

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA ČERKEZ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA ČERKEZ

RAZVOJ KOMPOZITNIH NANOVLAKEN Z METRONIDAZOLOM ZA VNOS V
OBZOBNE ŽEPE

DEVELOPMENT OF COMPOSITE NANOFIBERS WITH METRONIDAZOLE
FOR ITS DELIVERY INTO PERIODONTAL POCKET

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom prof. dr. Saše Baumgartner.

Za temo te magistrske naloge, ki mi je bila takrat povsem neznana, me je navdušila somentorica prof. dr. Saša Baumgartner. Laboratorijsko delo, ki mi ga je omogočila na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, je bila zame neprecenljiva izkušnja in v ponos mi je, da sem ga lahko opravljala pod somentorstvom tako izjemne osebe in profesorice z obilico strokovnega znanja, ki se izraža v vseh njenih dosežkih, med katere se lahko šteje tudi ta magistrska naloga. Z vsem spoštovanjem se ji zahvaljujem za vso pomoč, spodbudo, usmerjanje in dosegljivost pri eksperimentalnem delu te magistrske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi mentorici prof. dr. Julijani Kristl, ki je z izjemnim strokovnim znanjem, usmerjanjem v ključnih trenutkih, dosegljivostjo in spodbudo pripomogla k nastanku pisne oblike te magistrske naloge. Hvala vam, ker ste verjeli vame, mi zaupali in pred novimi izzivi se bom vedno spomnila vaše zagnanosti in spodbude. Hvala tudi mladi raziskovalki Špeli Zupančič za vsestransko pomoč, usmerjanje, posredovano znanje in izkušnje ter dosegljivost tako pri izvajanju eksperimentalnega dela kot tudi pri pisanju magistrske naloge ter doc. dr. Petri Kocbek za potrpežljivost in vse SEM slike. K nastanku magistrske naloge pa so pripomogli tudi ostali člani Katedre za farmacevtsko tehnologijo, za kar se jim prav tako zahvaljujem, kot tudi družini in prijateljem, ki so me podpirali in spodbujali tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl in somentorstvom prof. dr. Saše Baumgartner.

Kristina Čerkez

KAZALO

POVZETEK	V
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 TEORETIČNI UVOD.....	1
1.1 PARODONTALNA BOLEZEN	1
1.1.1 Protimikrobno zdravljenje.....	2
1.2 NANOVLAKNA.....	6
1.2.1 Izdelava nanovlaken – elektrostatsko sukanje.....	6
1.2.2 Materiali za izdelavo nanovlaken.....	7
1.2.3 Vpliv lastnosti polimernih raztopin na izdelavo nanovlaken	10
1.2.4 Vrednotenje lastnosti nanovlaken.....	11
1.3 NANOVLAKNA KOT FARMACEVTSKA OBLIKA	12
1.3.1 In vitro sproščanje zdravilne učinkovine iz nanovlaken.....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE DE LA	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 NAPRAVE IN DRUGA LABORATORIJSKA OPREMA.....	17
3.3 IZDELAVA NANOVLAKEN	19
3.3.1 Priprava polimernih raztopin.....	19
3.3.2 Elektrostatsko sukanje nanovlaken.....	20
3.4 PRIPRAVA PBS PUFRA.....	21
3.5 VREDNOTENJE LASTNOSTI POLIMERNIH RAZTOPIN IN NANOVLAKEN	21
3.5.1 Merjenje prevodnosti polimernih raztopin.....	21
3.5.2 Merjenje povprečnega premera nanovlaken	22
3.5.3 Spremljanje spreminjanja oblike nanovlaken.....	22
3.5.4 Poskus nabrekanja in izgube mase nanovlaken	23
3.6 RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE METRONIDAZOLA	23

3.6.1	<i>Izdelava umeritvene krivulje.....</i>	23
3.6.2	<i>Vpliv polimerov na vrednost izmerjene absorbance metronidazola</i>	24
3.7	STABILNOST METRONIDAZOLA V VODNIH RAZTOPINAH.....	25
3.8	SPROŠČANJE METRONIDAZOLA IZ NANOVLAKEN.....	25
3.8.1	<i>Optimizacija protokola za sproščanje metronidazola iz nanovlaken v Franzovi celici.....</i>	25
3.8.2	<i>Vpliv odpuščanja snovi z mrežice Tegaderm na meritve absorbance metronidazola.....</i>	27
3.8.3	<i>Sproščanje metronidazola iz nanovlaken</i>	27
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	29
4.1	RAZVOJ PRAZNIH NANOVLAKEN.....	29
4.2	RAZVOJ NANOVLAKEN Z METRONIDAZOLOM.....	32
4.3	LASTNOSTI NANOVLAKEN.....	34
4.3.1	<i>Vrednotenje nabrekanja in izgube mase nanovlaken</i>	34
4.3.2	<i>Vpliv medija na spreminjanje oblike nanovlaken.....</i>	36
4.4	RAZVOJ ANALIZNE METODE	38
4.4.1	<i>Umeritvena krivulja.....</i>	38
4.4.2	<i>Vpliv polimerov na vrednost izmerjene absorbance metronidazola</i>	39
4.5	STABILNOST METRONIDAZOLA V VODNIH RAZTOPINAH.....	41
4.6	SPROŠČANJE METRONIDAZOLA IZ NANOVLAKEN.....	42
4.6.1	<i>Optimizacija protokola za sproščanje metronidazola iz nanovlaken v Franzovi celici.....</i>	42
4.6.2	<i>Sproščanje metronidazola iz nanovlaken</i>	46
5	SKLEP.....	53
6	LITERATURA	55
PRILOGA 1	59

POVZETEK

Parodontalna bolezen je kronično vnetje in okužba dlesni ter ostalih obzobnih tkiv. Željeno zdravljenje s protimikrobnimi zdravili je lokalno in nanovlakna (NV) smo prepoznali kot inovativen dostavni sistem, primeren za neposredno dajanje v obzobne žepe. V raziskovalnem delu smo razvili biorazgradljiva, biokompatibilna in bioadhezivna NV iz hitosana (CH) in polietilenoksida (PEO) v enakem razmerju s podaljšanim sproščanjem metronidazola. NV smo izdelali z elektrostatskim sukanjem iz 4 in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO v 3 % (V/V) očetni kislini. Vanje smo vgradili 0,5, 1,0, 5,0 in 15,0 % metronidazola. Vrednotili smo prevodnost polimernih raztopin, debelino NV z vrstično elektronsko mikroskopijo, obnašanje v vodi in sproščanje metronidazola. Ugotovili smo, da dodajanje metronidazola ne vpliva na prevodnost polimerne raztopine ter da 5 % (m/m) raztopina polimera daje debelejša NV kot 4 % (m/m). Dokazali smo, da se je metronidazol vključil med polimerne verige v NV in ostal stabilen med izdelavo in poskusi sproščanja. Rezultati nabrekanja NV in izgube mase so pokazali, da imajo izdelana NV iz CH/PEO veliko sposobnost za privzem vode in nabrekanje. V prvih dveh urah pa izgubijo polovico svoje mase le na račun raztapljanja PEO.

S spremljanjem sproščanja metronidazola v termostatisiranih Franzovih celicah v PBS pufri s pH 6,8 in s spektrofotometrično analizo smo dokazali, da NV omogočajo podaljšano sproščanje učinkovine, saj je bilo sproščanje metronidazola iz NV vedno počasnejše kot raztapljanje samega. Najhitreje se je metronidazol sproščal iz NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO s 15 % vgradnjo, z znižanjem deleža učinkovine pa se je sproščanje upočasnjevalo. Pričakovano se je sproščanje še podaljšalo s povečanjem deleža polimera na 5 % (m/m), saj so nastala debelejša NV, nabrekanje le-teh je bilo večje in prav tako difuzijska razdalja učinkovine. Z NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO in z 1 oz. 0,5 % metronidazola smo dosegli sproščanje učinkovine do približno 12 ur. Kot izhodišče za doseglo bistveno daljšega sproščanja metronidazola iz NV pa bi bilo smiselno povečati delež CH, ki manj nabreka in erodira kot PEO.

Ključne besede: parodontalna bolezen, nanovlakna, hitosan, polietilenoksid, metronidazol, elektrostatsko sukanje, Franzove celice, SEM.

ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic inflammation and infection of gums as well as other gingival tissues. The desired treatment of this disease is the local delivery of antimicrobials; we have identified nanofibers (NF) as an innovative delivery system, appropriate for the direct application into periodontal pockets. In this research work we developed biodegradable, biocompatible and bioadhesive NF from chitosan (CH) and polyethylene oxide (PEO) with prolonged-release of metronidazole. We produced NF from 4 and 5 % (w/w) solution CH/PEO in 3 % (v/v) acetic acid using electrospinning process. Various drug loadings of metronidazole, 0.5, 1.0, 5.0 and 15.0 %, were incorporated into NF. We evaluated the conductivity of polymer solutions, the thickness of NF using scanning electron microscopy, their behavior in water and the release of metronidazole. We discovered that adding metronidazole does not affect conductivity of polymer solution and electrospinning of 5 % (w/w) polymer solution results in thicker NF as 4 % (m/m). We proved that metronidazole was distributed among polymer chains in NF and remained stable during the production and the experiments of release. The results of swelling and loss of weight showed that NF produced from CH/PEO have an immense capacity to accept water and ability of swelling. In the first couple of hours, however, they lose half of their weight due to dissolution of PEO.

The release studies performed in the thermostatted Franz cells in PBS buffer with pH 6.8 and evaluated with spectrophotometric analytical method showed prolonged metronidazole release from NF compared to pure drug dissolution. The metronidazole released the fastest from NF from 4 % (w/w) solution of CH/PEO with 15 % metronidazole incorporation; by lowering the percentage of the substance the release slowed down. Expectedly, the release was even more sustained by the increase of the percentage of polymer in solution to 5 % (w/w). As thicker NF emerged, they swelled more and consequently, it enlarged the diffusion distance of the substance. We achieved the release of substance up until approximately twelve hours with NF from 5 % (w/w) solution CH/PEO and with 1 and 0.5 % of metronidazole. As a starting-point to achieve essentially longer release of metronidazole from NF it would make sense to increase the share of CH that swells and erodes less than PEO.

Keywords: periodontal disease, nanofibers, chitosan, polyethylene oxide, metronidazole, electrospinning, Franz cells, SEM.

SEZNAM OKRAJŠAV

A – absorbanca

c – koncentracija

CH – hitosan

G (-) – po Gramu negativne bakterije

G (+) – po Gramu pozitivne bakterije

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

NV – nanovlakna

PEO – polietilenoksid

Ph. Eur. – Evropska farmakopeja

PVA – polivinilacetat

RH – relativna vlažnost

SEM – vrstični elektronski mikroskop

UV-VIS – absorpcijska spektroskopija v ultravijoličnem in vidnem območju

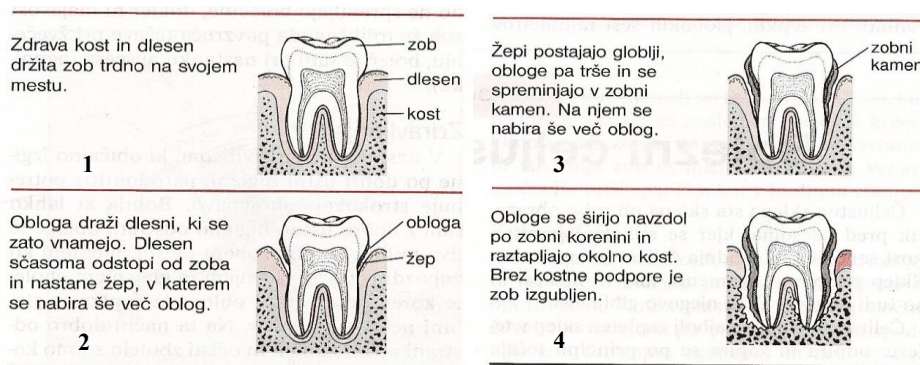
1 TEORETIČNI UVOD

1.1 PARODONTALNA BOLEZEN

Parodontalna bolezen je kronično vnetje in okužba dlesni ter ostalih obzobnih tkiv (koreninskega cementa, alveolne kosti in pozobnice). Značilna je predvsem za odrasle po petdesetem letu ter starejše, vendar obstaja tudi juvenilna oblika te bolezni, ki se pojavi pri drugače zdravih otrocih iz ne povsem znanega vzroka. Bolezensko stanje se razvije iz nezdravljenega vnetja dlesni (gingivitis), ki je največkrat posledica neustrezne ustne higijene, lahko pa tudi sistemskih, imunskih ali endokrinih bolezni, pomanjkanja vitaminov in mineralov, pubertete, nosečnosti ali zdravlil [1–4]. Pri neustrezni ustni higieni se ostanki hrane in bakterije normalne ustne flore v obliki oblog nabirajo ob robu dlesni, v poškodovanih plombah in slabo očiščenih delnih zobnih protezah. Obloge v dveh do treh tednih otrdijo v zobni kamen, ki ga lahko očisti le zobozdravnik. Zobni kamen je ugodno okolje za pritrnitev, rast in razmnoževanje bakterij običajne ustne flore, ki pa v velikem številu postanejo patogene za organizem, še posebej, če proizvajajo in izločajo snovi, ki stimulirajo imunski sistem. Pride do prekomernega nastajanja mediatorjev vnetja (interlevkina-1 β , TNF- α , prostaglandinov), ki aktivirajo encime za razgradnjo tkiv (metaloproteinaze, katepsine, serinske proteaze,...), in povzročijo odstopanje dlesni od zoba ter nastanek t.i. *parodontalnih žepov* med zobno korenino in dlesnijo. V njih so še bolj idealni pogoji za razrast bakterij zaradi prisotnosti oblog, gingivalne tekočine in odsotnosti kisika. Pri tem postanejo krvavitve iz dlesni čedalje pogostejše, lahko tudi spontane, pojavijo se neprijeten vonj iz ust oz. zadah, spremembe v položaju zob in bolečine. Če se parodontalne bolezni ustrezno ne zdravi, pride do uničenja okoliške čeljustne kosti in izpada zob [1, 3, 4]. Shematsko potek parodontalne bolezni prikazuje *slika 1*.

V nadaljevanju je napredovanje parodontalne bolezni odvisno od imunskega sistema in ustne flore vsakega posameznika ter od prisotnosti drugih dejavnikov tveganja, kot so stres, kajenje, sladkorna bolezen, nosečnost, hormonske motnje in podobno. Najboljša preventiva pred parodontalno boleznijo je ustrezna ustna higiena, to je redno umivanje zob, uporaba zobne nitke in ustne vode, ter reden obisk zobozdravnika. Če se le-ta razvije, zobozdravnik očisti zobne obloge in zobni kamen, s posebno sondo tudi v parodontalnih žepih. To je izvedljivo pri žepih globokih do 5 mm (blaga do zmerna parodontalna

bolezen), če so ti globlji (huda parodontalna bolezen), je potreben kirurški poseg. Pri tem odstranijo tudi obolelo dlesen in kostnino ter s tem omogočijo obnovo tkiva [1, 3, 4, 5]. Ker je vzrok za parodontalno bolezen bakterijska okužba, je prav tako neizogibna uporaba protimikrobnih zdravil. Zobozdravniki predpisujejo tako sistemsko kot tudi lokalno uporabo le-teh, vendar se do sedaj noben način ni izkazal za zelo učinkovitega [4, 5]. Kljub vsemu pa je zdravljenje parodontalne bolezni nujno, ker v nasprotnem primeru pride do izgube zob in razvoja drugih bolezni, ki so posledica vdora bakterij v sistemski krvni obtok in obrambe organizma pred njimi. Po uspešnem zdravljenju pa se bolezen lahko tudi ponovi, s čimer mora biti bolnik seznanjen in zato celo življenje skrbeti za ustno higieno ter redno obiskovati zobozdravnika [1, 3, 4].



Slika 1: Razvoj parodontalne bolezni [1].

1.1.1 Protimikrobno zdravljenje

Tistim bakterijam, ki so patogene in povzročajo okužbo pri parodontalni bolezni, pravimo *parodontopatogene bakterije*. Gre za bakterije, ki so prisotne v oblogah ljudi z zdravimi zobnimi tkivi in pri ljudeh s parodontalno boleznijo, le da so pri slednjih prisotne v večjem številu. Parodontopatogene bakterije so najpogosteje po Gramu negativne (G-), večinoma anaerobne bakterije, ki kolonizirajo mehka tkiva v ustni votlini (dlesni, jezik, glasilke) in živijo v obliki biofilma [4, 6, 7].

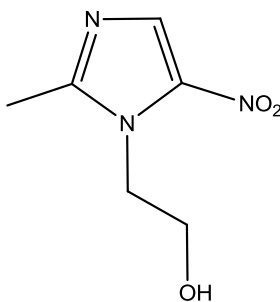
Dokazano je, da je zmanjšanje števila parodontopatogenih bakterij oz. njihova popolna odstranitev glavni pogoj za ozdravitev parodontalne bolezni. Slednje pa lahko dosežemo le z mehanskim čiščenjem žepov v kombinaciji z lokalnim ali sistemskim zdravljenjem s protimikrobnimi zdravili. V praksi zobozdravniki izberejo protimikrobno zdravljenje za posameznega bolnika na podlagi preteklih izkušenj in poteka bolezni pri posamezniku, le

kadar jim nikakor ne uspe najti ustrezne terapije, ki bi učinkovito izboljšala bolnikovo stanje, se le-ti poslužujejo informacij iz mikrobioloških testov in rezultatov antibiogramov, saj parodontalno bolezen povzroča veliko različnih bakterij, kar pomeni, da so testi dolgotrajni, dragi ter dajejo le omejeno število informacij [6–9].

Za zdravljenje parodontalne bolezni je potrebna uporaba kombinacije protimikrobnih učinkovin, saj so v biofilmih v parodontalnih žepih našli tudi več kot 700 različnih vrst bakterij. Najpogosteje uporabljene protimikrobne učinkovine so *amoksicilin*, *metronidazol*, *doksicilin*, *minocilin*, *ciprofloksacin*, *azitromicin* in *klindamicin* (Priloga 1) [4, 8, 10]. Danes še vedno prevladuje sistemska uporaba slednjih učinkovin, čeprav je ta način uporabe res učinkovit in priporočen le pri hitro napredujoči in zelo agresivni parodontalni bolezni [4, 5]. Sistemske pridejo protimikrobne učinkovine na mesto delovanja oz. v parodontalne žepe preko centralnega krvnega obtoka. Prednost sistemsko uporabljenih protimikrobnih učinkovin je, da ne delujejo samo v žepih, ampak penetrirajo tudi v ostala mehka tkiva v ustni votlini, kjer so prav tako lahko kolonizirane parodontopatogene bakterije. Nasprotno pa so zaradi porazdelitve protimikrobnih učinkovin po celotnem telesu potrebni visoki odmerki le-teh, ker je njihova ustrezna učinkovitost dosežena šele, ko koncentracija v obzobnem žepu preseže minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). Doseg MIC pa je pomemben tudi zato, ker se s tem zmanjša možnost nastanka rezistentnih bakterij. Z lokalno dostavo protimikrobnih učinkovin v obzobni žep omogočimo visok odmerek le-teh neposredno na mestu delovanja in posledično jim ostalo telo ni izpostavljeno, saj le v manjši meri prehajajo v centralni krvni obtok, zmanjša pa se tudi možnost pojava neželenih učinkov kot posledice visokih odmerkov [4, 8, 10]. V ta namen so za dostavo protimikrobnih učinkovin najprimernejše naslednje farmacevtske oblike: nanovlakna, filmi, mikrodelci, nanodelci, vezikularni sistemi in geli z vgrajeno protimikrobno učinkovino ter trakovi prepojeni z njo. Z navedenimi oblikami lahko dosežemo tudi prilagojen oz. podaljšan način sproščanja, kar še poveča učinkovitost protimikrobnih učinkovin, ki so se zaradi sproščanja na mestu delovanja izognila tudi učinku prvega prehoda skozi jetra. A nasprotno se v žepu nahaja gingivalna tekočina (0,4 – 1,5 μL), katere pretok je približno 20 – 137 $\mu\text{L}/\text{h}$ (odvisno od napredovalosti parodontalne bolezni), kar pomeni, da se celoten volumen tekočine v žepu zamenja približno 60-krat v eni uri in s seboj odplavi tudi raztopljene protimikrobne učinkovine [4, 5, 8, 11].

Metronidazol

Metronidazol je kemijsko 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol (slika 2). Uvrščamo ga v skupino nitroimidazolnih protimikrobnih učinkovin. Odkrit je bil kot zdravilna učinkovina z antiprotozoičnim delovanjem, kasneje pa so ugotovili, da deluje baktericidno tudi na striktno anaerobne bakterije, predvsem G(-), ter G(+) bacile in koke. Danes ga uporabljajo za zdravljenje resnih okužb z anaerobnimi bakterijami, kot so septikemija, pljučnica, peritonitis, plevralne infekcije, abscesi in meningitisi [12]. V raziskavah zdravljenja parodontalne bolezni se je izkazal za zelo učinkovitega proti *Porphyromonas gingivalis* in *Prevotella inermida*. MIC metronidazola za ti dve bakteriji znaša 0,031 µg/ml, za bolj rezistentne bakterije pa je le-ta >8 µg/ml oz. >25 µg/ml [13]. Neučinkovit je proti fakultativnim anaerobom in striktnim aerobom. Deluje tako, da se kovalentno veže na DNA molekulo bakterije preko delno reducirane 5-nitro skupine in s tem zavira sintezo nukleinskih kislin. Ta delna redukcija metronidazola pa poteče le v anaerobnih celicah in prav zato ne deluje baktericidno na aerobne bakterije in človeške celice [12]. Vendar v zadnjih letih ugotavljajo, da ima potencialno kancerogeno delovanje (predvsem pri vdihavanju in dolgotrajnem uživanju), zato je potrebno s to učinkovino rokovati previdno in se pri tem ustrezno zaščititi z uporabo zaščitnih očal, maske s filtrom, rokavic in haljo [14].



Slika 2: Kemijska formula metronidazola.

