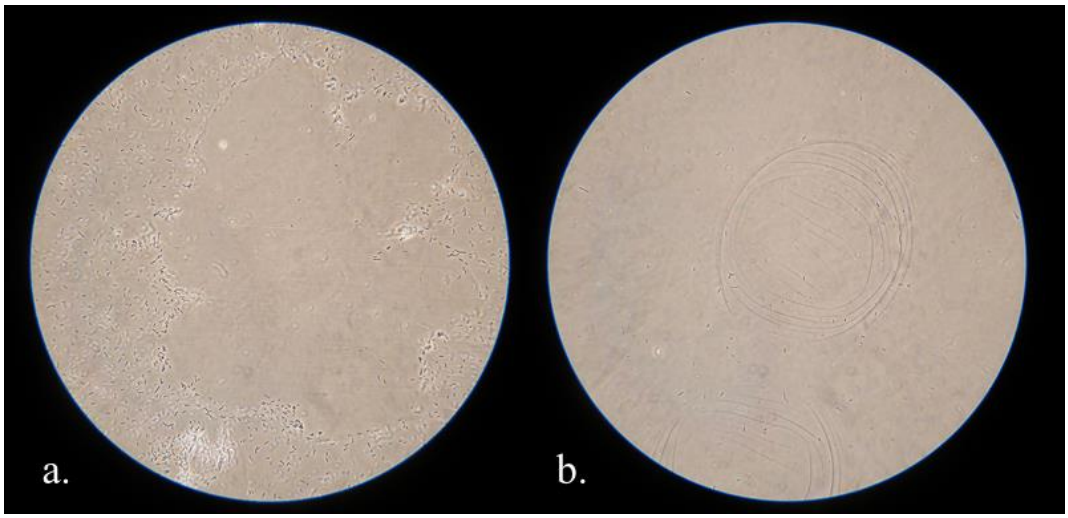
Slika 30: Odvisnost optične gostote (OD) pri 600 nm od časa inkubacije mikrodelcev in liofiliziranih 4.1.Z celic (alg, alginat; gli, glicerol; lakt, laktoza; MD, mikrodelci)

Neobloženi mikrodelci ter liofilizirane celice potrebujejo približno 5,5 ure, da pridejo v eksponentno fazo, medtem ko potrebujejo obloženi mikrodelci še dodatne 3,5 ure časa. Celice iz neobloženih mikrodelcev in liofilizirane celice pridejo približno hkrati v

eksponentno fazo rasti, s čimer smo potrdili, da neobložen mikrodelec ne ovira sproščanja in delitve celic. V času začetka eksponentne rasti je nekaj minut razlike, kar pa lahko pripišemo napaki pri tehtanju. Večja razlika, nekaj ur, se pojavi pri obloženih mikrodelcih. V primeru mikrodelcev je bil začetni inokulum (število celic) podoben in ni pomembno vplival na zamik v fazi rasti, zato lahko formulacije neposredno primerjamo. Hitosanska obloga najverjetneje zaščiti mikrodelce pred hitrim razpadom ter hipnim sproščanjem celic iz njih. Ko smo pod mikroskopom pogledali obložene mikrodelce, po nekaj urah inkubacije, smo videli, da se celice sicer delijo, vendar zaradi obloge, delca ne morejo zapustiti. Po 8 urah inkubacije so se tudi iz obloženega mikrodelca že sprostile celice (nekaj jih je še vedno v mikrodelcu), vendar je oblika mikrodelca še vedno nespremenjena za razliko od neobloženega, katerega oblika ni več podobna prvotnemu mikrodelcu (slika 31).

Mikrodelci brez obloge so po našem mnenju bolj primerni za zdravljenje parodontalne bolezni, saj se celice hitro sprostijo iz njih, kar pomeni da bodo tudi enako hitro kot same celice kolonizirale obzobni žep. Celice iz obloženih mikrodelcev potrebujejo več časa, da izrastejo iz kapsule oz. se sprostijo, zato obstaja nevarnost, da bi mikrodelec ušel iz žepa preden bi se celice sprostile in želenega učinka ne bi dosegli. Obloženi mikrodelci pa bi bili primerni za aplikacije, kjer bi si želeli zadržanega sproščanja.