Metronidazol je rahlo rumen kristaliničen prah. Je težko topen v vodi (topnost je 10 mg/ml pri 25°C), boljše pa je topen v kislih raztopinah, ker je šibka baza s pKa = 2,5. Nitro aromatska skupina ima namreč elektron privlačen efekt, zato pritegne prost elektronski par na dušiku imidazolnega obroča. Ta je posledično manj dovzeten za vezavo protona kot pri nesubstituiranih imidazolih [15, 16]. Dokazana je stabilnost vodnih raztopin metronidazola s pH vrednostmi od 2,0 do 6,0 kot tudi termostabilnost metronidazola, glede občutljivosti

na svetlobo pa so si raziskave nasprotujoče. *Wu Y in Fassihi R* sta ugotovila, da je raztopina metronidazola fotostabilna, medtem ko se v literaturi, Ph. Eur. in varnostnih listih navaja podatek o občutljivosti na svetlobo. Tudi v navodilih za uporabo parenteralnih raztopin z metronidazolom priporočajo shranjevanje le-teh zaščitene pred svetlobo [12, 14, 16, 17].

Kljub majhni topnosti metronidazola pa je njegova absorpcija pri peroralni uporabi zelo dobra. Ima velik volumen porazdelitve, kar omogoča doseg efektivnih koncentracij tudi v obzornih tkivih in gingivalni tekočini v parodontalnem žepu. Njegova biološka uporabnost je prav tako zelo dobra – le 20 % zaužitega odmerka se metabolizira v jetrih, predvsem z oksidacijo in glukoronidacijo. Aktiven je tudi 2-hidroksi metabolit [12].

Razvoj rezistence

Kadar zdravimo bolezen s protimikrobnimi učinkovinami je spopad z rezistenco neizogiben in nič drugače ni pri protimikrobnem zdravljenju parodontalne bolezni. Bakterije, ki povzročajo parodontalno bolezen, živijo v biofilmih – ekosistemih, v katerih so zaščitene pred fagocitozo in drugimi obrambnimi mehanizmi imunskega sistema, zunanji vplivi in tudi protimikrobnimi učinkovinami. Zato so MIC protimikrobnih učinkovin proti bakterijam v biofilmih od 100 do 1000-krat višje od koncentracij le-teh proti prosto gibajočim bakterijam, hkrati pa bakterije razvijejo še rezistenco oz. odpornost nanje. Znanstveniki predvidevajo naslednje mehanizme, s katerimi se parodontopatogene bakterije branijo pred protimikrobnimi učinkovinami:

- rast v biofilmih omogoča bakterijam visoko število mutacij in izmenjavo genov z zapisi za rezistenco na protimikrobne učinkovine;
- polimerno ogrodje, ki obdaja bakterije v biofilmu, preprečuje oz. upočasnjuje vstop protimikrobnih učinkovin in s tem poveča njihovo preživetje;
- zaradi velike raznolikosti biofilma, tudi z vidika dostopnosti hranil in kisika, se bakterije prilagajajo pogojem predvsem s prilagajanjem metabolične aktivnosti, kar terja še večjo raznolikost tudi znotraj iste vrste bakterij;
- bakterije razvijejo črpalni (efluks) sistem, ki črpa protimikrobno učinkovino iz bakterijske celice, in sistem za regulacijo izražanja genov glede na številčnost populacije bakterij (*»quorum-sensing systems«*) [4, 7].

Znano je tudi, da lahko subterapevtske koncentracije protimikrobnih učinkovin spodbudijo rast biofilmov. To je predvsem problematično v začetnih fazah zdravljenja, ko

še ni presežena MIC učinkovin in vzpostavljena njihova ravnotežna koncentracija v serumu, zato so začetni odmerki protimikrobnih učinkovin največkrat zelo veliki. Izjema je doksicilin, ki se namenoma uporablja tudi v subterapevtskih koncentracijah, ker so ugotovili, da na ta način kontrolirajo aktivnost metaloproteinaz, predvsem kolagenaz, in s tem zmanjšajo razgradnjo obzobnih tkiv [4, 7, 18]. Poleg tega so raziskovalci *Naoko Takahashi et. al.* v *in vitro* študiji ugotovili, da je kar nekaj protimikrobnih učinkovin učinkovitih le v zgodnjih fazah nastajanja biofilmov [18], kar se ujema z ugotovitvami drugih, da je protimikrobno zdravljenje bolj učinkovito v kombinaciji s predhodnim mehanskim čiščenjem zobnih oblog. Posledično je iz vseh teh razlogov (protimikrobno) zdravljenje parodontalne bolezni danes še vedno izziv in predmet raziskovanj [4, 5, 9].

1.2 NANOVLAJNA

Nanovlakna (NV) so vlakna z nanometrskim premerom in teoretično neomejeno dolžino. Njihova posebnost je ta, da imajo veliko površino na enoto mase, relativno nizko gostoto in velik skupen volumen por. Vse te lastnosti NV koristno izkoriščajo pri izdelavi najrazličnejših izdelkov in načrtovanju njihove uporabe. Danes so med drugim že komponenta filtrov, tekstilnih izdelkov, elektronskih aparatov, sončnih sistemov in sistemov za shranjevanje energije ter informacijskih sistemov, ki jih vsakodnevno uporabljamo. Največji razvoj pa trenutno poteka v medicini in farmaciji, kjer NV predstavljajo potencialen material za vsadke in dostavne sisteme zdravilnih učinkovin. Njihovo uporabo načrtujejo na področju tkivnega inženiringa, celjenja ran ter kot komponento medicinskih tekstilnih materialov [19–21].

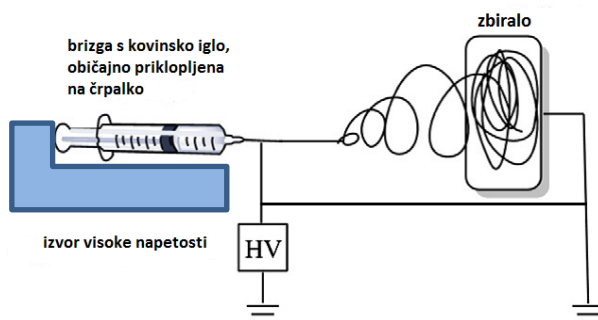
Uporaba na tako zelo različnih področjih pa je mogoča zato, ker lahko z izdelavo spreminjamo sestavo, poroznost, debelino in urejenost NV. Trenutno so najbolj uporabljene naslednje metode njihove izdelave: fazna separacija (*»phase separation«*), spontana tvorba (*»self-assembly«*), sukanje talin z vročim zrakom (*»melt blowing«*) in elektrostatsko sukanje (*»electrospinning«*), od katerih je slednja najpogosteje uporabljena, najenostavnejša in finančno najsprejemljivejša [19, 21, 22, 23].

1.2.1 Izdelava nanovlaken – elektrostatsko sukanje

Elektrostatsko sukanje je metoda, s katero iz polimernih raztopin, talin ali emulzij izdelujejo vlakna nano- ali mikrometrskih premerov. Naprava je sestavljena iz izvora

visoke napetosti, brizge s kovinsko iglo, črpalke in zbirala (slika 3). Brizga, napolnjena s polimerno raztopino, je povezana s črpalko, ki zagotavlja konstanten tok tekočine, kovinska igla pa je priklopljena na visoko napetost, ki ustvarja močno električno polje. Zaradi slednjega se na površini kapljice na konici igle ustvari naboj. Ko naboj oz. električna sila preseže površinsko napetost kapljice, se ta preoblikuje v t.i. *Taylorjev stožec*, ki se naprej razpotegne v enega ali več curkov z nabojem. Med potovanjem curka/curkov do zbirala, ki ima nasproten naboj kot curek/curki, topilo izhlapi in na zbiralu dobimo posušena NV. Shematsko opisan postopek prikazuje slika 3 in to je osnovni proces elektrostatskega sukanja, s katerim izdelujejo homogena NV. Iz osnovnega procesa pa so razvili več podvrst te metode, ki med drugim omogočajo izdelavo NV z jedrom in ovojnico [21, 23, 24, 25]. Parametre elektrostatskega sukanja, ki vplivajo na lastnosti izdelanih NV, delimo na:

- lastnosti polimerne raztopine (vrsta in koncentracija polimera, molekulska masa polimera, viskoznost raztopine, površinska napetost in prevodnost);
- lastnosti okolja, v katerem izdelujejo NV (temperatura in relativna vlažnost);
- procesne parametre (aplicirana napetost, razdalja med iglo in zbiralom, pretok raztopine, oblika in debelina igle, nameščenost zbirala in njegova geometrija) [19, 21].



Slika 3: Postopek elektrostatskega sukanja [24].

1.2.2 Materiali za izdelavo nanovlaken

NV najpogosteje izdelujejo iz polimernih raztopin, redkeje pa tudi iz talin in emulzij. Raztopine so lahko pripravljene iz sinteznih ali naravnih polimerov, uporabljajo pa se tudi kombinacije obojih. Prednost sinteznih polimerov je, da so njihove lastnosti, sinteza in struktura zelo prilagodljive, a sta njihova kompatibilnost in afiniteta s celicami v naravnem

okolju veliko slabši v primerjavi s naravnimi polimeri. Vzrok za to sta manjša hidrofilnost in manjše število prepoznavnih mest za celice. Naravni polimeri so veliko bolj biokompatibilni, manj imunogeni in klinično bolj funkcionalni, ker gre med drugim tudi za komponente, ki so naravno prisotne v našem telesu. A nekateri sintezni polimeri so lahko prav tako biorazgradljivi kot naravni, celo več – biorazgradljivost lahko nadzorujemo s sintezni parametri, zato se v medicini in farmaciji za elektrostatsko sukanje NV največkrat uporablja kombinacija naravnih in sinteznih polimerov, da se zadosti čim večim želenim lastnostim končnega izdelka [23, 24]. Najpogosteje uporabljeni polimeri za elektrostatsko sukanje so:

- naravni: alginat, celuloza, hitosan (CH), hialuronska kislina, kolagen, heparin;
- sintezni: polimlečna kislina, polikaprolakton, kopolimer polimlečne kisline in polikaprolaktona, kopolimer polimlečne in poliglikolne kisline, polivinilpirolidon, polietilenoksid (PEO), polivinilacetat (PVA) [20, 23, 24].

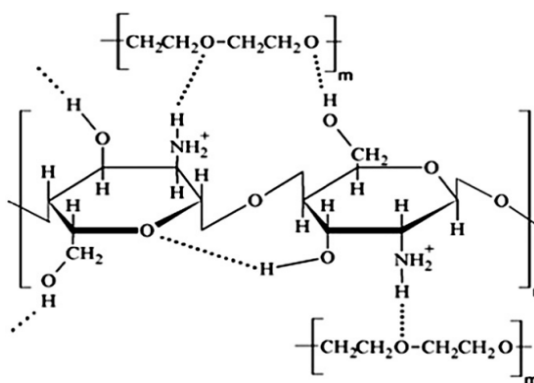
Hitosan in polietilenoksid

CH, ki je polsintezni kopolimer, sestavljajo glukozaminske in N-acetil-D-glukozaminske enote povezane z $\beta(1-4)$ vezjo. Pridobivajo ga z delno deacetilacijo hitina, ki ga v naravi najdemo v oklepih rakov, zunanjem ogrodju insektov in nekaterih gobah. Je dokazano biokompatibilen, biorazgradljiv in za telo ne predstavlja antigena. Ugotovili so tudi, da ima že sam po sebi protibakterijsko, antimikotično in po nekaterih podatkih tudi protitumorno delovanje, zato je njegova uporaba v medicini in farmaciji zelo razširjena. Prav tako so za uporabo ugodne njegove fizikalno-kemijske lastnosti. Ker je polikation – ima prosto amsko skupino, je zmožen tvorbe ionskih vezi, z drugimi biološkimi molekulami pa se lahko poveže tudi z vodikovimi vezmi in medmolekulskimi interakcijami, kar se kaže v sposobnosti bioadhezije in pospeševanju absorpcije. Prisotne so tudi intra- in intermolekulske vodikove vezi znotraj oz. med molekulami CH, zato ima le-ta rigidno kristalno strukturo [26, 27].

Zaradi vseh teh ugodnih lastnosti je CH potencialen material za izdelavo NV, a ta rigidna tridimenzionalna mreža je vzrok, da so za izdelavo le-teh potrebne visoke koncentracije polimera. Taka, koncentrirana raztopina CH pa je zelo viskozna in je zato ni mogoče uporabiti za elektrostatsko sukanje. Rešitev je priprava zmesi CH in PEO oz. katerega drugega polimera (npr. PVA), ki izboljša možnost tvorbe NV. PEO je prav tako biorazgradljiv in biokompatibilen, a sintezni polimer, ki ga je dovoljeno uporabljati v

živilih, kozmetičnih pripravkih in farmacevtskih izdelkih. PEO z amsko in hidroksilno skupino CH tvori vodikove vezi in s tem delno poruši intra- in intermolekularne interakcije med verigami tega polimera (slika 4), s čimer zmanjša rigidnost strukture CH in olajša tvorbo NV. Največkrat se za doseg tovrstnega učinka uporablja masno razmerje CH in PEO 1:1 [22, 28, 29].

Omeniti je potrebno še vpliv stopnje deacetilacije in molekulske mase CH na njegovo topnost ter hitrost razgradnje. Nizka molekulska masa pri CH pomeni med 20 in 190 kDa in s stopnjo deacetilacije < 75 %, med tem ko je visoka molekulska masa med 190 in 375 kDa s stopnjo deacetilacije > 75 %. CH je topen le v kislih vodnih raztopinah, ker pride do protonacije amske skupine in nastanka ionizirane oblike. Mejni pH, pri katerem pride do deprotonacije amskih skupin CH in nastanka netopne oblike, pa je zelo odvisen od stopnje deacetilacije, saj npr. pri 40 % stopnji deacetilacije postane polimer netopen šele pri pH > 9,0, med tem ko je ta vrednost pH pri 85 % stopnji deacetilacije okoli 6,5. S padanjem stopnje deacetilacije se prav tako povečuje tudi hitrost razgradnje CH. Hitra razgradnja pri nižji stopnji deacetilacije je povezana z manj interakcijami med samimi molekulami CH in drugimi biološkimi molekulami, ker je na razpolago manj amskih skupin za tvorbo vezi. Stabilnost polimera pa je velikega pomena tudi z vidika varnosti, saj pride pri hitri razgradnji do akumulacije aminosaharidnih ostankov v telesu, ti pa lahko povzročijo vnetno reakcijo. A obratno visoka stopnja deacetilacije še ne pomeni zmanjšane toksičnosti, vendar CH kljub temu uvrščamo med varne in netoksične substance, ker je njegov LD₅₀ pri miših ob zaužitju večji od 16 g/kg. Poleg varnosti pa njegovo uporabnost na zelo različnih področjih poveča še zmožnost tvorbe različnih derivatov s pripenjanjem reaktivnih skupin na mestu proste amske skupine, saj se s tem še dodatno prilagajajo lastnosti materiala glede na potrebe in zahteve želenega produkta [26, 27].



Slika 4: Vodikove vezi med CH in PEO [28].

1.2.3 Vpliv lastnosti polimernih raztopin na izdelavo nanovlaken

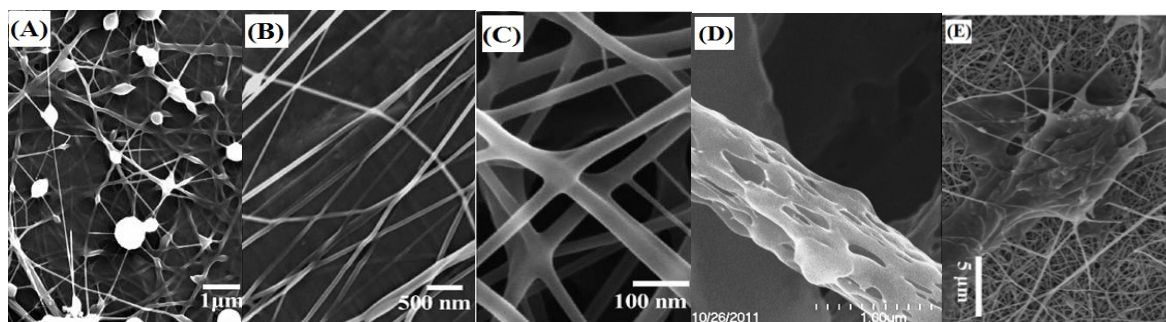
Raztopina polimera z ustrezno zdravilno učinkovino je osnovni material za izdelavo NV za uporabo v farmaciji in medicini. Ker le-ta nastajajo pod vplivom visoke napetosti, so najpomembnejše lastnosti polimerne raztopine električna prevodnost, površinska napetost in viskoznost, saj vplivajo na nastajanje in končno morfologijo NV. Polimernih raztopin z zelo nizko električno prevodnostjo in dielektrično konstanto ni mogoče uporabiti za elektrostatsko sukanje, ker se na površini kapljice polimerne raztopine na koncu kovinske igle ne ustvari naboj in posledično iz nje ni možna tvorba Taylorjevega stožca, ta pa je ključen za tvorbo NV. Podobno je pri polimernih raztopinah z zelo visoko električno prevodnostjo. V tem primeru je električno polje prešibko, da bi ustvarilo naboj na površini kapljice, zato je tvorba Taylorjevega stožca prav tako onemogočena. V splošnem pa velja, da večja prevodnost polimerne raztopine omogoča nastanek tanjših NV z manj vozli – zadebelitvami te nitaste strukture. Kot kažejo raziskave naj bi na tvorbo vozlov vplivala tudi površinska napetost raztopine, in sicer naj bi zmanjšanje le-te povzročilo povečano tvorbo vozlov, a zanesljivih dokazov za potrditev te trditve še ni. Dokazano pa je, da bolj kot je polimerna raztopina viskozna, debelejša NV nastajajo in več vozlov je opaznih v njihovi strukturi [19, 21, 23]. Posledično ima ta parameter tudi svojo zgornjo mejo, saj preveč viskoznih raztopin ni mogoče uporabiti za elektrostatsko sukanje, ker ne pride do tvorbe NV. Tak primer polimerne raztopine je raztopina CH, kateri se za zmanjšanje viskoznosti dodaja PEO ali PVA oz. njima podobni polimeri, ki s tvorbo vodikovih vezi s CH prekinejo intra- in intermolekularne vodikove vezi znotraj molekule CH ali med njimi. Dodatek PEO k CH pa ima poleg vpliva na viskoznost tudi vlogo zmanjšanja prevodnosti te polimerne raztopine. CH je namreč polikation in ta močan pozitiven naboj je vzrok za destabilizacijo curka polimerne raztopine v fazi elongacije le-tega. Kaže se kot eksplozije curka in njegova nelinearnost med potovanjem do zbirala. Na slednjem posledično nastajajo le kapljice in ne NV. PEO zmanjša pozitiven naboj s tvorbo vodikovih vezi ter s tem pripomore k bolj enakomernemu nastajanju NV [28, 29].

Pri načrtovanju izdelave NV pa ne smemo pozabiti na to, da k lastnostim polimerne raztopine prispeva tudi zdravilna učinkovina in bodo le-te pri polimerni raztopini z učinkovino lahko drugačne kot pri enaki raztopini brez učinkovine. Poleg tega se vse lastnosti s časom tudi spreminjajo zaradi sprememb v strukturi polimera ali katere koli druge sestavine polimerne raztopine. Na nek način lahko govorimo o roku uporabnosti raztopine, ker gre največkrat za take spremembe, da njene lastnosti ne omogočajo več

nastajanja NV pod vplivom visoke napetosti. Tudi ta pojav lahko predstavimo na primeru raztopine CH in PEO, ker je znano, da s časom pride do sprememb v konformaciji CH, do agregacije verig obeh polimerov ter njihove encimske in mehanske razgradnje. Lahko pride celo do razslojitve polimerne disperzije in nastanka dveh faz zaradi drastičnega padca viskoznosti v eni fazi. Z vsemi temi spremembami pa raztopina CH in PEO izgubi sposobnost tvorbe NV pod vplivom visoke napetosti. Zato je smiselno spremljanje lastnosti raztopin tudi skozi daljše časovno obdobje, da se ugotovi njihova stabilnost [28].

1.2.4 Vrednotenje lastnosti nanovlaken

Naslednji korak, ki logično sledi izdelavi NV, je vrednotenje njihovih strukturnih lastnosti. Ker gre za nanometrijske velikosti, je pogled NV mogoč le z mikroskopom in rutinsko se za vrednotenje njihovih lastnosti uporablja *vrstični elektronski mikroskop* (SEM). SEM za raziskovanje površine uporablja curek elektronov, ki potujejo po vzporednih črtah po vzorcu. Pri tem pride do interakcij z atomi vzorca in nastanka sekundarnih elektronov. Intenziteta sekundarnih elektronov je odvisna od kemijske sestave vzorca ter stanja površine na preiskovanem območju in z detekcijo teh elektronov se izoblikuje slika, ki jo vidimo. Preko SEM slik največkrat preiskujemo debelino NV, njihovo površino (gladkost, prisotnost vozlov) in poroznost, kasneje pa tudi njihovo obnašanje v celičnem okolju (*slika 5*) [23, 30].



Slika 5: Slike prikazujejo NV posneta z SEM. (A) NV z vozli, (B)-(C) gladka NV pod različno povečavo, (D) porozno NV, (E) celica na NV [22, 31].

S SEM je mogoče videti tudi morebitno kristalizacijo na površini NV. Ker v tem primeru rezultate podajamo na podlagi slike, so le-ti zelo subjektivni, zato se za opis fizikalnega stanja učinkovine in uporabljenih polimerov uporablja diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC). Iz termograma, ki je rezultat termične analize vzorca, lahko

objektivno določimo fizikalno stanje učinkovine in polimerov, medtem ko je ta metoda primerna tudi za opazovanje fizikalnih sprememb NV skozi čas. Za vrednotenje lastnosti NV lahko posnamemo še FT-IR spektre, s katerih so razvidne interakcije med učinkovino in polimeri, uporabljenimi za izdelavo NV [23, 32].

Kadar so NV izdelana iz nabrekajočega in hidrofilnega polimera, vrednotimo tudi stopnjo nabrekanja NV in izgubo mase pri sušenju. Gre za preprosta poskusa, ki vključujeta sušenje in nabrekanje NV v pufru ali vodi z vmesnimi tehtanji njihove mase, dobljeni rezultati pa nam pomagajo pri določanju mehanizma sproščanja učinkovine iz njih [33].