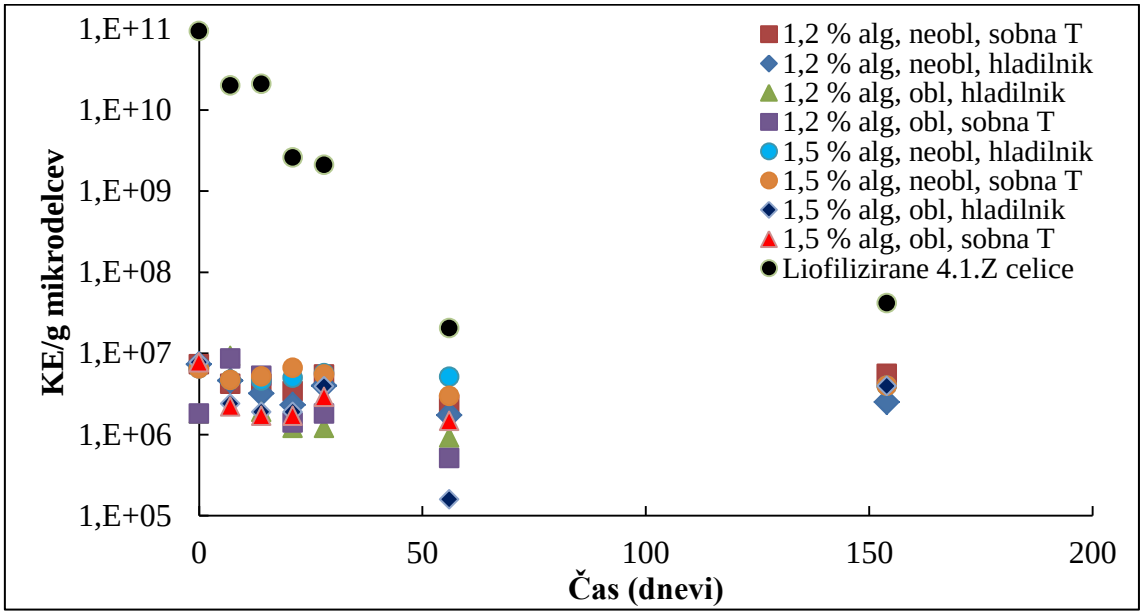
Lahko pa bi izdelali farmacevtsko obliko, ki bi vsebovala hkrati obložene in neobložene mikrodelce. Probiotiki iz neobloženih bi se takoj sprostili in kolonizirali obzobni žep, iz obloženih pa šele čez nekaj časa ter tako pomagali pri nadaljnji kolonizaciji obzobnih tkiv in s tem zagotovili bolj uspešno zdravljenje.



Slika 31: Mikrodelec po 8 urah inkubacije v tekočem gojišču, a. neobložen mikrodelec; b. obložen mikrodelec (optični mikroskop, 400 × povečava)

4.5.3. Stabilnost vgrajenih probiotikov v mikrodelce

Želimo si, da probiotiki 4.1.Z vgrajeni v mikrodelce v časovnem obdobju roka uporabnosti preživijo, saj tako zagotovimo učinkovitost farmacevtskega izdelka. Da bi ugotovili, kako dolgo je to obdobje, smo v določenih časovnih točkah na plošče nanašali mikrodelce. Po enakem postopku smo nanašali tudi same liofilizirane celice, da bi ugotovili ali smo s postopkom mikrokapsuliranja podaljšali preživetje celic. Na stabilnost zdravil ne vpliva le čas shranjevanja pač pa tudi pogoji, zato smo vzorce mikrodelcev hranili v hladilniku (4–8 °C) ter na sobni temperaturi pri relativni vlagi 33 %.



Slika 32: Odvisnost KE/g mikrodelcev različnih formulacij (alginat + glicerol + laktoza) oz. KE/g liofiliziranih celic od časa in pogojev shranjevanja (neobl, neobloženi; obl, obloženi; alg, alginat;)

Iz slike 32 lahko vidimo, da je KE/g mikrodelcev v obdobju prvega meseca shranjevanja precej konstantno. Ne pada niti pri mikrodelcih, ki smo jih hranili v hladilniku, niti pri tistih na sobni temperaturi. Medtem ko KE/g liofiliziranih 4.1.Z celic pade od začetnega 2×10^{10} po enem mesecu hranjenja v hladilniku na $2{,}1\times10^{9}$, kar za eno logaritemsko enoto.

Po petih mesecih je število KE/g mikrodelcev pri vseh testiranih formulacijah še vedno v rangu 10^{6}, tako pri tistih hranjenih v hladilniku kot na sobni temperaturi. Število liofiliziranih celic po 2 mesecih shranjevanja v hladilniku pade na $2{,}05\times10^{7}$, po petih mesecih je ta vrednost še vedno približno enaka.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da stabilnost naših mikrodelcev ni odvisna od pogojev hranjenja (v hladilniku ali pri sobni temperaturi) ter da celice v liofiliziranih

mikrodelcih preživijo najmanj 5 mesecev. Med samimi neobloženimi mikrodelci in mikrodelci s hitosansko oblogo v stabilnosti ni razlik. Same liofilizirane 4.1.Z celice pa so manj stabilne od mikrokapsuliranih, saj se število KE/g celic v dveh mesecih zmanjša za tri logaritemske enote. Torej smo z mikrokapsuliranjem probiotikov podaljšali njihovo stabilnost.

5. SKLEP

V tem magistrskem delu smo najprej optimizirali gojenje probiotikov 4.1.Z, ki smo jih z metodo vibrirajoče membrane vgradili v mikrodelce za zdravljenje paradontalne bolezni in nekatere nastale mikrodelce obložili s hitosanom. Vse smo liofilizirali ter ovrednotili njihove fizikalno-kemijske lastnosti pred in po liofilizaciji in prišli do naslednjih sklepov.

- Velikost šobe ne vpliva na obliko mikrodelcev, vpliva pa na njihovo velikost. Z manjšo 100 µm šobo nastanejo manjši mikrodelci s premerom 120–50 µm, medtem ko s 500 µm šobo nastanejo večji s premerom 1,2–1,4 mm. Za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni - aplikacijo v obzobni žep, ki je običajno velik nekaj mm^2, so bolj primerni mikrodelci izdelani s 100 µm šobo. Lokalna dostava manjših mikrodelcev v obzobni žep bo enostavnejša, hkrati pa bodo lažje ostali na mestu delovanja.
- Koncentracija uporabljene raztopine alginata nima signifikantnega vpliva na velikost izdelanih mikrodelcev, ima pa bistven vpliv na obliko mikrodelcev predvsem po liofilizaciji. Z večanjem koncentracije uporabljene raztopine alginata, nastanejo takoj po mikrokapsuliranju mikrodelci bolj okrogle oblike in jo ohranijo v večji meri tudi po liofilizaciji, kar je pomembno za nadaljnjo obdelavo v končno farmacevtsko obliko.
- Proces mikrokapsuliranja je omejen s koncentracijo polimerne raztopine za mikrokapsuliranje in posledično z viskoznostjo. Pri uporabi 100 µm šobe smo stabilen proces mikrokapsuliranja lahko zagotovili z uporabo 1,5 % raztopine alginata ter dodatkom glicerola in laktoze ter 1,1 % raztopine alginata z dodatkom trehaloze.
- Med neobloženimi mikrodelci in obloženimi s hitosansko oblogo, pri enaki sestavi formulacije, ni statistično značilne razlike v velikosti in obliki. Obloga pa vpliva na specifično površino mikrodelcev in njihov zeta potencial. Specifična površina je pri neobloženih manjša kot pri obloženih, pri obloženih je tudi jasno vidna povečana nagubanost površine (liofiliziranih) mikrodelcev. Zeta potencial je pri neobloženih mikrodelcih vedno negativen, medtem ko je pri tistih z oblogo hitosana vedno pozitiven. Ni pa statistično značilnih razlik v vrednostih zeta potenciala med različnimi koncentracijami alginata.