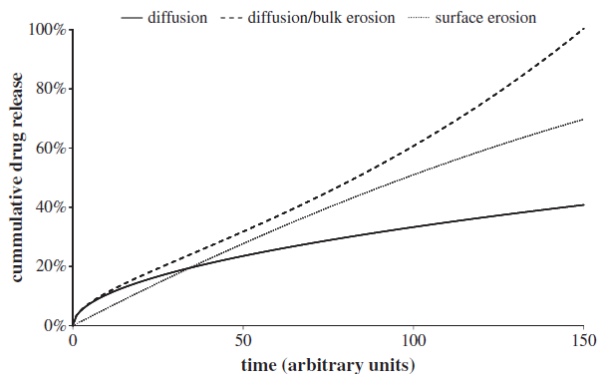
1.3 NANOVLAKNA KOT FARMACEVTSKA OBLIKA

Raziskovalci intenzivno preučujejo NV kot nanodostavni sistem za tkivni inženiring in pomoč pri regeneraciji tkiva, ker je poseben potencial nanovlaken je prav v njihovi specifični strukturi. Ta je zelo podobna zunjaceličnemu ogrodju, npr. kolagenu ali fibronektinu, zato se podporne celice na njih lažje oprimejo in razmnožujejo. Hkrati lahko NV sproščajo tudi različne učinkovine, kot npr. protimikrobne učinkovine ali rastne dejavnike, in tako omogočajo lokalno zdravljenje poškodovanega mehkega tkiva ali kostnine. Pogosto pa so pore med NV premajhne, da bi omogočale vraščanje celic v notranjost NV, zato imajo še funkcijo bariere in preprečujejo vraščanje fibroblastov na mesto poškodbe [22, 31, 32, 34].

Če se vrnemo k parodontalni bolezni, kjer gre prav tako za lokalno uničenje obzobnega tkiva in nastanek obzobnih žepov zaradi okužbe z bakterijami, bi bilo idealno zdravljenje lokalno, se pravi z vnosom farmacevtske oblike neposredno v obzobni žep. NV bi to lahko omogočala, ker so majhna, hkrati pa je možen velik delež vgradnje učinkovine vanje, kar pomeni, da potrebujemo zelo majhno količino NV, da dosežemo želen terapevtski učinek. Poleg tega je pri zdravljenju parodontalne bolezni zaželeno, da se protimikrobna učinkovina najprej hitro sprosti iz farmacevtske oblike v taki količini, da koncentracija preseže MIC, ker s tem uničimo vse parodontopatogene bakterije v eksponentni fazi rasti. V nadaljevanju naj bi se sproščanje učinkovine upočasnilo in skupno trajalo od 7 do 14 dni. S tem bi se vzdrževala ustrezna koncentracija protimikrobne učinkovine in uničila še vse morebitne bakterije, ki so preživele prvo stopnjo sproščanja le-te, ker so bile v latentni dobi razvoja ali pa so bolj odporne na protimikrobno učinkovino. Tudi z vidika opisanega

profila sproščanja so NV oblika, ki bi omogočala tako sproščanje zdravilne učinkovine, saj lahko le-tega prilagajamo s parametri njihove izdelave [4, 11, 32].

Eden ključnih parametrov pri izdelavi NV je izbira polimera. Za zdravljenje parodontalne bolezni imajo prednost biorazgradljivi polimer, ker je že samo vstavljanje NV v obzobne žepe stresno in boleče za bolnika, zato bi bilo odstranjevanje le-teh ob koncu terapije še bolj neprijetno in hkrati zopet destruktivno za tkivo, ki se je komaj dobro začelo celiti in obnavljati [19, 21, 23]. A tovrstna izbira ima za posledico tudi svojevrstno sproščanje zdravilne učinkovine. Iz biorazgradljivih NV se učinkovina sprošča z difuzijo, hkrati pa potekata tudi razgradnja in erozija polimera, ki prav tako prispevata k hitrosti sproščanja le-te. Glavno gonilo difuzije je koncentracijski gradient med notranjostjo NV in zunanjim medijem, ki povzroči tudi hitro začetno sproščanje učinkovine. A molekule vode počasi penetrirajo v notranjost NV, polimer se omoči in hidratira ter posledično NV na površini nabreknejo. Tako je hitrost sproščanja učinkovine odvisna še od sposobnosti difuzije le-te preko nabrekajoče plasti. Polimer v nabreklem stanju vzdržuje sproščanje učinkovine, vendar se tudi postopno razgrajuje in erodira, kar zmanjšuje njeno difuzijsko razdaljo. Skupno gledano je profil sproščanja učinkovine iz biorazgradljivih NV linearen, kar prikazuje graf na *sliki 6*. Vendar o takih mehanizmih sproščanja lahko govorimo le, če je učinkovina enakomerno porazdeljena v NV. A vgradnja le-te v NV ni vedno idealna in nekaj učinkovine velikokrat izkristalizira na njihovi površini, še posebej pri visokih deležih vgradnje. Posledično največkrat z biorazgradljivimi NV dosežemo tak profil sproščanja učinkovine, kot da se le-ta sprošča le z difuzijo, kar pa je, kot smo že omenili, zaželeno pri zdravljenju parodontalne bolezni [4, 11, 24, 35]. Seveda na sproščanje učinkovine vplivajo še drugi parametri izdelave NV, predvsem so to tehnike elektrostatskega sukanja ter vsi procesni parametri in vse lastnosti polimera (npr. napetost, pretok, temperatura, relativna vlažnost, koncentracija polimera, viskoznost in prevodnost polimerne raztopine,...), od katerih je odvisna debelina NV in posledično njihova celokupna površina, ker večja kot je površina, hitrejša je sproščanje učinkovine [21, 23, 24, 35].



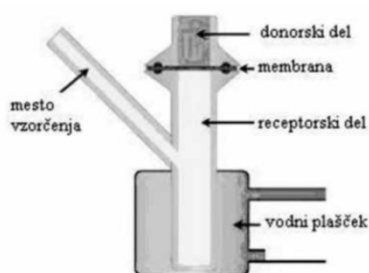
Slika 6: Primerjava profilov sproščanja glede na mehanizem sproščanja zdravilne učinkovine – difuzija, »bulk« erozija in površinska erozija [35].

1.3.1 *In vitro* sproščanje zdravilne učinkovine iz nanovlaken

Zdravilo predstavlja določena farmacevtska oblika, ki s svojo sestavo omogoča aplikacijo in dostavo zdravilne učinkovine na želeno mesto delovanja, vnaprej predviden način sproščanja te učinkovine in njeno delovanje. Kljub dobrim načrtom pri razvoju farmacevtskih oblik, se začetni poskusi obnašanja le-teh v fiziološkem okolju in sproščanja učinkovin izvajajo *in vitro*. Pri tem skušamo čim bolj posnemati fiziološke pogoje, predvsem s količino medija, njegovim pH, sestavo in temperaturo ter različnimi mehanskimi silami [36]. Če načrtujemo NV s protimikrobno učinkovino kot farmacevtsko obliko za zdravljenje parodontalne bolezni, to pomeni, da je njihovo mesto aplikacije parodontalni žep. Slednji je globok od nekaj milimetrov do več kot 5 milimetrov in je napolnjen z gingivalno tekočino (0,4 – 1,5 μL) [11]. Vendar še vedno gre za razmeroma majhno količino tekočine, ki pa je po sestavi podobna ekstracelularnim tekočinam, zato lahko pri *in vitro* poskusu sproščanja za medij izberemo le nekaj mililitrov ustreznega pufrja s $\text{pH} \approx 7$, ki ga termostatiramo na 37 °C in konstantno mešamo. Tak sistem zelo preprosto sestavimo iz osnovne laboratorijske opreme, lahko pa uporabimo tudi npr. Franzove celice ali podobne sisteme [5, 11, 13, 36].

Franzova celica (slika 7) je *in vitro* sistem, ki ga najpogosteje uporabljamo za testiranje dermalne absorpcije. Sestavljena je iz donorskega dela, kamor se vstavi zdravilno učinkovino ali farmacevtsko obliko, in receptorskega dela, ki je napolnjen z izbranim medijem, ki se konstantno meša, lahko pa je tudi termostatiran. Oba dela ločuje membrana. Ta je lahko umetna ali naravna. Slednje se uporabljajo predvsem za testiranje dermalnih pripravkov, polimerne in filtrske membrane pa za spremljanje sproščanja učinkovine iz

ostalnih farmacevtskih oblik. Umetne membrane v tem primeru ne predstavljajo difuzijske bariere, temveč zgolj fizično ločujejo donorski del od receptorskega medija. Receptorski del ima izdelano tudi mesto za vzorčenje, preko katerega v določenih časovnih intervalih jemljemo vzorce za analizo [36, 37]. A dober *in vitro* sistem nima pomena brez ustrezne analizne metode za vrednotenje koncentracije sproščene učinkovine iz preiskovane oblike. V ta namen se najpogosteje uporabljata tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in *absorpcijska spektroskopija v ultravijoličnem in vidnem območju (UV-VIS)*.



Slika 7: Franzova difuzijska celica [37].

UV-VIS je enostavna, hitra in poceni metoda za določanje koncentracije snovi v raztopini. Temelji na merjenju absorbirane svetlobe pri prehodu le-te skozi vzorec. Je relativna tehnika, zato koncentracijo analita določimo posredno z metodo umeritvene krivulje ali z metodo standardnega dodatka. Največjo slabost te metode pa predstavljajo motnje drugih komponent v vzorcu, ki lahko prav tako absorbirajo svetlobo pri izbrani valovni dolžini. Pred uporabo metode se moramo zato prepričati, da vzorec takih snovi ne vsebuje ali pa odstranimo ali maskiramo take spojine, ki bi motile določitev preiskovane substance [36, 38].

Tako je lahko izbira ustreznega *in vitro* sistema in analizne metode že zelo dober pokazatelj obnašanja farmacevtske oblike v fiziološkem okolju. *In vitro* poskusi so prva izbira tudi zaradi večje finančne sprejemljivosti in lažje ponovljivosti, ker nam rezultati teh poskusov šele omogočijo dodelavo načrta farmacevtske oblike, pokažejo resničnost naših predvidevanj in nam dajo morebitne iztočnice za nadaljnje *in vivo* poskuse [36].

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je razviti biorazgradljiva NV s podaljšanim sproščanjem metronidazola *in vitro* od 5 do 7 dni za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni in uporabiti Franzove celice kot nov *in vitro* model za boljše ponazarjanje obzobnega žepa. NV smo namreč prepoznali kot potencialno ustrezen dostavni sistem, saj bi delovala kot zdravilo in hkrati mehansko pomagala pri celjenju tkiva. Poleg tega pa odstranitev oblike po sproščeni celotni količini zdravilne učinkovine ne bi bila potrebna, ker bi se le-ta razgradila. Tako so cilji našega raziskovalnega dela naslednji:

1. Izdelati NV s postopkom elektrostatskega sukanja iz CH in PEO, ki sta biorazgradljiva in biokompatibilna polimera. Uporabili bomo kombinacijo dveh polimerov, saj raztopine samega CH ni mogoče uporabiti za elektrostatsko sukanje zaradi njene viskoznosti. S SEM bomo spremljali spreminjanje debeline NV in njihove vozlatosti glede na pogoje elektrostatskega sukanja in izbrali najoptimalnejše. Zaradi hidrofilnosti polimerov jih bomo izdelali pri konstantni relativni vlažnosti (RH) okolja. NV izdelana pri optimalnih pogojih, bomo ovrednotili z vidika njihove debeline, vozlatosti, sposobnosti nabrekanja, izgube mase pri sušenju in spreminjanja oblike skozi čas. Proučili bomo tudi vpliv električne prevodnosti polimernih raztopin na nastajanje NV pri danih pogojih sukanja.
2. Pri izbranih pogojih elektrostatskega sukanja v NV vgraditi čim večji delež metronidazola, protimikrobne učinkovine, ki se uporablja za zdravljenje parodontalne bolezni. Hkrati bomo še vedno spremljali debelino in vozlatost NV ter s tem ustreznost izbranih pogojev sukanja.
3. Razviti analizo metodo za detekcijo sproščenega metronidazola iz NV. Prva izbira je UV-VIS, zaradi enostavnosti, a če bo kateri od polimerov absorbiral pri izbrani valovni dolžini in motil meritve absorbance metronidazola, bomo uporabili HPLC.
4. Razviti *in vitro* sistem za poskus sproščanja metronidazola iz NV. Sistem mora čim boljše simulirati pogoje v parodontalnem žepu, zato bomo uporabili termostatisirane Franzove celice, membrano, za katero bomo dokazali, da minimalno vpliva na prehod metronidazola med donorskim in receptorskim delom celice, in fosfatni pufer PBS, ki je po sestavi podoben gingivalni tekočini.
5. Ovrednotiti rezultate sproščanja metronidazola iz novo razvitih NV iz CH/PEO za nadaljnji razvoj kot farmacevtske oblike za zdravljenje parodontalne bolezni.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

- sestavine za izdelavo 50 mM fosfatnega pufra PBS s pH = 6,8: KH_2PO_4 (Merck, Nemčija), NaOH (Merck, Nemčija)
- destilirana voda (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
- brezvodna očetna kislina za pripravo 3 % vodne raztopine očetne kisline (CARLO ERBA reagents, Francija)
- metronidazol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- CH, nizkomolekularni (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- PEO s povprečno molekulsko maso 900 kDa (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.2 NAPRAVE IN DRUGA LABORATORIJSKA OPREMA

- steklen inventar: merilne bučke, polnilne pipete, čaše, erlenmajerice z obrusom, tehtalni čolniček, petrijevke (premer 9 cm), objektna in krovna stekelca (2,2 x 2,2 cm)
- ostali inventar: plastične kapalke, injekcijske brizge, nastavki za polavtomatske pipete, filtri za filtriranje vodnih raztopin preko injekcijske brizge (Sartorius RC 0,45 μm), tehtalni čolnički, plastične petrijevke (premer 9 cm), parafilm, obojestranski prevodni lepilni trak (širina 8 mm), zaščitne rokavice in maska s filtrom
- pH meter (SevenCompact, Mettler Toledo, ZDA) z elektrodo (InLab[®] Expert Pro-ISM pH, Mettler Toledo, ZDA)
- UV-VIS spektrofotometer (HEWLETT PACKARD 8453, Agilent Technologies, ZDA)
 - programska oprema: 845x UV-Visible System, UV-Vis ChemStation Software, Agilent Technologies, ZDA
 - kivetni (Micro-Cell 100-QS in Semi-Micro Flowing cell 108F-QS, Hellma Analytics, Nemčija)
- polavtomatske pipete (Biohit mLine, Kemomed, Slovenija)
- tehtnici (XS205 Dual Range, Mettler Toledo, ZDA in Sartorius M-Pact, AX 244, Sartorius, Nemčija)

- magnetna mešala (IKA[®] RCT basic safety control in IKA[®] – WERKE RO15 power, Nemčija)
 - magnetno mešalo v termostatirani vodni kopeli (mešalo: Variomag Telesystem, Thermo electron corporation, ZDA; termostatiran grelnik: ED Julabo, Nemčija)
- ultrazvočna kadička (Sonis 4, Iskra PIO d.o.o., Slovenija)
- rotor-stator homogenizator (IKA T25 digital Ultra-Turrax[®], Nemčija)
- naprava za elektrostatsko sukanje:
 - plastična komora z ventilatorjem (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija)
 - silikagel (Merck, Nemčija)
 - črpalka (R-99E, RazelTM, Italija)
 - plastična brizga, 20 ml (Injekt[®] Solo, Luer Lock 20 ml, B-Braun, ZDA)
 - kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm (Linari Engineering, Italija)
 - planarno kovinsko zbiralo
 - aluminijasta folija (Alu-Laborfolie, 0,030 mm x 300 mm, behr Labor-Technik GmbH, Nemčija)
 - izvor visoke napetosti (HVG-P60-R-EU, Linari Engineering, Italija)
 - merilec relativne vlažnosti in temperature (TFX 420 Precision Core Thermometer, Ebro, Nemčija)
 - mrežica Tegaderm (Tegaderm Contact, 7,5 cm x 20 cm, 3M, ZDA)
- sušilnik (SP-45, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- 4 Franzove difuzijske celice
- filtri, uporabljeni v Franzovih celicah
 - DURAPORE[®] Membrane Filters, tip: 0,1 µm, VVPP; Millipore, ZDA
 - Spectra/Por molecularporous membrane tubing, MWCO: 12-14 000, nominal flat width: 25 mm, diameter: 16 mm, vol/length: 2,0 ml/cm; Spectrum Laboratories, ZDA
 - Cellulose Acetate (CA) Membrane Filter 11106-50-N, 50 mm diameter, 0,45 µm pore size, hydrophilic filter membrane, circle disc; Sartorius, Nemčija
- svetlobni mikroskop (Olympus BX50, Japonksa)
 - kamera (Power HAD 3CCD Color Video Camera, Sony, Japonska)
 - programska oprema: analySIS[®], Soft Imaging System GmbH, Nemčija)

- vrstični elektronski mikroskop (Supra 35 VP, Carl Zeiss, Švica)
- računalniški program za merjenje premera nanovlaken (ImageJ 1.48; Java 1.6.0_20 [64-bit], NIH Image, ZDA)
- naprava za merjenje prevodnosti raztopin (elektroda: Mettler Toledo InLab730 Conductivity; konduktometer: Mettler Toledo MC226 Conductivity Meter, Mettler Toledo, ZDA)

3.3 IZDELAVA NANOVLAKEN

3.3.1 Priprava polimernih raztopin

Za pripravo 4 oz. 5 % (m/m) raztopine CH in 4 oz. 5 % (m/m) raztopine PEO smo najprej natehtali ustrezno količino posameznih polimerov. V erlenmajerico z obrusom smo do želene celokupne količine polimerne raztopine dodali 3 % (V/V) raztopino očetne kisline. Erlenmajerici smo nato zaprli in ju vpeli na magnetni mešali ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Na dan uporabe polimernih raztopin – najpogosteje naslednji dan od priprave zaradi stabilnosti raztopin, smo v široko epruveto najprej natehtali ustrezno količino metronidazola, upošteva je predviden delež vgrajene učinkovine v suhih NV ter v razmerju 1:1 dodali 4 oz. 5 % (m/m) raztopino CH in 4 oz. 5 % (m/m) raztopino PEO. Tako pripravljene zmesi smo mešali na rotor-stator homogenizatorju 10 min na 10 000 obratih/min. S tem smo dobili 4 oz. 5 % (m/m) raztopino CH/PEO z 0,5, 1,0, 5,0 ali 15,0 % vgrajenega metronidazola glede na suha NV, ki je bila pripravljena za elektrostatsko sukanje. V začetnih fazah poskusov in za določena vrednotenja NV smo uporabljali prazna NV, kar pomeni, da niso imela vgrajenega metronidazola. Pri pripravi polimernih raztopin pa to pomeni, da v epruveto nismo natehtali metronidazola, ampak le raztopini CH in PEO v razmerju 1:1.

Ker se je tekom dela izkazalo, da je tehtanje metronidazola v majhnih količinah (nekaj mg) zelo težavno in nenatančno, smo v nadaljevanju raztopine pripravljali tako, da smo v erlenmajerico v razmerju 1:1 natehtali posamezna polimera, jima dodali posebej natehtan metronidazol ter s 3 % (V/V) očetno kislino dopolnili do želene mase polimerne raztopine. Pri tem smo poskrbeli, da smo metronidazol prenesli ekvivalentno. Tako pripravljeno zmes smo pustili čez noč mešati pri sobnih pogojih na magnetnem mešalu s čim večjim mešalom.

3.3.2 Elektrostatsko sukanje nanovlaken

Lastnosti NV, izdelanih z elektrostatskim sukanjem, so zelo odvisne od temperature in RH, zato je bilo ključno, da je proces izdelave potekal pri kontroliranih pogojih, kar smo dosegli v komori iz debelega pleksi stekla, narejeni na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo. V komori smo zagotovili RH pod 20 % s presušenim silikagelom, ki se je sušil čez noč v sušilniku na 60°C in nato pri 220°C vsaj še 1 uro in 30 min pred samim sukanjem. Iz sušilnika smo silikagel prenesli neposredno v komoro in ustrezna RH se je vzpostavila v približno 20 min, medtem ko je temperatura med sukanjem postopno padala od 35°C do 23°C zaradi ohlajanja silikagela. RH in temperaturo smo v komori spremljali s pomočjo higrometra.

Polimerno raztopino, pripravljeno po postopku opisanem zgoraj, smo napolnili v 20 ml plastično brizgo s kovinsko iglo z notranjim premerom 0,8 mm. Zaradi nizkih pretokov raztopine med postopkom izdelave je za količinsko sukanje zadostovalo od 5 do 10 ml polimerne raztopine. Pretok za sukanje 4 (m/m) % raztopine CH/PEO je znašal 0,495 ml/h, za sukanje 5 % (m/m) raztopine CH/PEO pa 0,354 ml/h, ne glede na to ali je raztopina vsebovala metronidazol ali ne. Po vstavitvi brizge v črpalko smo kovinsko iglo priključili na izvor visoke napetosti. Sukanje je potekalo pri 21 kV. Ozemljitev smo pripeli na zbiralo, ki je bilo ovito z Alu-folijo. Ko smo ugotovili, da je NV iz CH in PEO zelo težko odstraniti iz Alu-folije, smo nanjo pred sukanjem z obojestranskim prevodnim lepilnim trakom nalepili še mrežico Tegaderm. Ta je bila približno take velikosti, kolikršna je bila običajno lisa NV na Alu-foliji (cca. 7,5 x 7,5 cm). Na Alu-folijo smo pred začetkom sukanja nalepili tudi krovno stekelce in ko se je na njem nabralo dovolj NV, smo pod svetlobnim mikroskopom preverili nastanek NV. Šele nato smo postopek sukanja nadaljevali. Razdalja med konico igle in zbiralom je znašala 18 cm. Količinsko sukanje, se pravi sukanje NV za vzorce za poskuse sproščanja in druge poskuse, ki so zahtevali večjo količino NV, je trajalo pri 4 % (m/m) raztopini CH/PEO od 4 do 5 ur, pri 5 % (m/m) raztopini CH/PEO pa vsaj 6 ur. Pregledno so pogoji elektrostatskega sukanja raztopin CH/PEO predstavljeni v *preglednici 1*.

Preglednica 1: Pogoji elektrostatskega sukanja NV iz 4 in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO.

Parameter	4 % (m/m)	5 % (m/m)
Napetost	21 kV	21 kV
Pretok na črpalki	0,495 ml/h	0,354 ml/h
Premer igle	0,8 mm	0,8 mm
Relativna vlažnost	20 – 10 %	20 – 10 %
Temperatura	35 – 23°C	35 – 23°C
Razdalja igla-zbiralo	18 cm	18 cm
Čas sukanja	4 – 5 ur	6 – 6,5 ur

3.4 PRIPRAVA PBS PUFRA

Naš glavni namen izdelave NV z metronidazolom je bil zdravljenje parodontalne bolezni. NV bi se tako pri aplikaciji v ustno votlino srečala s slino in gingivalno tekočino v parodontalnih žepih. Na podlagi sestave in pH teh dveh telesnih tekočin smo kot medij za naše poskuse izbrali 50 mM fosfatni pufer PBS s pH = 6,8 [5]. Izdelali smo ga po predpisu iz Ph. Eur. [39], ki pravi, da za pripravo 1000 ml pufra zmešamo 250 ml 0,2 M raztopine KH_2PO_4 in 112 ml 0,2 M raztopine NaOH ter dopolnimo z vodo do oznake. Naš postopek izdelave je bil sledeč:

- najprej smo ločeno pripravili 1000 ml 0,2 M raztopine NaOH;
- nato smo natehtali 6,80 g KH_2PO_4 , ga ekvivalentno prenesli v 1000 ml bučko in raztopili v destilirani vodi;
- sledilo je dodajanje 0,2 M raztopine NaOH do pH = 6,80;
- ko smo dosegli želen pH, smo pufer dopolnili z destilirano vodo do oznake.
- Če smo izdelovali večje količine pufra, smo ohranili opisano razmerje.

3.5 VREDNOTENJE LASTNOSTI POLIMERNIH RAZTOPIN IN NANOVLAKEN

3.5.1 Merjenje prevodnosti polimernih raztopin

Po opisanem postopku (3.3.1 Priprava polimernih raztopin) smo pripravili naslednje polimerne raztopine:

- 4 % (m/m) CH; 4 % (m/m) PEO; 4 % (m/m) CH/PEO; 1 % metronidazola v 4 % (m/m) CH/PEO; 5 % metronidazola v 4 % (m/m) CH/PEO; 15 % metronidazola v 4 % (m/m) CH/PEO;
- 5 % (m/m) CH; 5 % (m/m) PEO; 5 % (m/m) CH/PEO; 0,5 % metronidazola v 5 % (m/m) CH/PEO; 1 % metronidazola v 5 % (m/m) CH/PEO; 5 % metronidazola v 5 % (m/m) CH/PEO.

Posamezno raztopino smo nalili v široko epruveto in nato v njej s pomočjo konduktometra izmerili prevodnost polimerne raztopine. Elektrodo smo spustili v epruveto tako, da se je v raztopini polimera ustvarilo čim manj zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili meritev. Vsaki raztopini smo prevodnost izmerili trikrat, nato pa elektrodo dobro oprali v vroči vodi in jo obrisali do suhega. Meritve so potekale pri sobnih pogojih.

3.5.2 Merjenje povprečnega premera nanovlaken

Povprečni premer NV smo določili na SEM posnetkih izdelanih vzorcev. S pomočjo računalniškega programa *ImageJ* smo na slikah 50 naključno izbranim NV s 50 000-kratno in 100 000-kratno povečavo izmerili premer ter na podlagi rezultatov določili njihov povprečni premer. Povprečni premer smo določili praznim NV in NV z vgrajenim metronidazolom.

3.5.3 Spremljanje spreminjanja oblike nanovlaken

Da bi ugotovili spreminjanje oblike nabreklih NV skozi čas, smo najprej pod SEM pogledali suha prazna NV iz 4 in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO. Iz istih Alu-folij z NV, iz katerih smo pripravili prva dva vzorčka za SEM, smo nato naredili še 4 vzorce približne velikosti 2 x 2 cm z NV iz 4 % raztopine CH/PEO in 4 vzorce z NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO. NV smo nato skupaj z Alu-folijo namočili v dveh petrijevkah s 30 ml PBS pufra. Pustili smo jih nabrekati pri sobnih pogojih 1, 4, 7 in 14 dni. V vsaki od časovnih točk smo iz vsake od petrijevkv vzeli en vzoreček z NV ter pustili, da so se le-ta na Alu-foliji povsem posušila. Iz dela, kjer je izkristaliziralo čim manj PBS pufra, smo pripravili vzorčke za SEM.

3.5.4 Poskus nabrekanja in izgube mase nanovlaken

Za poskus nabrekanja in izgube mase smo pripravili 1 – 2 vzorca praznih NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO podobnih mas. NV smo sušili v steklenih petrijevkah v sušilniku na 40°C do konstantne mase. Nato je sledilo 24-urno nabrekanje v PBS pufri pri sobnih pogojih. V petrijevko smo nalili 30 ml pufra, vanj namočili NV ter jih v določenih časovnih točkah stehali na tehtnici *Sartorius M-Pact AX 244*. Pred tehtanjem smo NV rahlo popivnali z grobim filter papirjem. Po 24 urah je zopet sledilo sušenje v sušilniku na 40°C do konstantne mase. Stopnjo nabrekanja in izgubo mase predstavljata maksimalni vrednosti in deleži v posameznih časovnih točkah. Izračuna se ju po naslednjih dveh enačbah [33]:

$$\text{Stopnja nabrekanja (\%)} = \frac{M - M_d}{M_d} \times 100 \quad (\text{a})$$

$$\text{Izguba mase (\%)} = \frac{M_i - M_d}{M_i} \times 100 \quad (\text{b})$$

Enačba 1: (a) enačba za izračun stopnje nabrekanja; (b) enačba za izračun deleža izgube mase; M – masa nabreklih NV, M_d – masa posušenih NV po nabrekanju, M_i – masa suhih NV pred nabrekanjem [33].

3.6 RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE METRONIDAZOLA

3.6.1 Izdelava umeritvene krivulje

Osnovno raztopino je predstavljala raztopina metronidazola v PBS pufri s koncentracijo 1 mg/ml. Pripravili smo jo tako, da smo natehtali 100 mg metronidazola in ga ekvivalentno prenesli v 100 ml bučko. Dodali smo $\frac{3}{4}$ celotne količine PBS pufra, raztopino premešali ter bučko postavili v ultrazvočno kadičko za toliko časa, da se je ves metronidazol raztopil (kristali metronidazola niso bili več vidni) in dopolnili s PBS pufrom do oznake. Pripravljeno osnovno raztopino smo nadalje redčili tako, da smo dobili koncentracije metronidazola 1, 2, 5, 10, 14, 20, 24, 30 in 40 $\mu\text{g/ml}$. Nabor koncentracij je tak, da pokrije območje absorbance med 0 in 1, v katerem je delovanje UV-VIS spektrofotometra najbolj natančno. Ozadje meritev je predstavljal PBS puffer. Z raztopino s

koncentracijo metronidazola 20 µg/ml smo najprej posneli spekter metronidazola in določili njegov absorpcijski maksimum, nato pa pri tej izbrani valovni dolžini (320 nm) izmerili absorbenco vsem pripravljenim raztopinam. Pri tem smo uporabili dve različni kivetki, in sicer 3-mililitrsko *Micro-Cell 100-QS* in 1-mililitrsko *Semi-Micro Flowing cell 108F-Q*, ker smo v nadaljevanju manjšo kiveto uporabljali za določanje količine sproščene metronidazola, med tem ko je bila večja kiveta uporabljena za vse ostale meritve.

3.6.2 Vpliv polimerov na vrednost izmerjene absorbance metronidazola

Največja slabost metode UV-VIS je, da lahko meritve absorbance izbrane substance motijo druge komponente v vzorcu. V našem vzorcu je bil vedno prisoten metronidazol, katerega koncentracijo smo želeli meriti, ter CH in PEO, ki sta hidrofilna polimera in se posledično s časom raztapljata ter zato lahko motita meritve metronidazola. Vpliv PBS pufra smo izničili tako, da je vedno predstavljal ozadje meritev. Da bi preverili, ali CH in PEO vplivata na meritev absorbance in posledično koncentracije metronidazola, smo si zastavili nekaj praktičnih in nekaj povsem teoretičnih računskih nalog. Najprej smo pripravili tako raztopino, ki je simulirala 100 mg NV iz 3 % (m/m) polimerne raztopine CH/PEO v razmerju 1:1 brez zdravilne učinkovine v 100 ml PBS pufra in ji izmerili absorbenco. Nato smo izračunali koncentracijo metronidazola v vzorcu, ki bi ga pripravili iz raztopine, ki bi simulirala 100 mg NV z 20 % vgradnjo metronidazola v 100 ml PBS pufra ter ugotavljali absorbenco polimerov in njun prispevek k absorbanci metronidazola. Izračunali smo še, koliko NV potrebujemo, da dosežemo MIC = 30 µg/ml, če je vgradnja metronidazola v NV 1,0, 5,0, 10,0 ali 20,0 %. Iz vseh pridobljenih rezultatov smo nato preračunali potencialno napako pri merjenju absorbance metronidazola, ki jo prispevata polimera pri različnih deležih vgrajenega metronidazola v NV.

Da pa bi ugotovili še, kateri od dveh polimerov absorbira ali mogoče celo oba, smo glede na MIC = 20 µg/ml in 10 % vgradnjo metronidazola v NV iz 3 % (m/m) polimerne raztopine CH/PEO pripravili še naslednje raztopine: raztopino s koncentracijo metronidazola 20 µg/ml; raztopino s koncentracijo metronidazola 20 µg/ml ter s CH in PEO; raztopino s koncentracijo metronidazola 20 µg/ml in PEO; raztopino CH. Vsem raztopinam smo izmerili absorbenco in meritve ponovili po predhodni filtraciji istih

raztopin skozi filter *Sartorius RC 0,45 μm*. Meritve s predhodno filtracijo raztopin smo ponovili še po 3 dneh shranjevanja bučk z raztopinami pri sobnih temperaturi.

3.7 STABILNOST METRONIDAZOLA V VODNIH RAZTOPINAH

Za vrednotenje stabilnosti metronidazola v kislem smo pripravili raztopino metronidazola s koncentracijo 20 μg/ml v 3 % (V/V) očetni kislini (pH = 2,581) ter ji izmerili absorbanco. Kiveta je bila pred vsako meritvijo sprana z destilirano vodo in raztopino, ki smo ji merili absorbanco. Ozadje meritev je predstavljala 3 % (V/V) očetna kislina. Bučko z raztopino smo nato shranili pri sobnih pogojih ter po 2,5 dneh ponovno izmerili absorbanco.

Za vrednotenje stabilnosti metronidazola v PBS pufru smo uporabili niz raztopin uporabljenih za izdelavo umeritvene krivulje. Raztopinam s koncentracijami metronidazola 1, 2, 5, 10, 14, 20, 24 in 30 μg/ml smo po pripravi izmerili absorbanco ($\lambda_{\max} = 320$ nm), kot je opisano zgoraj, ozadje meritev pa je predstavljal PBS pufer. Bučke z raztopinami smo nato shranili pri sobnih pogojih zavite v Alu-folijo, se pravi v temi, ter po 2 in 8 dneh ponovno izmerili absorbanco metronidazola.

Želeli smo tudi preveriti vpliv svetlobe na stabilnost metronidazola, zato smo ponovno pripravili raztopine metronidazola v PBS pufru s koncentracijami 1, 2, 5, 10, 15 in 20 μg/ml ter bučke tokrat shranili na dnevni svetlobi in pri sobnih pogojih. Takoj po izdelavi, po 21 in 72 urah smo raztopinam izmerili absorbanco.

3.8 SPROŠČANJE METRONIDAZOLA IZ NANOVLAKEN

3.8.1 Optimizacija protokola za sproščanje metronidazola iz nanovlaken v Franzovi celici

Franzova celica je predstavljala naš sistem za preizkus sproščanje metronidazola iz NV. Ena od prednosti tega sistema je, da receptorski in donorski del ločuje umetna membrana oz. filter, ki preprečuje prehod delcev NV, ki tekom sproščanja razpadajo, med tema dvema prostoroma. Prav tako ta sistem omogoča, da se metronidazol sprošča iz nanovlaken v majhnem volumnu medija, kar je značilno za parodontalni žep, medtem ko akceptorski medij omogoča vzdrževanje sink pogojev. Filter bi moral v idealnem primeru predstavljati le fizično oviro in ne difuzijske bariere za metronidazol, kar pa je bilo

potrebno dokazati pred vrednotenjem sproščanja le-tega iz NV. Poskuse smo začeli z dokazovanjem, da uporabljeni filtri ne vežejo metronidazola. V ta namen smo pripravili koncentrirano raztopino metronidazola. Natehtali smo 12,3 mg metronidazola in ga raztopili v 25 ml PBS pufru. 25-krat redčeni raztopini smo izmerili absorbanco ($\lambda_{\max} = 320$ nm). Nato smo isto raztopino napolnili v plastično injekcijsko brizgo, v nastavek za filter pa enkrat dali filter *Durapore*[®] z velikostjo por 0,1 μm , drugič pa filter iz celuloznega acetata z velikostjo por 0,45 μm . Raztopino metronidazola smo počasi iztisnili preko filtrov ter prefiltrirani in 25-krat redčeni raztopini ponovno izmerili absorbanco. Iz rezultatov smo preračunali maso metronidazola v prefiltriranih raztopinah in jo primerjali z natehtano.

Za preizkus prepustnosti filtrov v Franzovi celici pa smo pripravili raztopino s koncentracijo metronidazola 400 $\mu\text{g/ml}$ ter jo 0,5 ml odmerili v donorski del Franzove celice. Receptorski in donorski del so ločevali filter *Durapore*[®], membrana za dializo in filter iz celuloznega acetata. Receptorski del Franzove celice smo napolnili z 8,0 ml PBS pufru, ki se je s pomočjo magnetnega mešala konstantno mešal z 220 – 700 rpm in termostatiral na 37°C s pomočjo termostatirane vodne kopeli. Vzorčenje je potekalo preko mesta za vzorčenje v naslednjih časovnih točkah: v 5, 10, 20, 40 minuti, po 1 uri in 20 min ter po 2, 3 in 4 urah od začetka sproščanja. Odvzemali smo po 800 μL vzorca s polavtomatsko pipeto preko mesta za vzorčenje. Pred odvzemom vzorca smo v nekaterih primerih izvedli še mešanje s pipeto tako, da smo približno 5-krat potegnili 800 μL raztopine iz receptorskega dela preko mesta za vzorčenje v pipeto in jo ponovno iztisnili v Franzovo celico. Odvzeti vzorec mo nato nadomestili z 800 μL svežega pufru.

Meritve smo izvajali pri tisti valovni dolžini, pri kateri je bil ugotovljen absorpcijski maksimum metronidazola (320 nm) in v kiveti, ki je bila pred vsako meritvijo dobro sprana z destilirano vodo in etanolom ter posušena do suhega. Ozadje meritev je predstavljal PBS pufer. Iz izmerjenih absorbanco smo izračunali delež metronidazola, ki je prešel iz donorskega dela v receptorski del Franzove celice v danem časovnem obdobju in grafično prikazali odvisnost. Profile smo med seboj primerjali in vrednotili vpliv velikosti por filtra, hitrosti mešanja raztopine v receptorskem delu, mešanja s pipeto pred odvzemom vzorca ter oblike Franzove celice, saj vse celice niso bile povsem enake.

3.8.2 Vpliv odpuščanja snovi z mrežice Tegaderm na meritve absorbance metronidazola

Tekom poskusov smo ugotovili, da je NV zelo težko odstraniti z Alu-folije, zato smo poskusili s sukanjem na mrežico Tegaderm. A pred tem smo morali ugotoviti, ali mrežica veže metronidazol in ali odpušča snovi v PBS pufru, ki bi lahko prispevale k absorbanci učinkovine. V ta namen smo pripravili raztopino metronidazola s koncentracijo 10 µg/ml. PBS pufru in raztopini učinkovine smo izmerili absorbanco ($\lambda_{\max} = 320$ nm). Nato smo pufer in raztopini metronidazola nalili v majhni stekleni čaši ter vanju dali mrežico Tegaderm približne velikosti 3 x 1 cm. Čaši smo pokrili s parafilmom in ju shranili na sobnih pogojih. Po 1, 2 in 3 dneh smo obema raztopinama ponovno izmerili absorbanco in meritve med seboj primerjali, v primeru raztopine metronidazola preko preračunanih mas le-tega.

3.8.3 Sproščanje metronidazola iz nanovlaken

S Franzovo celico kot modelom za vrednotenje sproščanja učinkovine iz NV in z optimizacijo parametrov poskusa sproščanja smo se želeli čim bolj približati pogojem v parodontalnem žepu. Za pogoje, opisane v nadaljevanju, smo tekom dela ugotovili, da so najbolj optimalni za izbrani model.

Franzovo celico smo izbrali na podlagi dejstva, da je parodontalni žep prostorsko zelo majhno in omejeno mesto, kjer se gingivalna tekočina neprestano nadomešča s svežo. Leta je po sestavi podobna ekstracelularni tekočini, zato smo za medij našega *in vitro* poskusa sproščanja izbrali fosfatni pufer PBS s pH = 6,8. Receptorski del Franzove celice smo napolnili z 8,1 – 8,6 ml PBS pufra, ki se je tekom sproščanja konstantno mešal pri 700 rpm. V donorski del Franzove celice pa smo dali 0,3 – 1 ml PBS pufra in tako količino NV, da je sproščena količina metronidazola preseгла MIC = 20 µg/ml. NV so bila predhodno odstranjena z Alu-folije oz. mrežice Tegaderm ali pa so bila dana v Franzovo celico skupaj z mrežico Tegaderm. Donorski in receptorski del smo ločili s filtrom iz celuloznega acetata z velikostjo por 0,45 µm. Med sproščanjem smo receptorski del termostatirali na 37°C tako, da je bila Franzova celica potopljena v termostatirani vodni kopeli do spoja. Vzorčenje je potekalo v naslednjih časovnih točkah: v 5, 10, 20, 40 minuti, po 1 uri in 20 min ter po 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 in 24 urah od začetka sproščanja. Odvzemali smo po 800 µL vzorca s polavtomatsko pipeto. Pred odvzemom vzorca smo izvedli še mešanje

s pipeto. Odvzet vzorec smo takoj nadomestili z enako količino svežega pufru PBS. Vzorec smo po potrebi pred meritvijo absorbance redčili v 10 ml bučkah s PBS pufrom (12,5-kratno redčenje). Meritve absorbance so se izvajale kot je opisano zgoraj, v poglavju 3.8.1 *Optimizacija protokola za sproščanje metronidazola iz nanovlaken v Franzovi celici*. Iz meritev absorbance smo nato v danih časovnih točkah izračunali delež sproščene učinkovine in grafično oblikovali profil sproščanja.

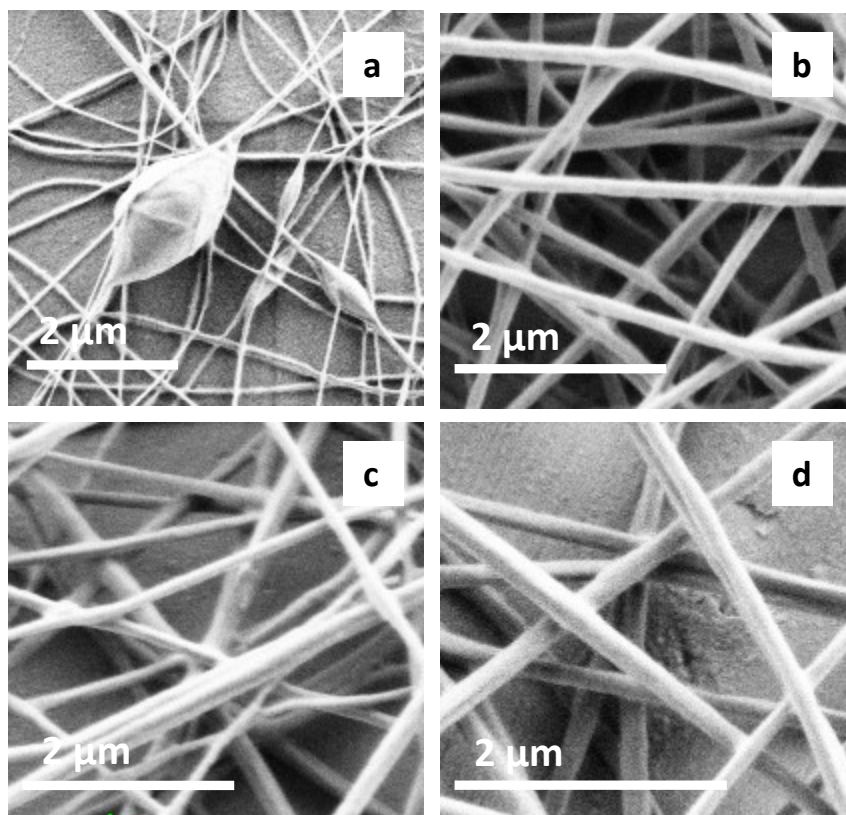
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ PRAZNIH NANOVLAKEN

NV predstavljajo potencialen dostavni sistem za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni zaradi svojih specifičnih strukturnih lastnosti, ki omogočajo lažjo pritrnitev podpornih celic in njihovo razmnoževanje ter s tem posledično regeneracijo poškodovanega tkiva. Hkrati pa lahko vanje vgradimo tudi različne učinkovine, kot npr. protimikrobne učinkovine, in tako omogočimo tudi lokalno zdravljenje tkiva [4, 9, 22, 34]. Zato smo se odločili, da razvijemo bioragradljiva, biokompatibilna in bioadhezivna NV iz CH/PEO z vgrajenim metronidazolom, ki jih v literaturi še nismo zasledili.