- Po redispergiranju liofiliziranih mikrodelcev v vodi ali fiziološki raztopini, se le tem povrne oblika in velikost, ki so jo imeli pred liofilizacijo. Pri tem ni pomembno, koliko časa so v stiku s tekočino, saj nabreknejo takoj, pač pa volumen razpoložljive tekočine. Če je te premalo, mikrodelci namreč ne pridobijo nazaj oblike, ki so jo imeli pred liofilizacijo.
- Proces liofilizacije v enaki meri preživijo probiotiki vgrajeni v mikrodelce z dodatkom trehaloze ali glicerola, iz česar sklepamo, da sta obe pomožni snovi primerna in zamenljiva lio- oz. krioprotektanta.
- Eksponentna faza rastne krivulje 4.1.Z celic iz rodu *Bacillus* se začne istočasno pri neobloženih mikrodelcih in samih liofiliziranih celicah. Alginatno ogrodje torej ne ovira sproščanja probiotikov in s tem njihove delitve. Hitosanska obloga pa zaščiti mikrodelce pred hitrim razpadom in hipnim sproščanjem celic iz njih, saj je razlika v začetku eksponentne faze rasti, v primerjavi z neobloženimi mikrodelci in samimi celicami, nekaj ur. Neobloženi mikrodelci z vgrajenimi probiotiki so zato bolj primerni pri aplikacijah, ko si želimo takojšnje sproščanje, obloženi pa ko si želimo zadržano.
- S kombinacijo mikrokapsuliranja in liofilizacije zagotovimo daljšo stabilnost probiotikov. Število živih celic samih liofiliziranih 4.1.Z celic upade precej hitreje kot pa 4.1.Z vgrajenih v mikrodelce.
- Stabilnost mikrodelcev z vgrajenimi probiotiki 4.1.Z ni odvisna od pogojev hranjenja (v hladilniku pri 4–8 °C ali na sobni temperaturi). Prav tako na stabilnost ne vpliva hitosanska obloga.

6. LITERATURA

1. Zupančič Š, Baumgartner S, Lavrič Z, Petelin M, Kristl J. Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2015; 30: 408–416.
2. Sahni J, Talegaonkar S, Tariq M, Ahmad Z, Ali J, Baboota S, Iqbal Z. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. International Journal of Pharmaceutical Investigation 2012; 2(3): 106.
3. Novak N. Izolacija in karakterizacija bakterij z antimikrobnim učinkom proti bakteriji *Aggregartibacter Actinomycetemcomitans*. Magistrska naloga, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2017.
4. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14(4): 727–752.
5. http://zobnaklinika-zobart.si/index.php?option=com_content&view=article&id=25&Itemid=130 (pridobljeno 12.2.2017)
6. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. Periodontology 2000 2009; 51(1): 141–151.
7. AlJehani YA. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. International Journal of Dentistry 2014; 2014: 1–9.
8. Mirtič J, Kogej K, Baumgartner S, Smistad G, Kristl J, Hiorth M. Development of Cetylpyridinium-Alginate Nanoparticles: A Binding and Formulation Study. International Journal of Pharmaceutics 2016; 511(2): 774–784.
9. Zupancic S, Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Contribution of nanotechnology to improved treatment of periodontal disease. Current pharmaceutical design 2015; 21(22): 3257–3271.
10. Meurman J, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. Oral Diseases 2007; 13(5): 443–451.
11. Ashwell M, International Life Sciences Institute, ILSI Europe. Concepts of Functional Foods. Brussels; [Great Britain: ILSI Europe, 2002.
12. Zvonar A, Gašperlin M. Pregled metod izdelave mikrokapsul za farmacevtsko uporabo. Farmacevtski vestnik 2011; 62(3): 131–138.

13. Park K, Yeo Y. Microencapsulation Technology. In: Swarbric A. (Ed.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd Ed. Vol 4. New York: Informa healthcare, 2007.
14. Singh NM, Hemant KSY, Ram M, Shivakumar HG. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. Research in Pharmaceutical Sciences 2010; 5(2): 65–77.
15. Poncelet D. Microencapsulation: Fundamentals, Methods and Applications. In. J.P . Blitz and V.M. Gun`ko (Eds.), Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science. Netherlands: Springer, 2006.
16. Homar M, Šuligoj D, Gašperlin M. Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method. Journal of Microencapsulation 2007; 24(1): 72–81.
17. Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE 50R. Dottikon, Switzwrland, 2002.
18. Prüsse U, Bilancetti L, Bučko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, Lewińska D, Manojlovic V, Massart B, Nastruzzi C, Nedovic V, Poncelet D, Siebenhaar S, Tobler L, Tosi A, Vikartovská A, Vorlop K-D. Comparison of different technologies for alginate beads production. Chemical Papers 2008; 62(4).
19. Manojlovic V, Djonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. international Journal of nanomedicine 2006; 1(2): 163.
20. Solanki HK, Pawar DD, Shah DA, Prajapati VD, Jani GK, Mulla AM, Thakar PM. Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. BioMed Research International 2013; 2013: 1–21.
21. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. Journal of Food Science and Technology 2015; 52(8): 4679–4696.
22. Genrile FT, Doherty EJ, Rein DH, Shoichet MS, Winn SR. Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. Reactive Polymers 1995; (25): 207–227.
23. Cantow, Hans-Joachim. Advances in Polymer Science. New York: Springer
24. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. Journal of The Royal Society Interface 2014; 11(100): 20140817–20140817.

25. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science 2012; 37(1): 106–126.
26. Rowe RC ed. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. London: APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, 2009.
27. http://people.clarkson.edu/~amelman/alginate_hydrogels.html (pridobljeno 30.7.2018)
28. Kos MK. Uporaba hitosana v farmaciji. Farmacevtski vestnik 2006; 57: 287–291.
29. Nilsen-Nygaard J, Strand S, Vårum K, Draget K, Nordgård C. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. Polymers 2015; 7(3): 552–579.
30. Obreza A, Šmid - Korbar A, Humar M, Janeš D, Razinger B, Frankič D, Kosirnik M. Farmacevtski Terminolški Slovar. Ljubljana: Založba ZRC, 2013.
31. Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu MN, Lavakumar V. Lyophilization/freeze drying-An review. International journal of novel trends in pharmaceutical sciences 2013; 3(4): 87–93.
32. Khairnar S, Kini R, Harwalkar M. International Journal of Research in Pharmacy and Science. Int. J. Res. Pharm. Sc 2013: 76.
33. Anhorn MG, Mahler H-C, Langer K. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. International Journal of Pharmaceutics 2008; 363(1–2): 162–169.
34. Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems. Transfusion and Apheresis Science 2012; 46(2): 137–147.
35. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. Advanced Drug Delivery Reviews 2006; 58(15): 1688–1713.
36. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food and Chemical Toxicology 2002; 40(7): 871–898.
37. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG890421 (pridobljeno 15.4.2018)
38. Lin H-L, Lin C-C, Lin Y-J, Lin H-C, Shih C-M, Chen C-R, Huang R-N, Kuo T-C. Revisiting with a Relative-Density Calibration Approach the Determination of Growth Rates of Microorganisms by Use of Optical Density Data from Liquid Cultures. Applied and Environmental Microbiology 2010; 76(5): 1683–1685.

39. https://imagej.nih.gov (pridobljeno 4.10.2017)
40. http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-sem.php#more (pridobljeno 23.6.2017)
41. Šporar E. Razvoj modela za določanje velikosti delcev hidroksipropilmetilcelulze s spektroskopijo bližnjega infrardečega območja. Magistrska naloga, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
42. https://www.atascientific.com.au/wp-content/uploads/2017/01/Zetasizer-brochure.pdf (pridobljeno 16.6.2017)
43. Chavda VP, Shaliya D, Patel B, Gabani A. Biotechnological/Biological Products: About Its Stability Testing. PharmaTutor 2016; 4(5): 14–19.
44. Danevčič T, Mandić-Mulec I. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov: za študente mikrobiologije. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2007.
45. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62(1): 3–11.
46. Olsson C, Jansson H, Youngs T, Swenson J. Structure of Aqueous Trehalose Solution by Neutron Diffraction and Structural Modeling. The Journal of Physical Chemistry B 2016; 120(49): 12669–12678.
47. Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon S, Bégaud E, Bizet C, Pascual J, Ruvira MA, Macián MC, Arahal DR. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. Applied Microbiology and Biotechnology 2015; 99(8): 3559–3571.
48. Goderska K. Different Methods of Probiotics Stabilization. P. in Rigobelo E (ed). Probiotics. InTech, 2012.
49. Abadias M, Benabarre A, Teixido N, Usall J, Vinas I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast Candida sake. International Journal of Food Microbiology 2001; 2001(65): 173–182.
50. Rabzelj J. Proučevanje pretočnih lastnosti zmesi praškov z različnimi velikostnimi razredi delcev. Diplomska naloga, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
51. Gaserød O, Jolliffe IG, Hampson FC, Dettmar PW, Skjak-Braek G. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. International Journal of pharmaceutics 1998; 175(2): 237–246.
52. Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology 1985; 22(4): 367–377.