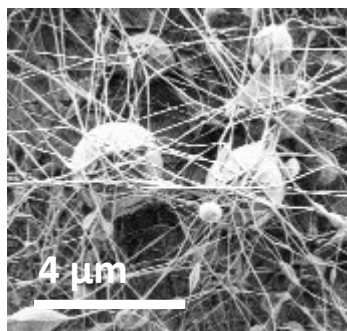
Raziskovalno delo smo začeli s iskanjem najbolj optimalnih pogojev za pripravo enakomernih in nevozlatih NV iz CH/PEO brez zdravilne učinkovine. Zaradi majhnega števila virov o izdelavi omenjenih NV smo si začetne pogoje elektrostatskega sukanja izbrali na podlagi preteklih izkušenj sukanja NV na fakulteti [19]. Ko smo pod svetlobnim mikroskopom videli, da NV nastajajo, smo se razvoja lotili sistematično, in sicer tako, da smo preverili nastajanje NV pri pretokih polimerne raztopine 0,212, 0,354, 0,495 in 0,637 ml/h, pri napetostih 20, 21 in 22 kV, pri tem pa smo uporabili 3, 4 in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO. Ugotovili smo, da koncentracija polimerov ključno vpliva na morfologijo NV, saj so iz 3 % (m/m) raztopine CH/PEO nastala najbolj neprimerna in predvsem zelo vozlasta NV (*slika 8a*), medtem ko smo iz 4 in 5 % (m/m) raztopine lahko izdelali NV brez vozlov. Za nastanek gladkih NV pa koncentracija polimera ni bil edini pogoj, saj je njihov nastanek temeljil tudi na pravilni kombinaciji pretoka raztopine, napetosti in vlage. Najlepša NV (najtanjša – 124 ± 20 nm, in z najmanj vozli) so nastajala iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO pri napetosti 21 kV in pretoku raztopine 0,495 ml/h (*slika 8b*). Primerljiva so bila tudi NV iz istovrstne polimerne raztopine, ki so nastajala prav tako pri napetosti 21 kV, le pretok je bil 0,212 ml/h (*slika 8c*). Za nadaljnjo izdelavo NV je bila izbrana metoda z višjim pretokom, saj so za večino vrednotenih le-teh potrebne večje količine vzorca in, za verodostojnost poskusov, tudi večje število paralel, s tem pa lahko izdelava NV časovno predstavlja zelo dolgotrajen postopek. Malenkost debelejša (134 ± 17 nm), a prav tako brez vozlov, so bila tudi NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO izdelana pri napetosti 21 kV in pretoku 0,354 ml/h (*slika 8d*). Posledično smo za nadaljnje poskuse izbrali NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO, ki so nastajala pri 21 kV in pretoku 0,495

ml/h, ter NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO (21 kV in pretok polimerne raztopine 0,354 ml/h).



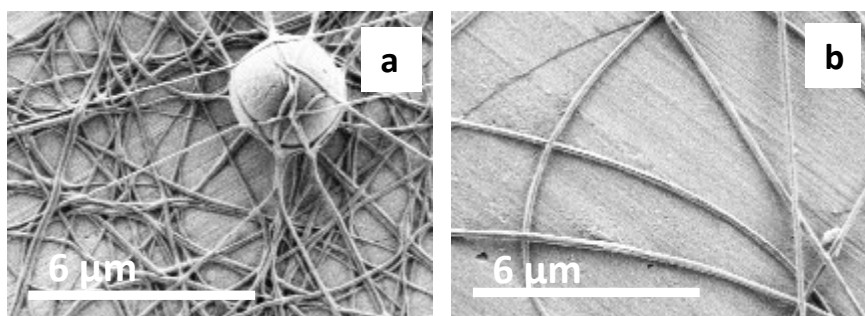
Slika 8: (a) NV iz 3 % raztopine CH/PEO, napetost 21 kV, pretok 0,495 ml/h; (b) NV iz 4 % raztopine CH/PEO, napetost 21 kV, pretok 0,495 ml/h; (c) NV iz 4 % raztopine CH/PEO, napetost 21 kV, pretok 0,212 ml/h; (d) NV iz 5 % raztopine CH/PEO, napetost 21 kV, pretok 0,354 ml/h.

Tekom dela pa smo opazili, da morajo biti vse polimerne raztopine za izdelavo NV sveže pripravljene oz. stare ne več kot en teden, ker se je izkazalo, da po tem času raztopina ni več uporabna za elektrostatsko sukanje. Na zbiralu namreč ni bilo vidno nastajanje NV, pod svetlobnim mikroskopom so bili vidni le vozli, SEM slika pa je pokazala, da NV sicer nastajajo, ampak so zelo tanka in izjemno vozlasta z mikrodenci (slika 9). Najverjetneje pride s časom do sprememb v konformaciji CH, do agregacije verig obeh polimerov ter mehanskega prepletanja [28]. Opazna je bila tudi sprememba v viskoznosti raztopine, ki pa je nismo izmerili.



Slika 9: NV iz raztopine CH/PEO, ki je bila pripravljena pred več kot tednom dni.

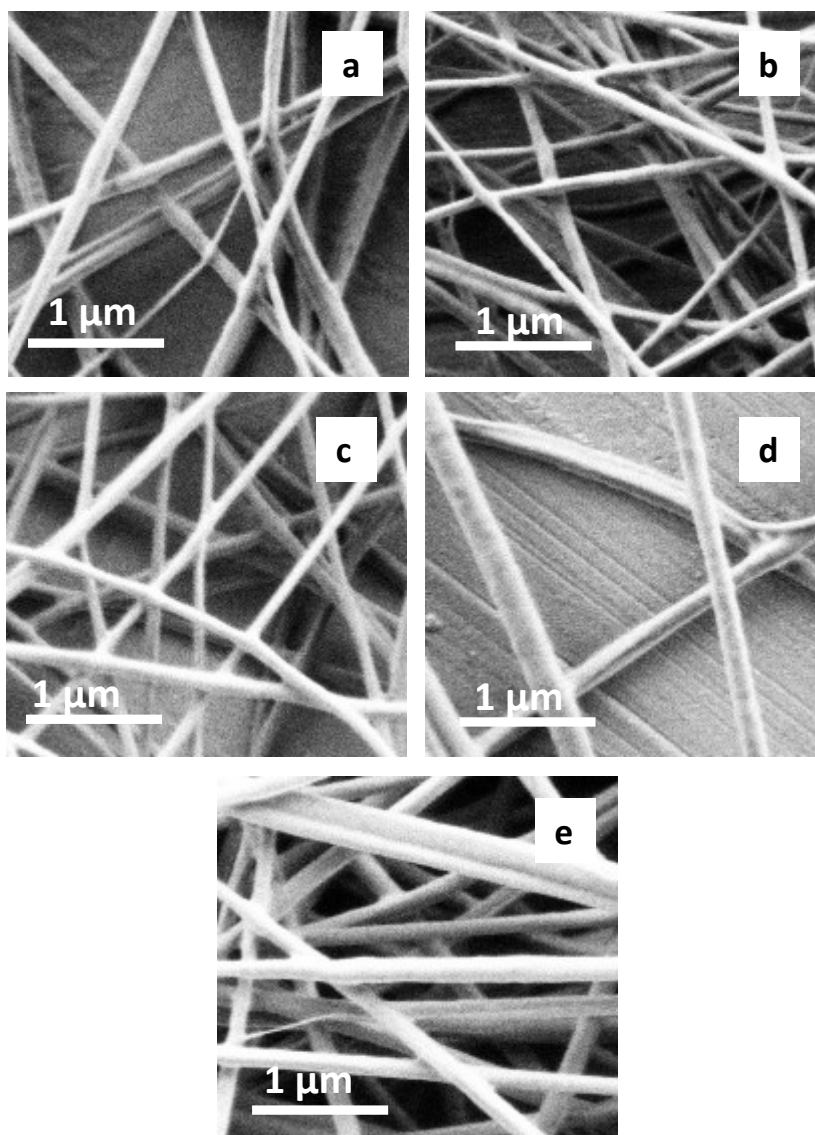
Izpostaviti je potrebno še pomen RH pri postopku elektrostatskega sukanja NV iz hidrofilnih polimerov, saj smo ugotovili, da igra veliko vlogo pri nastanku enakomerno debelih in nevozlatih NV iz CH in PEO. RH namreč ne sme biti prenizka, da topilo ne izhlapeva prehitro in s tem vlaknom onemogoči, da se raztegnejo pod vplivom visoke napetosti, hkrati pa RH niti ne sme biti previsoka, saj dobimo sicer zelo tanka NV, a z vozli z ujetimi mikrodenci [19]. Opisano lahko zelo lepo vidimo na primeru NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z 0,5 % vgrajenega metronidazola. *Slika 10a* prikazuje NV nasukana pri $RH > 25\%$, na *sliki 10b* pa so NV nasukana pri $RH < 15\%$. Prva NV so sicer tanjša (96 ± 16 nm) od tistih, nasukanih pri nižji RH (177 ± 41 nm), a so tudi veliko bolj vozлата. Natančnejša razlaga pojava je opisana v članku *Jana Pelipenka in sodelavcev* [19]. Za sukanje NV iz 4 ali 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z metronidazolom ali brez pa je iz naših izkušenj najprimernejša RH med 8 in 15 %, vsekakor pa mora biti nižja od 20 %, če želimo nasukati NV enakomerne debeline in z malo vozli.



Slika 10: NV iz 5 % raztopine CH/PEO z 0,5 % vgrajenega metronidazola nasukana (a) pri $RH > 25\%$, (b) pri $RH < 15\%$.

4.2 RAZVOJ NANOVLAKEN Z METRONIDAZOLOM

Naslednji korak v postopku razvoja NV je bilo vgrajevanje metronidazola. V NV smo vgrajevali od 0,5 do 15 % te učinkovine glede na suha NV in v samem postopku njihove izdelave to ni zahtevalo nobenih sprememb, kar pomeni, da smo NV še vedno izdelovali pri izbranih pogojih elektrostatskega sukanja, ki so predstavljeni v *preglednici 1*. Nastajala so enakomerna NV brez vozlov in na njihovi površini ni bilo opaziti kristalov metronidazola, niti pri največjem, 15 % deležu vgradnje te učinkovine ne, zato lahko sklepamo, da je bila učinkovina enakomerno porazdeljena v NV (*slika 11*).



Slika 11: NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO z (a) 1, (b) 5 in (c) 15 % vgrajenega metronidazola; ter NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z (d) 0,5 in (e) 1 % vgrajenega metronidazola.

Ugotovili smo, da so bila NV z različnimi deleži vgrajenega metronidazola različnih debelin. Povprečni premer NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO in 1 % vgrajenega metronidazola je znašal 110 ± 39 nm, NV s 5 % metronidazola 71 ± 14 nm in NV s 15 % metronidazola 87 ± 18 nm. Iz rezultatov lahko razberemo, da debelina NV pada z dodajanjem metronidazola v polimerno raztopino (predvsem pri nižjih vsebnostih metronidazola, to je do 5 %). Debelina NV je odvisna od številnih dejavnikov, zato med pogoji elektrostatskega sukanja in lastnostmi polimerne raztopine skoraj da ni parametra, ki ne bi vplival nanjo. Ker so bili v našem primeru pogoji elektrostatskega sukanja konstantni, je vzrok za razlike v debelini NV z vgrajevanjem metronidazola lahko le v drugačnih lastnostih polimerne raztopine, iz katerih so bila NV izdelana. Ker le-ta nastajajo pod vplivom visoke napetosti, je najpomembnejša lastnost polimerne raztopine prevodnost. Prevodnost raztopine ne sme biti niti prenizka niti previsoka zato, da se lahko na kapljici na konici kovinske igle ustvari naboj in posledično Taylorjev stožec v postopku elektrostatskega sukanja [19]. CH je polikation in zaradi mnogih interakcij, ki jih tvori, je prevodnost njegove raztopine relativno visoka oz. previsoka, da bi bilo možno izdelati NV iz samega CH, poleg tega pa je taka raztopina tudi zelo viskozna [28, 29]. Mi smo raztopino CH mešali z raztopino PEO v razmerju 1:1 in kot kažejo rezultati v *preglednici 2*, se je tudi prevodnost raztopine zmanjšala za skoraj polovico glede na prevodnost raztopine CH. Prevodnost pa smo izmerili tudi vsem polimernim raztopinam z metronidazolom, iz katerih smo nato izdelali vzorce NV za poskus sproščanja, vendar lahko vidimo (*preglednica 2*), da dodatek metronidazola nima bistvenega vpliva na prevodnost polimerne raztopine CH/PEO, nasprotno pa vpliva na debelino izdelanih NV. V kisli raztopini CH/PEO je metronidazol namreč v dveh oblikah – z nabojem in brez, ki sta v ravnotežju. Ko je raztopina prešla nabito iglo, sta nabit metronidazol in CH poleg pozitivnih nabojev povečevala tudi odbojne sile med komponentami. Te odbojne sile v curku so povečale nestabilnost curka, pospešile sukanje in posledično bolj izrazito tanjšanje NV.

Preglednica 2: Rezultati meritev električne prevodnosti polimernih raztopin in povprečnega premera NV, izdelanih iz posameznih raztopin.

Raztopina	Prevodnost [mS/cm]	Povprečni premer NV [nm]	Raztopina	Prevodnost [mS/cm]	Povprečni premer NV [nm]
4 % raztopina PEO	0,84	/	5 % raztopina PEO	0,86	/
4 % raztopina CH	6,29	/	5 % raztopina CH	7,33	/
4 % raztopina CH/PEO	3,07	124 ± 20	5 % raztopina CH/PEO	3,67	134 ± 17
1 % MTZ + 4 % CH/PEO	3,13	110 ± 39	0,5 % MTZ + 5 % CH/PEO	3,62	177 ± 41
5 % MTZ + 4 % CH/PEO	3,14	71 ± 14	1 % MTZ + 5 % CH/PEO	3,67	122 ± 20
15 % MTZ + 4 % CH/PEO	3,07	87 ± 18			

Nasprotno pa rezultati podani v *preglednici 2* prikazujejo, da so bila NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO nekoliko debelejša od NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO, čeprav je bila 5 % (m/m) raztopina CH/PEO bolj prevodna od 4 % (m/m), saj je imela večjo vsebnost CH, ki daje polimerni raztopini CH/PEO električno prevodnost, ker je polikation. Razlog za to je, da imata prevodnost in koncentracija polimera v raztopini nasproten učinek in v tem primeru je imela koncentracija polimera prevladujoč vpliv. V 5 % (m/m) raztopini je namreč vzpostavljenih več medmolekulskih interakcij med molekulami CH, ker jih je številčno več, zato se težje razteza in posledično pri enakih pogojih elektrostatskega sukanja dobimo debelejša NV v primerjavi s tistimi, izdelanimi iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO [19, 23].

4.3 LASTNOSTI NANOVLAKEN

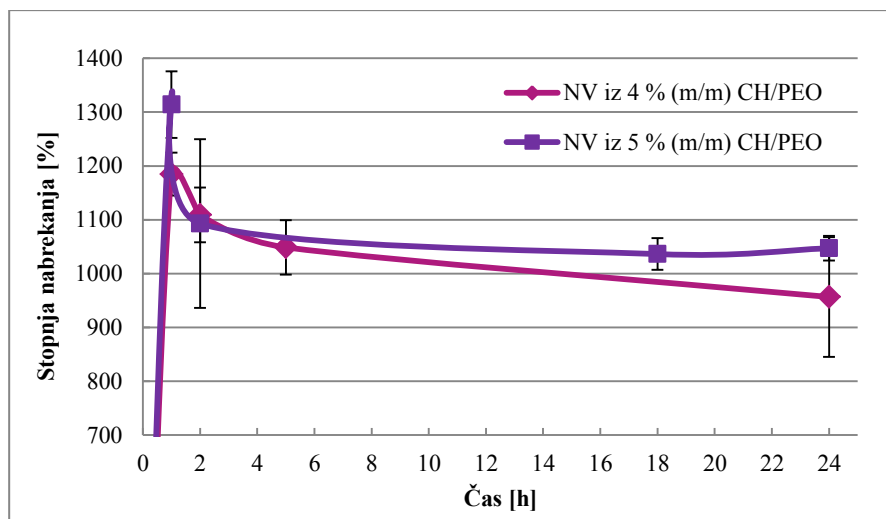
4.3.1 Vrednotenje nabrekanja in izgube mase nanovlaken

Za izdelavo NV smo izbrali biorazgradljiva in hidrofilna polimera – CH in PEO, ker smo želeli z nabrekanjem NV podaljšati difuzijsko razdaljo metronidazola in s tem upočasniti njegovo sproščanje. Da bi proučili nabrekanje NV, smo izvedli na videz zelo preprost poskus, a izkazalo se je, da je tehtanje nabreklih NV vse prej kot preprosto. Največjo težavo nam je povzročalo predvsem pivnanje nabreklih NV pred vsakim tehtanjem, saj je bilo težko zagotoviti ponovljivost odstranitve enake količine odvečne

vode s pomočjo filter papirja. Posledično je potrebno imeti za ta poskus čim večje število vzorcev.

Poskus mo izvedli tako z NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO kot tudi z NV iz 5 % (m/m) raztopine, a izkazalo se je, da bistvene razlike v nabrekanju enih in drugih ni. Po prvi uri je stopnja nabrekanja znašala v povprečju kar 1314 ± 62 % pri NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO in 1185 ± 40 % pri NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO, kar pomeni, da se je masa NV v prvi uri nabrekanja v povprečju povečala za 7,2-krat. To nam pove, da ima CH zelo veliko kapaciteto za privzem vode, ki jo, glede na literaturne podatke, intermolekularne interakcije s PEO še povečajo s tem, ko zmanjšajo kristaliničnost strukture. Hkrati PEO s svojo hidrofilnostjo ustvari še osmotski gradient, kar pospeši hidratacijo NV predvsem v začetni fazi nabrekanja le-teh [40, 41].

V drugi uri je stopnja nabrekanja drastično padla (*slika 12*) in pri NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO je bil ta padec še bolj izrazit kot pri NV iz 4 % (m/m) raztopine. Če navedemo še rezultat poskusa izgube mase NV v 24 urah, ki je bila pri NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO v povprečju $45,6 \pm 2,0$ % in pri NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO $43,2 \pm 2,3$ %, lahko padec stopnje nabrekanja pripišemo prav izgubi mase. Izguba mase pa je zagotovo posledica raztapljanja v vodnih medijih dobro topnega PEO, saj znaša, če zaokrožimo, ravno 50 %, se pravi toliko, kolikor je bilo le-tega vgrajenega v NV. Če vse skupaj povežemo v celoto, lahko rečemo, da imajo NV iz CH zelo veliko kapaciteto za privzem vode in da se nabreklo stanje zaradi prisotnosti PEO vzpostavi zelo hitro, vendar NV najverjetneje že v začetnih 2 urah izgubijo skoraj polovico svoje mase na račun raztapljanja slednjega polimera, kar se odraža tudi v padcu stopnje nabrekanja. Od 5. do 24. ure je nato stopnja nabrekanja padala le minimalno, kar pomeni, da se v roku petih ur raztopi celoten PEO, ki je bil vgrajen v NV, in je nadaljnje zmanjševanje stopnje nabrekanja le še posledica razgradnje CH, ki pa je relativno počasna, glede na položnost krivulj (*slika 12*).

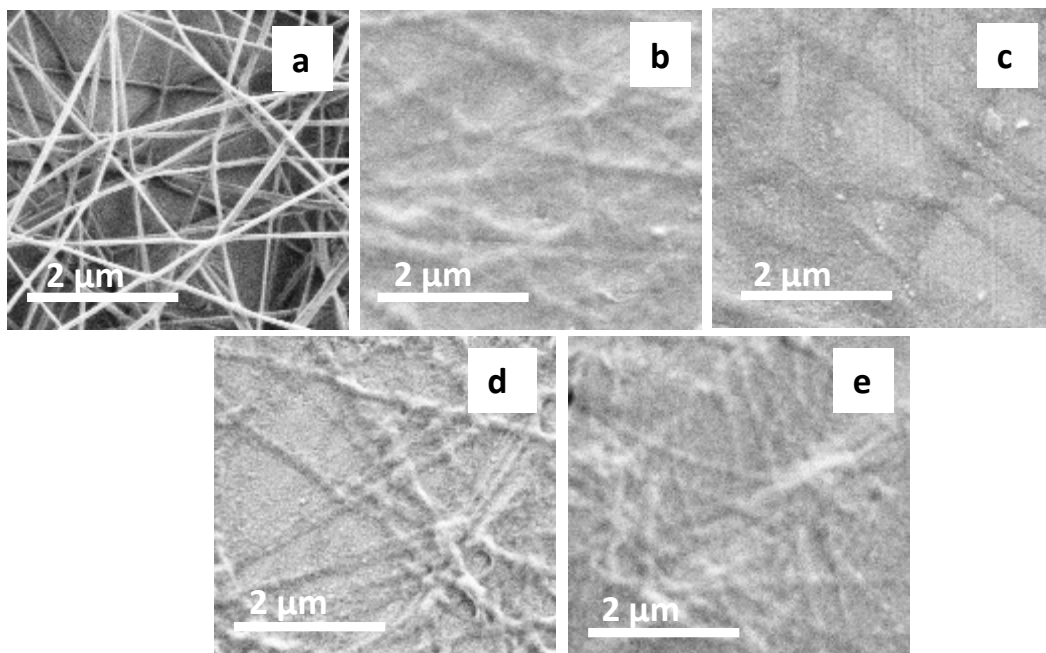


Slika 12: Nabrekanje NV iz 4 % (m/m) in 5 % (m/m) raztopine CH/PEO ter erozija PEO v 24 urah izraženi kot stopnja nabrekanja.

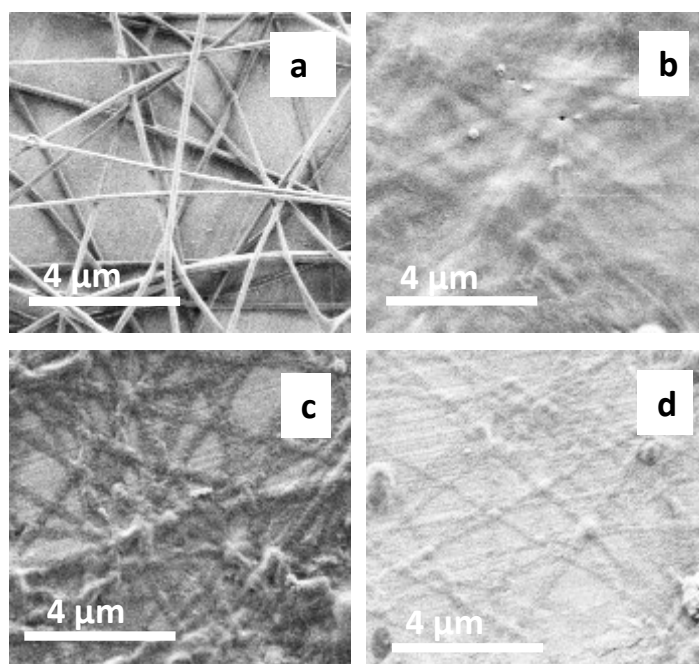
4.3.2 Vpliv medija na spreminjanje oblike nanovlaken

V zgornjem poglavju smo ugotovili, da NV v 24 urah v povprečju izgubijo $44,1 \pm 2,4$ % svoje mase in najverjetneje jo izgubijo že prvih 5 urah ter da je sposobnost nabrekanja NV iz CH/PEO zelo velika. Ker pa nas je zanimalo, kako se te spremembe vizualno odražajo na NV, smo spreminjanje oblike med nabrekanjem spremljali tudi s pomočjo SEM. Na slikah (*slika 13 in 14*) je lepo vidno, da NV nabreknejo – površina NV ni več gladka, njihov premer se poveča, a tudi njihova oblika ni več tako izrazita. Ne vidimo namreč več posameznih NV, ampak le njihove obrise, vse skupaj pa izgleda kot enoten polimerni film. Po 14 dneh so bili ti obrisi NV še vedno vidni, kar lahko pripisujemo CH, ki se počasi razgrajuje.

Podobno izgubo oblike NV iz CH in PEO so opazili tudi raziskovalci v članku *Bhattarai N. in sodelavcev* [22]. V njihovih raziskavah so NV iz CH in PEO v razmerju 60/40 že po 1 tednu povsem izgubila obliko, med tem ko so bila NV iz CH in PEO v razmerju 90/10 skorajda nespremenjene oblike tudi po 4 tednih opazovanja. Hitro izgubo oblike NV z razmerjem CH/PEO = 60/40 so pripisovali velikemu deležu PEO, ki je dobro topen v vodnih raztopinah, kar pomeni veliko izgubo mase NV v zelo kratkem času, kar se ujema tudi z našimi rezultati. Posledica je hitra izguba integritete v strukturi NV in hkrati tudi izguba želene funkcije le-teh v biološkem okolju [22].



Slika 13: SEM slike suhih NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO (a) pred nabrekanjem ter (b) po 1, (c) 4, (d) 7 in (e) 14 dneh nabrekanja.

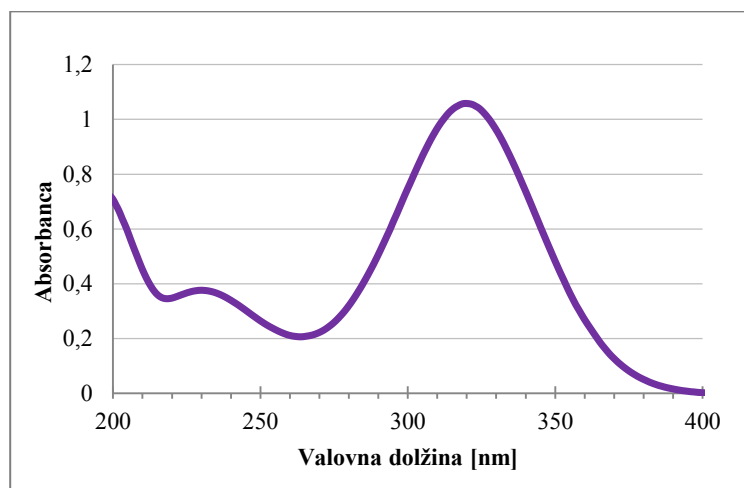


Slika 14: SEM slike suhih NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO (a) pred nabrekanjem ter (b) po 1, (c) 4 in (d) 14 dneh nabrekanja; zadebelitve ovalne oblike na slikah so bakterije ali prašni delci, ki so prileteli na NV med sušenjem.

4.4 RAZVOJ ANALIZNE METODE

4.4.1 Umeritvena krivulja

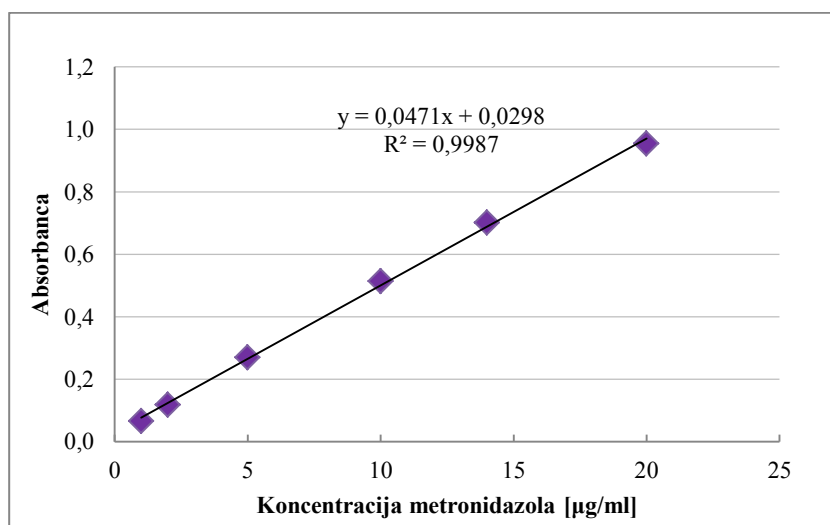
UV-VIS je enostavna in hitra metoda, primerna za določanje koncentracije številnih snovi v raztopini in prav zaradi teh razlogov smo se jo odločili uporabiti za določanje koncentracije metronidazola. UV-VIS temelji na merjenju absorbirane svetlobe pri prehodu le-te skozi vzorec. Če merimo absorbanco pri različnih valovnih dolžinah svetlobe, dobimo spekter, ki je za molekule zvezen. Meritve za kvantitativno določanje pa izvajamo pri valovni dolžini, pri kateri je absorbanca maksimalna [36, 38]. *Slika 15* oz. spekter metronidazola prikazuje, da je absorpcijski maksimum te učinkovine v PBS pufru (izbranem mediju) pri 320 nm, kar pomeni, da smo v nadaljevanju vsa kvantitativna določanja metronidazola izvajala pri tej valovni dolžini.



Slika 15: Spekter metronidazola v PBS pufru; viden absorpcijski maksimum pri $\lambda_{\max} = 320$ nm.

UV-VIS je relativna tehnika, zato se koncentracija analita določa posredno z metodo umeritvene krivulje. Izdelali smo dve umeritveni krivulji, pri katerih smo absorbanco standardov metronidazola v PBS pufru merili v 3-mililitrski (*Micro-Cell 100-QS*) in 1-mililitrski (*Semi-Micro Flowing cell 108F-Q*) kivetih. Linearnost umeritvene krivulje, za katero so bile absorbance izmerjene v večji kivetih, je bila boljše ($A=0,0529 \cdot c$ ($\mu\text{g/ml}$) + 0,0015; $R^2=1$ v primerjavi z $A=0,0471 \cdot c$ ($\mu\text{g/ml}$) + 0,0298 ($R^2=0,9987$) (*slika 16*)), a je nismo mogli uporabiti za kvantitativno določanje metronidazola v poskusih sproščanja, saj

smo v omenjenih poskusih lahko iz Franzove celice pridobili le 800 μL vzorca, za kar je bila večja kiveta prevelika in posledično neprimerna za izvajanje meritev.



Slika 16: Umeritvena krivulja za metronidazol v PBS pufri v območju koncentracij do 20 $\mu\text{g/ml}$ (kiveta Semi-Micro Flowing cell 108F-QS, $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$).

4.4.2 Vpliv polimerov na vrednost izmerjene absorbance metronidazola

Največja slabost UV-VIS metode je njena nespecifičnost, kar pomeni, da lahko ostale komponente v vzorcu, katerih ne določamo kvantitativno, prispevajo k absorbanci izbranega analita in s tem vplivajo na pravilnost rezultatov. Za naš sistem sta bili relevantni dve taki komponenti, ki sta se s časom sprostile v medij zaradi erozije NV, in sicer sta bila to polimera CH in PEO. Njun vpliv na meritev koncentracije metronidazola smo preverili s pripravo raztopine, ki je simulirala 100 mg NV brez učinkovine v 100 ml PBS pufra. Absorbanca izmerjena pri absorpcijskem maksimumu metronidazola je znašala 0,050815, kar pomeni, da bi polimera potencialno lahko motila meritve koncentracije metronidazola. Ker je bil cilj tega raziskovalnega dela, da v NV vgradimo čim večji delež te učinkovine, smo preračunali še koncentracijo metronidazola v raztopini, ki bi simulirala 100 mg NV z 20 % vgradnjo učinkovine v 100 ml PBS pufra. Koncentracija take raztopine bi znašala 200 $\mu\text{g/ml}$, kar pomeni, da bi morali to raztopino vsaj 10-krat redčiti, da bi ji lahko izmerili absorbanco. S tem bi bila absorbanca polimerov, ki smo jo izmerili v prvem poskusu, prav tako vsaj 10-krat nižja, kar pa je že zanemarljiv prispevek k absorbanci metronidazola. Če to izrazimo še kot napako, bi absorbanca polimerov v raztopini metronidazola s

koncentracijo 30 µg/ml, ki bi se sprostil iz NV z 1 % vgrajene učinkovine, povzročila 10 % napako pri meritvi absorbance metronidazola, pri NV z 10 % vgrajene učinkovine 0,87 % napako in pri NV z 20 % vgrajenega metronidazola 0,30 % napako. Iz tega izračuna je razvidno, da je napaka pri NV z 10 – 20 % vgrajenega metronidazola zanemarljiva, pri NV z 1 % vgrajenega metronidazola pa bi lahko meritve preveč odstopale od pravih.

Da bi zmanjšali možnost napak, smo želeli ugotoviti, kateri od polimerov absorbira. Iz rezultatov v *preglednici 3* vidimo, da je to CH, saj sta absorbanci raztopin metronidazola v PBS pufru s koncentracijo 20 µg/ml in enake raztopine z dodanim PEO zelo podobni, razlika med eno od teh absorbanc in absorbanco raztopine metronidazola v PBS pufru s koncentracijo 20 µg/ml z dodanima polimeroma CH in PEO v razmerju 1:1 pa je ravno absorbanca raztopine CH. Raztopine smo nato še filtrirali, s čemer smo simulirali pogoje v Franzovi celici, kjer donorski in receptorski del ločuje filter, ter s ponovno meritvijo absorbanc ugotovili, da CH s filtracijo odstranimo (*preglednica 3*). To pomeni, da s filtracijo še dodatno zmanjšamo napako meritev absorbance metronidazola zaradi prispevka absorbance CH in to nam omogoča že sam izbrani *in vitro* sistem za sproščanje metronidazola iz NV. Po dveh dneh shranjevanja raztopin pri sobnih pogojih pa smo opazili še, da se je CH izoboril, saj je bila opazna mlečno bela oborina (*preglednica 3*). Iz sledečih podatkov lahko sklepamo, da je CH netopen v pufru s pH 6,8 in zato ne pričakujemo, da se bi raztopil tekom sproščanja in posledično motil meritve.

Preglednica 3: Rezultati poskusa s katerim smo ugotavljali, kateri od polimerov absorbira pri $\lambda_{\max} = 320$ nm.

	A nefiltrirane raztopine	A filtrirane raztopine	Relativna napaka glede na Anef.	A filtrirane raztopine po treh dneh	Relativna napaka glede na Anef. po treh dneh
MTZ 20 µg/ml	1,0648	1,0715	-0,63 %	1,0413	2,21 %
MTZ 20 µg/ml + CH/PEO	1,0750	1,0594	1,45 %	1,0609	1,31 %
MTZ 20 µg/ml + PEO	1,0669	1,0635	0,32 %	1,0549	1,12 %
raztopina CH	0,013113	0,003639	72,25 %	-0,00142	110,80 %

4.5 STABILNOST METRONIDAZOLA V VODNIH RAZTOPINAH

Z dodatkom metronidazola v raztopino CH/PEO nam ni bilo potrebno prilagajati in ponovno optimizirati pogojev elektrostatskega sukanja NV, a s tem ko nam je uspelo izdelati NV z učinkovino, še nismo mogli z gotovostjo trditi, da smo izdelali terapevtsko ustrezna NV. Izredno pomembno je namreč, da je učinkovina stabilna tekom celotnega postopka izdelave NV in tudi po tem, ko se sprostijo iz njih na mestu delovanja. Zato smo v našem primeru preizkusili ali metronidazol razpada v 3 % (V/V) očetni kislini, PBS pufru ali morda pod vplivom svetlobe. Za ugotavljanje stabilnosti smo primerjali absorbanco metronidazola pred in po izpostavitvi raztopin z učinkovino stresnim dejavnikom ter posredno sklepali, če molekula ohranja svoj protimikrobni učinek. V primeru razpada se namreč tvorijo drugi produkti, ki običajno absorbirajo pri drugačni valovni dolžini in tako spremenijo celokupno absorbanco.

Absorbanca, ki smo jo izmerili sveže pripravljene raztopine metronidazola v 3 % (V/V) očetni kislini (pH = 2,581) pri $\lambda_{\max} = 320$ nm, je znašala 0,65778, absorbanca iste raztopine po 2,5 dneh shranjevanja pri sobnih pogojih pa je bila 0,65340, iz česar sledi, da je relativna razlika med meritvama 0,7 %. Sklepamo lahko, da je metronidazol stabilen v kislem tekom 3 dni, kar se tudi ujema z literaturnimi podatki [17]. Opazimo lahko le, da je absorpcijski maksimum metronidazola v kislem pri $\lambda_{\max} = 320$ nm nižji v primerjavi s tistim v PBS pufru, prikazanem na *sliki 15*, kar je posledica ionske oblike te molekule.

V nadaljevanju smo preverili stabilnost metronidazola v PBS pufru. Pri raztopinah te učinkovine shranjenih v temi pri sobnih pogojih je relativna napaka meritev absorbanc po 8 dneh glede na absorbance izmerjene takoj po izdelavi pri koncentraciji raztopine 1 $\mu\text{g/ml}$ znašala -16,67 %, pri koncentracijah 2, 5, 10, 14, 20, 24 in 30 $\mu\text{g/ml}$ pa -2,84, 0,03, 4,92, 3,30, 4,01, 1,23 in -0,93 %. Ker je napaka pri višjih koncentracijah metronidazola majhna in ker iz relativnih napak ni razvidnega trenda naraščanja ali padanja, kar ni opaziti tudi pri izračunu relativne napake meritev absorbanc po 2 dneh shranjevanja raztopin v temi, ki niso predstavljene, lahko rečemo, da je metronidazol v PBS pufru (pH = 6,80) stabilen pri sobnih pogojih. Odstopanja meritev absorbanc pri nižjih koncentracijah pa so le posledica slabše ponovljivosti UV-VIS spektrofotometra pri tako nizkih absorbancah ter izvedbe meritev v različnih dneh.

Poskus smo ponovili še tako, da smo raztopine shranjevali na dnevni svetlobi in s tem ugotavljali morebitno fotolabilnost metronidazola. Meritve absorbance takoj po izdelavi ter po 21 in 72 urah shranjevanja raztopin so pokazale, da metronidazol prav tako ni občutljiv

na svetlobo, saj so relativne napake meritev absorbance po 21 urah shranjevanja raztopin glede na absorbanco izmerjeno takoj po izdelavi raztopin pri koncentracijah učinkovine 1, 2, 5, 10, 15 in 20 µg/ml znašale 0,35, 4,52, 2,81, 1,62, 0,71 in 2,31 %. Odstopanje je bilo opaziti le pri absorbancah izmerjenih raztopinama z nižjima koncentracijama metronidazola – 1 in 2 µg/ml po 72 urah, katerih relativna napaka je bila 34,97 % in 16,87 %. Odstopanje smo tudi tu pripisali slabši ponovljivosti UV-VIS spektrofotometra ter meritvam v različnih dneh in ne nestabilnosti metronidazola, ker se vsi ostali rezultati ujemajo. S temi meritvami smo tako ovrgli dvome o fotolabilnosti metronidazola, ki se pojavljajo v literaturi [12, 14, 17], in potrdili stabilnost metronidazola pri pH = 6,80, iz česar lahko z gotovostjo trdimo, da so rezultati meritev med seboj primerljivi in da metronidazol ohranja svojo obliko v okolju, ki je podoben parodontalnemu žepu.

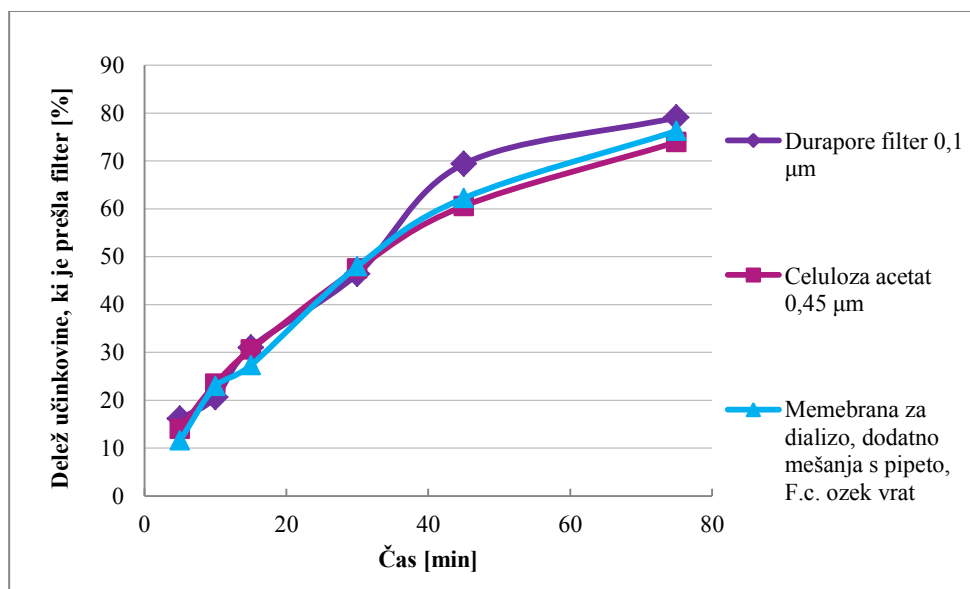
4.6 SPROŠČANJE METRONIDAZOLA IZ NANOVLAKEN

4.6.1 Optimizacija protokola za sproščanje metronidazola iz nanovlaken v Franzovi celici

Franzovo celico smo izbrali za *in vitro* model parodontalnega žepa, ker smo se lahko z relativno majhno količino medija, v katerem so bila NV, s konstantnim mešanjem in termostatisiranjem receptorske tekočine na 37°C najbolj približali pogojem v parodontalnem žepu, ki jih navaja literatura [4, 5, 11]. Hkrati je bilo vzorčenje enostavno in že sam sistem je omogočal filtracijo vzorca, kar je bilo pomembno predvsem zaradi erozije NV iz CH in PEO tekom sproščanja. Tako je bil namen filtra v Franzovi celici, da je preprečeval prehod delcev NV iz donorskega v receptorski del, kjer je potekalo vzorčenje, zato bi moral predstavljati le fizično bariero in ne bi smel upočasniti prehoda metronidazola iz donorskega v receptorski del. Prav tako filter tudi ni smel vezati metronidazola in za filter *Durapore*® ter filter iz celuloznega acetata smo to tudi dokazali. *Durapore*® filter je namreč prešlo 100,20 % metronidazola glede na maso metronidazola v raztopini pred filtracijo, v primeru filtra iz celuloznega acetata pa 99,79 %.

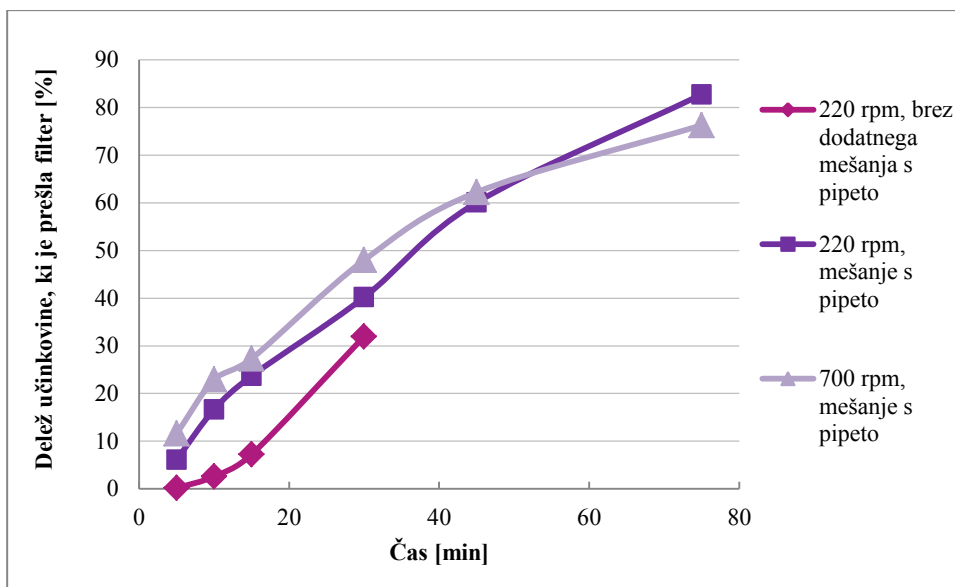
Poskuse smo nadaljevali v Franzovi celici, kjer smo vrednotili vpliv velikosti por filtra, hitrosti mešanja raztopine v receptorskem delu, mešanja s pipeto pred odvzemom vzorca ter oblike Franzove celice na prehod metronidazola preko filtra, kar prikazujejo *slike 17, 17, 18*. Izkazalo se je, da velikost por filtra ne vpliva na prehod metronidazola iz

donorskega v receptorski del Franzove celice (*slika 17*), kar pomeni, da je molekula učinkovine v premeru manjša od $0,1 \mu\text{m}$. Posledično smo za filter naših nadaljnjih poskusov izbrali filter iz celuloznega acetata, ker je hidrofilen in cenovno ugoden.



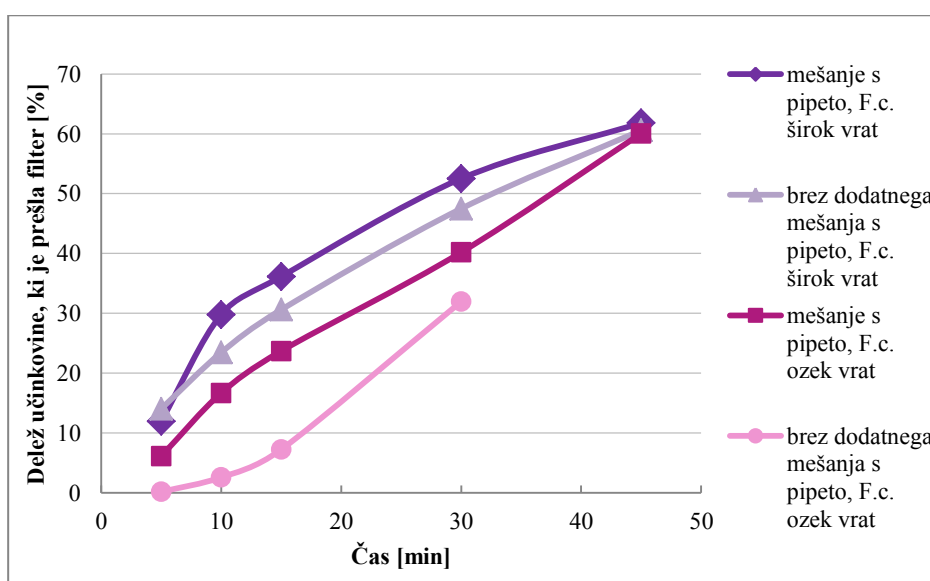
Slika 17: Vpliv velikosti por filtra na prehod metronidazola iz donorskega v receptorski del Franzove celice (hitrost mešanja v receptorskem delu: 220 rpm, brez dodatnega mešanja s pipeto in Franzova celica s širokim vratom mesta za vzorčenje – razen v primeru membrane za dializo.).

Kar zadeva mešanje, smo mešanje magnetnega mešala v receptorskem delu Franzove celice tekom poskusov pospešili iz 220 rpm na 700 rpm in ugotovili, da pospešitev prispeva k prehodu metronidazola preko filtra (*slika 18*). Iz grafa pa je razvidno predvsem to, da je ključnega pomena mešanje s pipeto pred odvzemom vzorca. Samo mešanje z magnetnim mešalom ni zadostno, kljub visokim obratom, da bi prikazalo realno količino metronidazola, ki je prešel filter, zato je bil ta postopek mešanja s pipeto pred odvzemom vzorca v nadaljnjih poskusih nujno potreben.



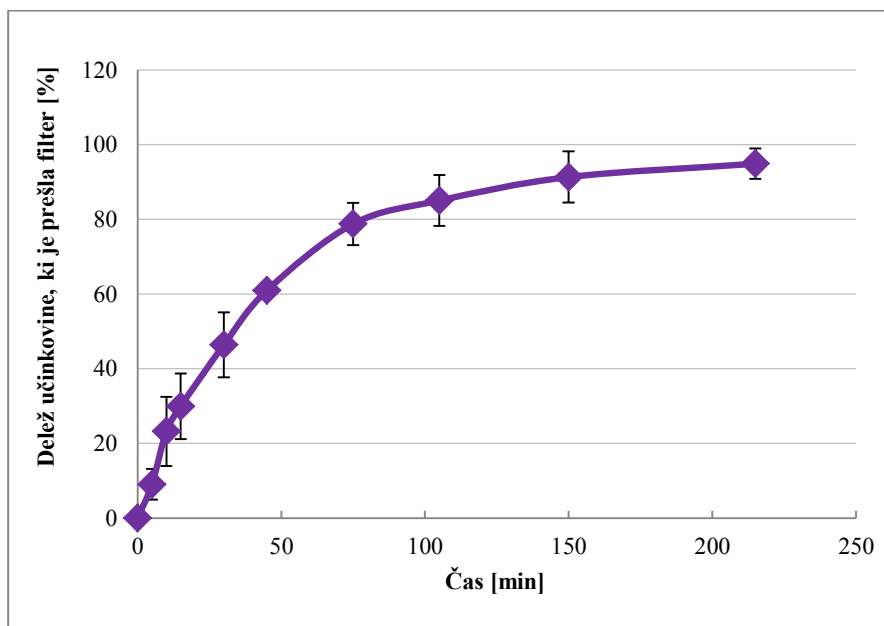
Slika 18: Vpliv mešanja na prehod metronidazola iz donorskega v receptorski del Franzove celice (Franzova celica z ozkim vratom, celulozno acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm).

Imeli smo tudi tri med seboj podobne Franzove celice in eno, ki se je razlikovala predvsem v širini vratu mesta za vzorčenje. Ta je bil ožji in kot prikazuje *slika 19* je to prav tako vplivalo na rezultate. Z dodatnim mešanjem se je sicer ta vpliv zmanjšal, a smo se kljub temu odločili, da se uporabi Franzove celice z ožjim vratom mesta za vzorčenje izogibamo.



Slika 19: Vpliv oblike Franzove celice in vpliv mešanja na prehod metronidazola iz donorskega v receptorski del Franzove celice (celulozno acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm , hitrost mešanja v receptorskem delu: 220 rpm).

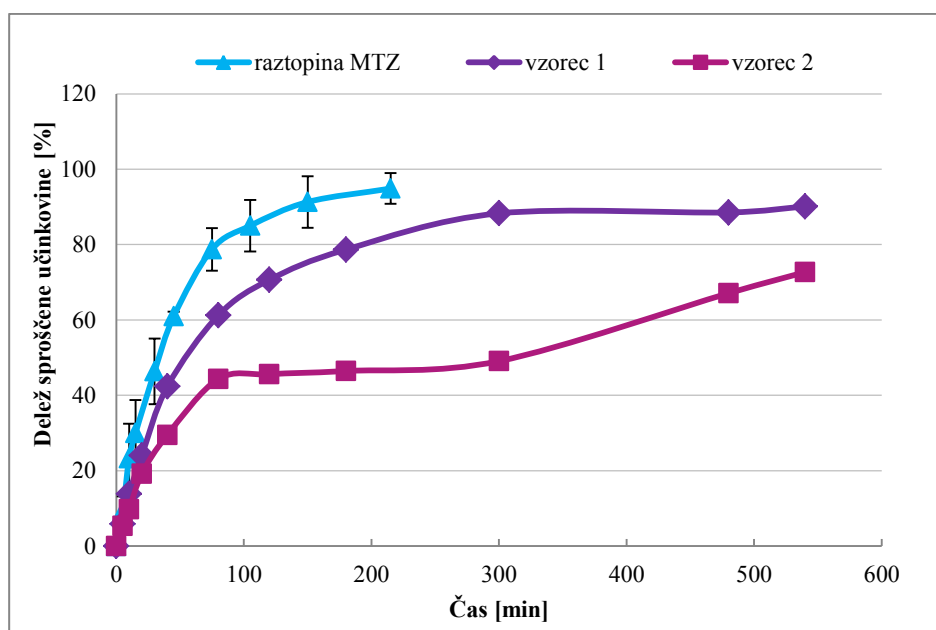
Za ponovljivo in pravilno vrednotenje sproščanja je pomembno, da je v akceptorskem delu Franzove celice homogena raztopina metronidazola in če povzamemo, smo z opisanimi rezultati poskusov ugotovili, da je za to nujno potrebna večja hitrost mešanja z magnetnim mešalom v receptorskem delu Franzove celice (700 rpm) ter dodatno mešanje s pipeto pred vzorčenjem, kar smo upoštevali v nadaljnjih poskusih sproščanja metronidazola iz NV, pri katerih smo uporabljali le Franzove celice s širokim vratom. Hkrati so rezultati pokazali tudi to, da naš izbrani filter iz celuloznega acetata vseeno ne predstavlja le fizične, ampak tudi difuzijsko bariero za metronidazol. V nadaljevanju smo zato vse profile sproščanja metronidazola iz NV primerjali glede na profil raztopine metronidazola, ki je bil pridobljen pri prej opisanih pogojih in ga prikazuje *slika 20*.



Slika 20: Profil raztopine metronidazola v PBS pufru pri prehodu filtra iz celuloznega acetata z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$ (Franzova celica s širokim vratom, hitrost mešanja v receptorskem delu: 700 rpm, mešanje s pipeto pred odvzemom vzorca).

Tekom izvajanja poskusa sproščanja metronidazola iz NV izdelanih iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO in z vgrajenim 1 % te učinkovine pa smo postali pozorni še na en parameter, ki lahko bistveno vpliva na rezultate, in to je zračni mehurček med medijem in filtrom v receptorskem delu Franzove celice. Mehurček povzroči, da medija v receptorskem in donorskem delu nista v stiku oz. je stik minimalen, zato je posledično onemogočena tudi difuzija iz NV sproščenega metronidazola iz donorskega v receptorski del Franzove celice, kjer poteka vzorčenje. Grafično se pojav zračnega mehurčka kaže kot

nenaden plato krivulje, ki je razviden v profilu sproščanja *vzorca 2* med 100. in 300. min na *sliki 21*. Po 300. min je bil mehurček odstranjen iz sistema in delež sproščene učinkovine je zopet začel naraščati. Mehurček je najverjetneje nastal zaradi intenzivnega mešanja s pipeto in odvzemanja vzorcev, prisotno pa je bilo tudi izhlapevanje pufra iz sistema med samim poskusom zaradi termostatiranja, kar je prav tako lahko imelo svoj prispevek. Posledično smo vse rezultate, pri katerih je kazalo na nepravilnosti in motnje v sistemu, izključili.

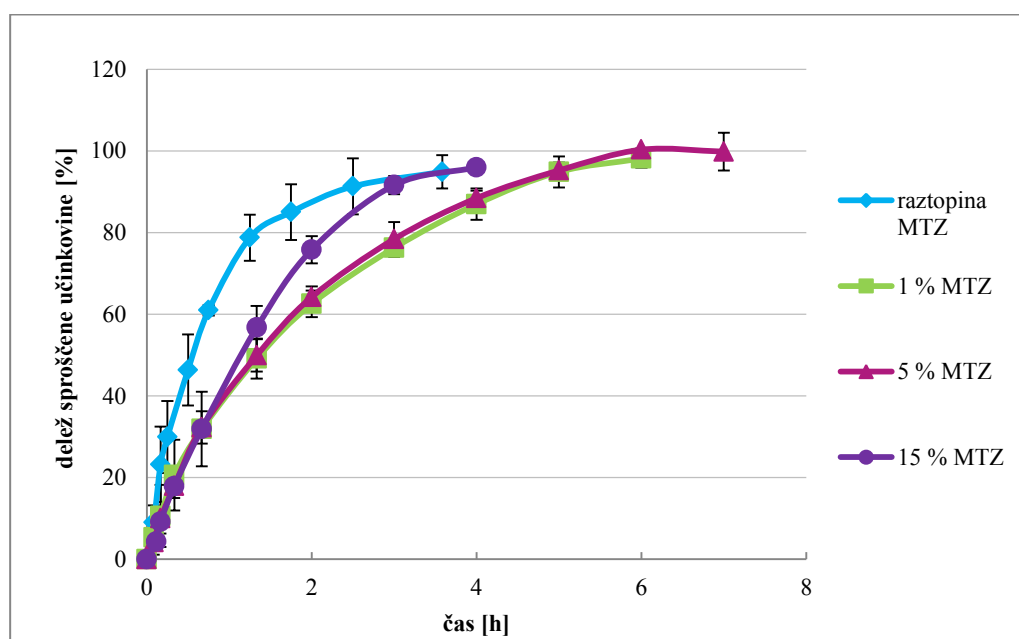


Slika 21: Vpliv zračnega mehurčka med medijem in filtrom v receptorskem delu Franzove celice na hitrost sproščanja metronidazola (NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z 1 % vgrajenega metronidazola); vzorec 1 – vzorec brez zračnega mehurčka, vzorec 2 – pojav zračnega mehurčka v vzorcu v 100. min in odstranitev v 300. min.

4.6.2 Sproščanje metronidazola iz nanovlaken

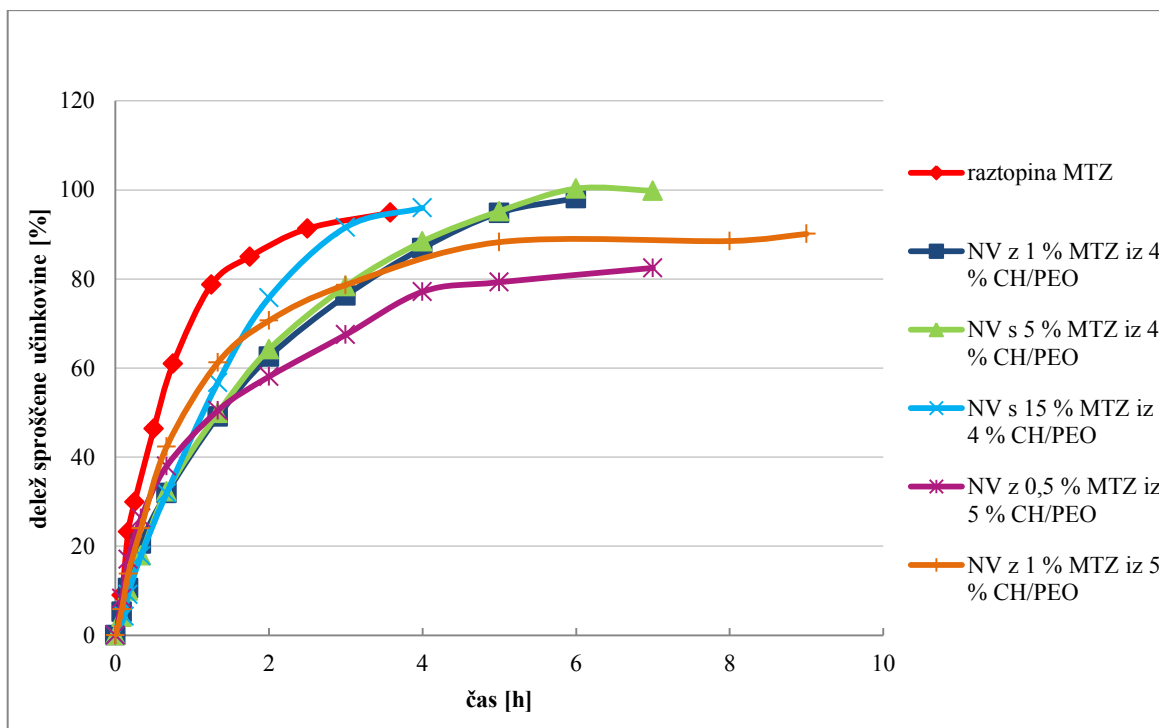
Cilj našega raziskovalnega dela je bil, da bi razvili NV z metronidazolom, ki bi se v parodontalnem žepu sproščal tako, da bi hitro dosegli MIC = 20 µg/ml, nato pa koncentracija učinkovine še 5 – 7 dni ne bi padla pod omenjeno mejo. Cilji so bili realno zastavljeni, saj smo si za izdelavo NV izbrali nabrekajoča in biorazgradljiva polimera, kar pomeni, da se ob stiku s tekočino na površini NV ustvari nabrekajoča plast, s čimer se poveča difuzijska razdalja učinkovine. Posledično se le-ta sprošča počasneje in dobimo želeno podaljšano sproščanje.

Prva sproščanja po optimizaciji protokola sproščanja v Franzovi celici smo izvedli z NV izdelanimi iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO z 1,0, 5,0 in 15,0 % vgradnjo metronidazola. Njihove profile prikazuje *slika 22* in iz nje je razvidno, da NV upočasnijo sproščanje metronidazola glede na raztopino le-tega. Sproščanje metronidazola je bilo pričakovano najhitreje iz NV s 15 % vgradnjo metronidazola, saj je bil vgrajen najvišji delež učinkovine izmed vseh izdelanih NV, hkrati pa so bila ta NV tudi ena izmed tanjših (tanjša od njih so bila le še NV s 5 % vgrajenega metronidazola – *preglednica 2*), kar pomeni, da so imela tudi veliko površino, preko katere je potekalo sproščanje učinkovine. V 4 urah se je tako sprostila že skoraj celotna količina vgrajenega metronidazola in ta delež je bil približno enak deležu metronidazola iz raztopine, ki je v tem času prešel filter. Presenetljivo pa *slika 22* prikazuje, da je sproščanje metronidazola iz NV z vgrajenimi 1 in 5 % te učinkovine potekalo časovno povsem enako, kljub različnemu deležu vgradnje metronidazola in tudi različni debelini NV (*preglednica 2*). NV s 5 % vgrajenega metronidazola so bila najtanjša izmed vseh izdelanih NV, posledično so imela tudi največjo površino, preko katere se je sproščal metronidazol, vanje pa je bil vgrajen večji delež metronidazola kot v NV z 1 % vsebnostjo te učinkovine. Pričakovali bi, da bi bilo sproščanje zato hitreje, a kot kaže ti parametri niso imeli bistvenega vpliva na hitrost sproščanja. Celotna količina metronidazola se je tako v obeh primerih sprostila v 6 urah, kar je 2 uri kasneje kot v primeru NV s 15 % vgradnjo te učinkovine.



Slika 22: Profili sproščanja metronidazola iz NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO z 1,0, 5,0 in 15,0 % vgrajene učinkovine glede na profil raztopine metronidazola.

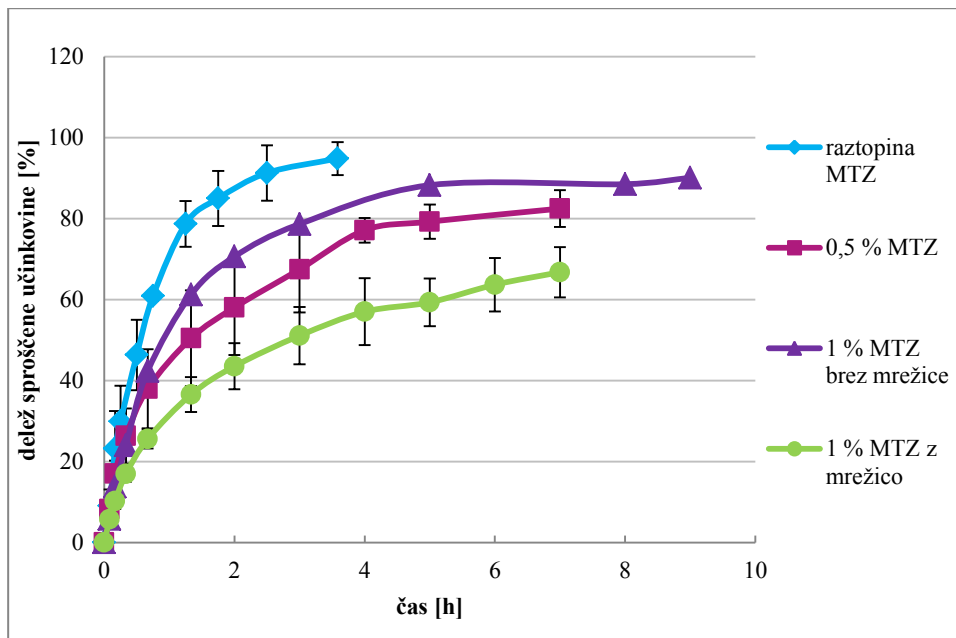
Uspešno smo izdelati tudi NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z vgrajenim metronidazolom in glede na to, da se je celotna količina metronidazola iz NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO sprostita hitreje, kot je bil naš zastavljen cilj, smo sklepali, da bi NV, izdelana iz raztopine z višjim deležem polimerov, imela večji premer in posledično bi se učinkovina sproščala počasneje zaradi podaljšane difuzijske razdalje. Poskuse sproščanja smo tako nadaljevali z NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO, v katera smo vgradili 0,5 in 1 % metronidazola. Iz rezultatov, ki jih prikazuje *slika 23*, lahko vidimo, da je sproščanje metronidazola iz NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO v prvih dveh urah celo hitrejše od sproščanja iz NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO. To lahko povežemo z rezultati nabrekanja in izgube mase NV v *poglavju 4.3.1*, kjer *slika 12* prikazuje bolj izrazit padec stopnje nabrekanja med prvo in drugo uro od stika z medijem pri tistih NV, izdelanih iz raztopine z večjim deležem polimera, kar je najverjetneje posledica raztapljanja PEO, saj v tem času NV izgubijo tudi skoraj polovico svoje mase in posledično se v okoliškem mediju raztopi tudi vgrajeni metronidazol. A po začetnih dveh urah oz. po približno 60 % sproščene metronidazola iz NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO se je sproščanje bistveno upočasnilo in celokupno podaljšalo za približno 5 – 7 ur glede na NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO z 1 oz. s 5 % vgrajenega metronidazola (*slika 23*). Po 2 urah se je ustalilo tudi zmanjševanje stopnje nabrekanja in po 24. urah je bila stopnja nabrekanja NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO višja od NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO (*slika 12*), zato lahko sklepamo, da delež polimera v raztopini za izdelavo NV vpliva na hitrost sproščanja učinkovine iz njih. Iz raztopine s 5 % (m/m) CH/PEO so namreč nastajala debelejša NV kot iz raztopine s 4 % (m/m) CH/PEO (*preglednica 2*), kar je prispevalo k večji nabreklosti NV tekom sproščanja in posledično daljši difuzijski razdalji metronidazola, poleg tega pa je imel metronidazol na razpolago še manjšo površino za prehod v okoliški medij, zato je bilo njegovo sproščanje iz NV izdelanih iz 5 % (m/m) raztopine počasnejše kot iz NV iz 4 % (m/m) raztopine. Na *sliki 23* lahko primerjamo profila sproščanja najtanjših NV, se pravi NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO s 5 % vgrajenega metronidazola, katerih premer je v povprečju meril 71 ± 14 nm, in najdebelejših NV, se pravi NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO s 0,5 % vgrajenega metronidazola, katerih premer je v povprečju meril 177 ± 41 nm, in vidimo, da vplivi deleža polimera v raztopini za izdelavo NV in posledične debeline izdelanih NV ter deleža vgrajene učinkovine niso zanemarljivi z vidika upočasnitve sproščanja metronidazola.



Slika 23: Profili sproščanja metronidazola iz vseh izdelanih NV (NV iz 4 % raztopine CH/PEO z 1,0, 5,0 in 15,0 % vgrajenega metronidazola ter NV iz 5 % raztopine CH/PEO z 0,5 in 1 % vgrajenega metronidazola) glede na raztopino metronidazola.

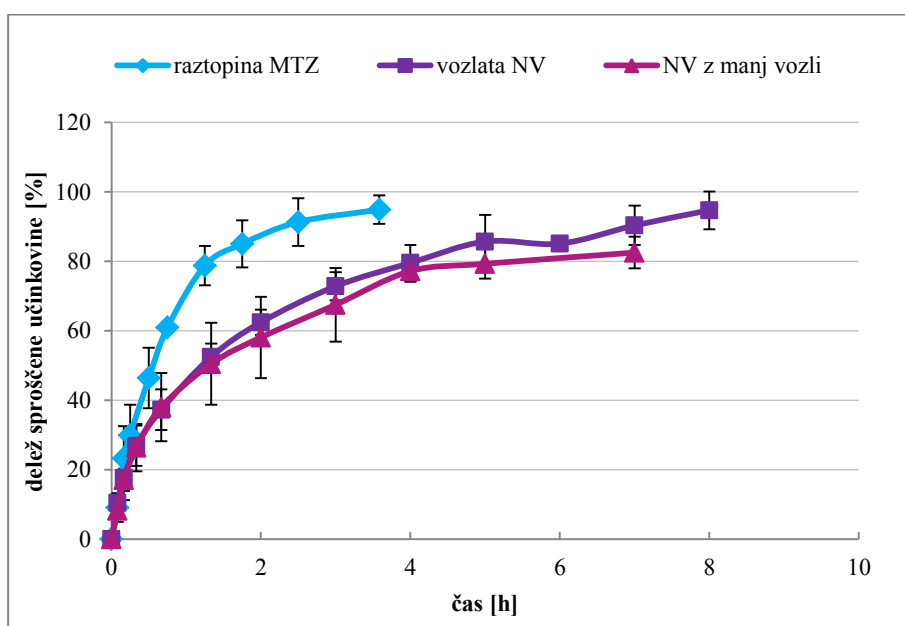
Najpočasneje se je tako metronidazol sproščal iz NV z 0,5 % vgrajene te učinkovine in izdelanih iz 5 % raztopine CH/PEO, ki so bila najdebelejša (177 ± 41 nm) in so imela najnižjo vsebnost metronidazola. Profil sproščanja slednjih NV je zelo podoben profilu sproščanja metronidazola iz NV z 1 % vgrajene učinkovine (*slika 24*), le da je hitrost sproščanja pri NV z višjim deležem učinkovine nekoliko višja. Ta primerjava pa zopet potrjuje tisto, kar pri NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO ni bilo povsem očitno, in sicer da višji delež vgrajene učinkovine pomeni tudi hitrejše sproščanje, vključujoč prav tako razliko v debelini in posledično površini ter nabreklosti NV – NV z 1 % vgrajenega metronidazola so bila nekoliko tanjša (122 ± 20 nm). A potrebno je poudariti, da se je s povečanjem deleža polimerov CH/PEO v raztopini za izdelavo NV na 5 % (m/m) in z variacijo deleža vgrajene učinkovine sproščanje metronidazola iz NV upočasnilo glede na NV izdelana iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO. Kljub temu pa smo poskuse nadaljevali v smeri, da bi ta čas sproščanja še podaljšali, zato smo z NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO in z 1 % vgradnjo metronidazola izvedli poskus sproščanja še na tak način, da po elektrostatskem sukanju NV nismo odstranili z mrežice Tegaderm, ampak smo jih dali v Franzovo celico kar skupaj z njo. Predhodno smo preverili, da mrežica ne veže

metronidazola in ne odpušča snovi, ki bi vplivale na meritev absorbance metronidazola pri $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$, kar smo tudi potrdili za časovno obdobje, v katerem je v naših primerih potekalo sproščanje metronidazola iz NV (rezultati niso prikazani). Kot je razvidno na *sliki 24*, se je sproščanje metronidazola iz NV na mrežici Tegaderm bistveno upočasnilo glede na sproščanje le-tega iz NV, ki niso bila na mrežici, saj se je po 7 urah sprostito le $66,79 \pm 6,20 \%$ celotne količine vgrajenega metronidazola. Glede na to, da so bila NV izdelana iz enake polimerne raztopine in je bil vanje vgrajen enak delež učinkovine, prav tako je sproščanje potekalo pri enakih pogojih, je lahko razlog za razliko v hitrosti sproščanja metronidazola le v prisotnosti mrežice Tegaderm. Predvidevamo, da je mrežica omejevala in upočasnila dostop medija do NV in tudi prehod metronidazola v okoliški medij, zaradi česar je prišlo do upočasnitve sproščanja učinkovine. NV so imela mrežico Tegaderm sicer le na eni ploskvi, vendar, ko smo dali NV v receptorski del Franzove celice, je lahko mrežica na nekaterih delih prekrila tudi prosto površino NV, zato je bila najverjetneje upočasnitev sproščanja še bolj izrazita. A kljub tej upočasnitvi je neizogibno dejstvo, da smo k NV dodali nerazgradljivo komponento, kar pomeni, da bi jo bilo potrebno odstraniti z mesta aplikacije po sprostitvi celotne količine učinkovine iz NV oz. po razgradnji le-teh.



Slika 24: Profili sproščanja metronidazola iz NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO z 0,5 in 1 % (na mrežici Tegaderm in brez nje) vgrajene učinkovine glede na profil raztopine metronidazola.

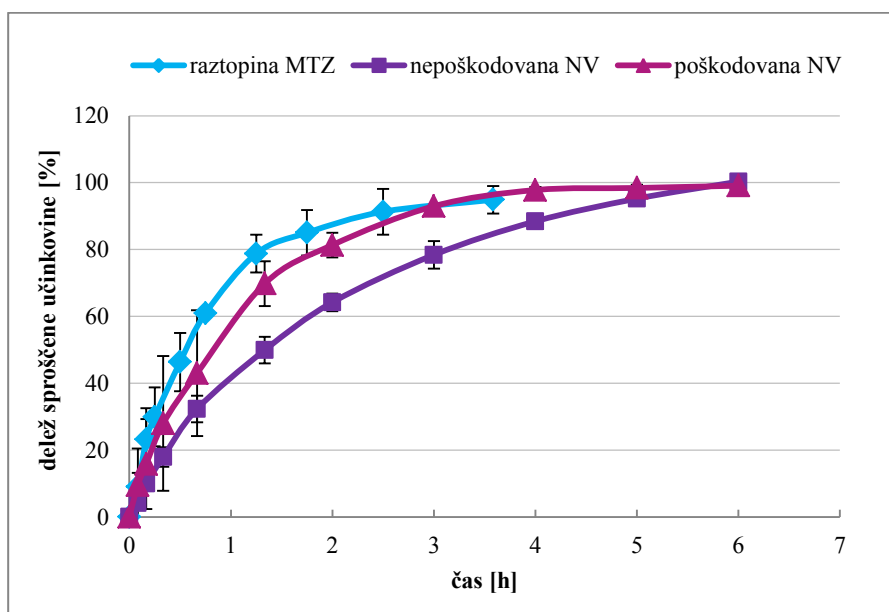
Preverili smo tudi vpliv drugih morfoloških razlik med NV na sproščanje metronidazola iz le-teh. Opazili smo namreč, da so pri elektrostatskem sukanju vzorcev NV z 0,5 % metronidazola enkrat nastala NV z več vozli kot drugič. Vozel pri NV pomeni območno zadebelitev te nitaste strukture, zakaj pa je prišlo do nastanka te morfološke razlike, pa je natančneje opisano v poglavju 4.1 *Razvoj praznih nanovlaken*, kjer izdelana NV prikazuje tudi *slika 10*. Z vidika sproščanja učinkovine pa območna zadebelitev NV pomeni zmanjšanje površine, ki je na voljo za sproščanje učinkovine, zato je pričakovati počasnejše sproščanje iz NV z več vozli v primerjavi s tistimi z manj vozli. A po drugi strani so lahko NV med vozli veliko tanjša od tistih NV brez vozlov, kar pa lahko posledično pospeši sproščanje. V našem primeru se je metronidazol sproščal rahlo hitreje iz NV z več vozli (*slika 25*), ki so bila res tudi tanjša od tistih z manj vozli (NV z vozli: 96 ± 16 nm; NV z manj vozli: 177 ± 41 nm), a bistvene razlike med profiloma sproščanja ni bilo. Zaradi kontrole procesa pa je kljub temu bolje izdelati enakomerna NV brez vozlov.



Slika 25: Vpliv vozlatosti NV na hitrost sproščanja metronidazola (NV iz 5 % raztopine CH/PEO z 0,5 % vgrajenega metronidazola).

V opisu izdelave NV (*poglavje 3.3.2 Elektrostatsko sukanje nanovlaken*) smo omenili, da je bilo NV težko odstranjevati z Alu-folije, na katero smo jih sukali. Od začetka smo to počeli s pomočjo spatule, s čimer smo za sproščanje pridobili manjše koščke NV in najverjetneje smo NV pri tem tudi poškodovali – morfološko spremenili. Kasneje smo NV sukali na mrežico Tegaderm, s katere je bilo odstranjevanje lažje in manj destruktivno za

NV, pridobljeni kosi NV pa so imeli večjo površino. Na *sliki 26* sta prikazana profila sproščanja metronidazola iz NV s 5 % vgradnjo le-tega, od katerih so bila ena pridobljena s strganjem z Alu-folije (poškodovana NV), druga pa so bila nasukana na mrežico Tegaderm (nepoškodovana NV). Za primerjavo hitrosti sproščanja je podan še profil raztopine metronidazola. Metronidazol se je iz poškodovanih NV sproščal hitreje kot iz nepoškodovanih NV in celotna količina učinkovine se je iz njih sprostila že v 4 urah. Vseeno pa je bilo sproščanje počasnejše glede na raztopino, kar nam pove, da so NV, kljub poškodbam, omogočila podaljšano sproščanje. Iz nepoškodovanih NV se je metronidazol sproščal 2 uri dlje, hitrost pa je bila vidno manjša (*slika 26*). Slednje nam tako pove, da je bistvenega pomena, da se NV čim manj poškoduje pri rokovanju in med prenosom od mesta izdelave do mesta aplikacije, če želimo z njimi doseči podaljšano sproščanje.



Slika 26: Vpliv poškodb NV na sproščanje metronidazola (NV iz 4 % (m/m) raztopine CH/PEO s 5 % vgrajenega metronidazola).

5 SKLEP

V tej magistrski nalogi smo razvili biorazgradljiva NV s podaljšanim sproščanjem metronidazola za zdravljenje parodontalne bolezni. Brez težav smo izdelali enakomerna NV kar iz dveh raztopin CH/PEO – 4 in 5 % (m/m), ter vanje vgradili tudi do 15 % metronidazola, brez da bi le-ta kristaliziral na njihovi površini. Izdelana NV iz CH/PEO so izredno bioadhezivna zaradi zelo bioadhezivnih polimerov in velike površine, saj so bila izdelana NV hkrati tudi zelo tanka – premer najtanjših je v povprečju meril le 71 ± 14 nm. Dokazali smo, da metronidazol ni razpadal tekom izdelave NV in poskusov sproščanja. Prav tako smo dokazali, da NV kot farmacevtska oblika omogočajo podaljšano sproščanje učinkovine, saj je bilo sproščanje metronidazola iz NV vedno počasnejše v primerjavi z raztopino te učinkovine, celokupno pa se je metronidazol sproščal tudi do 12 ur iz NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO. Sicer želenega cilja sproščanja metronidazola od 5 do 7 dni nismo dosegli, vendar je potrebno poudariti, da smo poskuse sproščanja izvajali v približno 0,5 ml PBS pufra, kar je še vedno tudi 500-krat več medija, kot je gingivalne tekočine v parodontalnem žepu ($0,4 - 1,5 \mu\text{L}$) [11]. Poleg tega pa imajo NV iz CH/PEO še dokazano veliko kapaciteto za prevzem vodnega medija, zato se najverjetneje niti ne bi v celoti omočila ob prvem stiku s tekočino v parodontalnem žepu, kar pomeni, da bi sproščanje metronidazola *in vivo* nedvomno potekalo veliko počasneje kot je prikazano v tej nalogi, tudi iz NV z najvišjim, 15 % deležem vgradnje te učinkovine. Tako visoka vgradnja bi bila celo zaželeno, saj je pri protimikrobnem zdravljenju potrebno v čim krajšem času doseči MIC, da preprečujemo pojav rezistentnih bakterij.

Poleg okolja pa imajo velik vpliv na podaljšano sproščanje zdravilne učinkovine tudi lastnosti samih NV. Iz naših raziskav bi izpostavili predvsem nadzorovano izdelavo NV, da so ta enakomerna, brez vozlov in enakomerne debeline. Pomembno je tudi ravnanje z NV od izdelave do aplikacije, saj lahko poškodbe prav tako vplivajo na hitrost sproščanja učinkovine. Najpomembnejše pa je, da višji delež vgradnje učinkovine v NV pomeni hitrejše sproščanje, medtem ko lahko višji delež nevodotopnega, a hidrofilnega polimera v raztopini za izdelavo NV bistveno podaljša sproščanje učinkovine iz NV. V našem primeru je sproščanje metronidazola potekalo dlje iz NV iz 5 % (m/m) raztopine CH/PEO kot iz NV iz 4 % (m/m) raztopine, a hkrati smo ugotovili, da NV zelo hitro izgubijo svojo integriteto zaradi 50 % deleža vodotopnega PEO v mešanici CH/PEO. PEO se je namreč že v 2 urah skoraj povsem raztopil, na račun česar so NV izgubila približno 50 % svoje

mase, s tem pa se je sprostil tudi vgrajeni metronidazol. Posledično bi za nadaljnje poskuse izdelave NV iz CH/PEO predlagali, da se poišče največje razmerje CH/PEO iz katere v raztopini še nastajajo NV s postopkom elektrostatskega sukanja ali pa se celo usmeri v razvoj NV iz samega CH, saj je to nekaterim raziskovalcem že uspelo s pomočjo predhodne hidrolize le-tega [42, 43]. Za doseg podaljšanega sproščanja bi bilo, poleg povečanja vsebnosti CH, smiselno uporabiti tudi katero od podvrst elektrostatskega sukanja, saj lahko z njimi izdelamo NV z jedrom in ovojnico, ali pa bi bilo smiselno NV nasukati v več plasteh, npr. da se najprej nasuka prazna NV, nato nanje NV z učinkovino ter čeznje še ena plast praznih NV. Mnenja smo namreč, da je idejna zasnova lokalnega zdravljenja parodontalne bolezni z NV zelo dobra, saj je z njimi zagotovljeno tako protibakterijsko zdravljenje kot tudi mehanska spodbuda za razvoj zdravega tkiva. Prav tako menimo, da je zaželena uporaba biorazgradljivih materialov, zato da po doseg cilja zdravljenja z NV ne bi bilo potrebno le-teh odstraniti, ker bi s tem zopet ranili tkivo, ki smo ga komaj spodbudili k celjenju. S tem pa ne predlagamo le striktno usmeritve v raziskovanje CH/PEO, ampak da se stremi k iskanju novih kombinacij biorazgradljivih polimerov primernih za elektrostatsko sukanje in zdravljenje parodontalne bolezni. Za nadaljnje poskuse je potrebno tudi izboljšati *in vitro* model parodontalnega žepa. Franzova celica je že zelo dober približek *in vivo* pogojem in potrebno je poudariti, da je velika prednost tega sistema, da že sam po sebi omogoča filtracijo, vendar je vseeno potrebno poiskati nekaj izboljšav.

NV kot dostavni sistemi za zdravljenje parodontalne bolezni so zaradi svojih lastnosti zanimiva za raziskovanje, a tekom izdelave te magistrske naloge nismo zasledili znanstvene literature, ki bi opisovala izdelavo NV iz CH in PEO z metronidazolom. Nam je uspelo izdelati NV iz teh dveh biorazgradljivih in biokompatibilnih polimerov z zelo učinkovito učinkovino za zdravljenje parodontalne bolezni – metronidazolom, ter doseči podaljšano sproščanje, kar je lahko primerno tudi za zdravljenje katerih drugih bolezni ali stanj (npr. kroničnih ran, bakterijskih vaginalnih okužb) in ne le za zdravljenje parodontalne bolezni. S tem smo naredili nov korak v razvoju te zelo obetavne farmacevtske oblike, poleg tega pa je bil namen te magistrske naloge tudi učenje in spoznavanje samostojnega raziskovalnega dela, kar je predstavljalo izziv, neprecenljivo izkušnjo ter prispevek k profesionalnemu in osebostnemu razvoju in prav izkušnje so tiste, ki v današnjem času štejejo.

6 LITERATURA

- [1] Berkow R et. al.: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo, MSD, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2001: 467-470.
- [2] Laskaris G: Color Atlas of Oral Diseases, second edition, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, 1994: 85-87.
- [3] European Federation of Periodontology: More on Periodontitis.
<http://www.efp.org/public/more-on-periodontitis.html>, dostopano: 08-09-2014.
- [4] Zupančič Š, Kocbek P, Baumgartner S et. al.: Contribution of nanotechnology to improved treatment of periodontal disease. *Current Pharmaceutical Design* 2015; 21: 3257-3271.
- [5] Jain N, Jain GK, Javed S et. al.: Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discovery Today* 2008; 13: 932-943.
- [6] Sotošek A, Videmšek P: Bakteriološka analiza subgingivalnih zobnih oblog slovenskih bolnikov s kroničnim parodontitisom, Prešernova naloga, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2013: 15-20.
- [7] Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E: Antibiotic resistance: a »dark side« of biofilm-associated chronic infections. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2013; 123 (6): 309-313.
- [8] Bidault P, Chandad F, Grenier D: Systemic antibiotic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of the Canadian Dental Association* 2007; 73 (6): 515-520.
- [9] Chaturvedi TP, Srivastava R, Srivastava AK et. al.: Evaluation of metronidazole nanofibers in patients with chronic periodontitis: A clinical study. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2012; 2: 213-217.
- [10] Prakasam A, Elavarasu SS, Kumar Natarajan R: Antibiotics in the management of aggressive periodontitis. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2012; 4 (2): S252-S255.
- [11] Zupančič Š, Baumgartner S, Lavrič Z et. al.: Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2015; 30: 408–416.

- [12] Beale JM, Block JH: Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, 12th edition. Philadelphia [etc.]: Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, 2011: 220-221.
- [13] Reise M, Wyrwa R, Müller R et. al.: Release of metronidazole from electrospun poly(L-lactide-co-L/D-lactide) fibers for local periodontitis treatment. Dental Materials 2012; 28: 179-188.
- [14] Fagron Netherlands: Varnostni list: Metronidazol, št. različice 19. Fagron B.V. 25.02.2011.
- [15] Watson DG: Pharmaceutical chemistry. Edinburgh: Churchill Livingstone, cop. 2011: 165-166.
- [16] Concil of Europe: European Pharmacopoeia 6, volume 2. 2007: 2414-2415.
- [17] Wu Y, Fassihi R: Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination. International Journal of Pharmaceutics 2005; 290: 1-13.
- [18] Takahashi N, Ishihara K, Kato T et. al.: Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 59: 59-65.
- [19] Pelipenko J, Kristl J, Janković B et. al.: The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. International Journal of Pharmaceutics 2013; 456: 125-134.
- [20] Hegde RR, Dahiya A, Kamath MG: Nanofibers nonwovens. <http://www.engr.utk.edu/mse/Textiles/Nanofiber%20Nonwovens.htm>, dostopano: 18-09-2014.
- [21] Rošić R, Pelipenko J, Kristl J et. al.: Properties, engineering and applications of polymeric nanofibers: Current research and future advances. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 2012; 26: 417-425.
- [22] Bhattarai N, Edmonson D, Veisoh O et. al.: Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. Biomaterials 2005; 26: 6176-6184.
- [23] Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J: Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. International Journal of Pharmaceutics 2015; 484: 57-74.
- [24] Hu X, Liu S, Zhou G et.al.: Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. Journal of Controlled Release 2014; 185: 12-21.

- [25] Pelipenko J: Polimerna nanovlakna: razvoj, vrednotenje in celični odziv, doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014: 8-10.
- [26] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM et. al.: Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2011; 36: 981-1014.
- [27] Kerenc Kos M: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 287-291.
- [28] Pakravan M, Heuzey MC, Ajji A: A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer* 2011; 52: 4813-4824.
- [29] Rošic R, Pelipenko J, Kocbek P et. al.: The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *European Polymer Journal* 2012; 48, 1374-1384.
- [30] Goldstein J, Newbury D, Joy D et. al.: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis, 3th edition, Springer Science, New York, 2003: 21-25.
- [31] Nguyen TTT, Ghosh C, Hwang S et. al.: Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 439: 296-306.
- [32] Xue J, He M, Liu H et. al.: Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials* 2014; 35: 9395-9405.
- [33] Jannesari M, Varshosaz J, Morshed M et. al.: Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine* 2011; 6: 993-1001.
- [34] Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B et. al.: The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013; 84: 401-411.
- [35] Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H et. al.: Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63: 209-220.
- [36] Aulton ME, Taylor K: Aulton's pharmaceutics: the design and manufacture of medicines, 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2013: 7-19, 334-354, 367-394, 675-697.

- [37] Gosenica M, Gašperlin M: Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije. Farmaceutski vestnik 2009; 60: 8-13.
- [38] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS: Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry, 3th edition. Fort Worth [etc.]: Harcourt College, cop. 2001: 353-389.
- [39] Concil of Europe: European Pharmacopoeia 6, volume 1. 2007: 274.
- [40] Khalid MN, Agnely F, Yagoubi N et. al.: Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. European Journal of Pharmaceuticals Sciences 2002; 15: 425-432.
- [41] Patel VR, Amiji MM: Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. Pharmaceutical Research 1996; 13: 588-593.
- [42] Li L, Hsieh YL: Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. Carbohydrate Research 2006; 341: 374-381.
- [43] Homayoni H, Hosseini Ravandi SA, Valizadeh M et. al.: Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. Carbohydrate Polymers 2009; 77: 656-661.

PRILOGA 1

Preglednica 4: Najpogosteje uporabljene protimikrobne učinkovine za zdravljenje parodontalne bolezni in njihovo delovanje [8, 10].

Protimikrobna učinkovina	Spekter delovanja	Konc. v gingivalni tekočini	Odmerek	Kombinacija	Rezistenca
amoksicilin (β-laktami)	širok (proti G- in G+)	nizka	500 mg 3x/dan, 8 dni	s klavulansko kislino ali z MTZ*	DA (razvoj β-laktamaze)
metronidazol (nitroimidazoli)	proti anaerobnim bakterijam	zadostna	500 mg 3x/dan, 8 dni	z AMX* ali z AMC* ali s CIP*	nizka
doksicilin minocilin (tetraciklini)	proti <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> antikolagenazna aktivnost (zavrejo uničenje obzobnih tkiv in resorpcijo alveolne kosti)	zelo niha	250 mg 4x/dan; doksicilin: 1. dan 100 mg 2x/dan, nato 100 mg 1x/dan, do 21 dni	/	neznana vprašljiva učinkovitost pri okužbah, ki jih povzročajo več bakterij
ciprofloksacin (fluorokinoloni)	proti fakultativnim bakterijam, nekaterim anaerobnim bakterijam, proti vsem sevom <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	visoka	500 mg 2x/dan, 8 dni	z MTZ	neznana
azitromicin klindamicin (makrolidi)	proti G(-) anaerobom	visoka v žepih (penetrira v fagocite in z njimi pride na mesto vnetja)	Začetni odmerek: 500 mg, nato 250 mg 1x/dan, 5 dni	/	neznana možen razrast <i>Clostridium difficile</i> in razvoj membranskega kolitisa

*MTZ - metronidazol, AMX - amoksicilin, AMC - amoksicilin in klavulanska kislina, CIP - ciprofloksacin