

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde „Hans Morat“

Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. H. Lang

Kontrollierte Freisetzung von Atorvastatin aus alginatbasierten Mikropartikeln für die adjuvante Parodontitistherapie

Dissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Imke Hlawka | geb. am 05.04.1996 in Ribnitz-Damgarten

Dekan: Prof. Dr. Bernd Krause

1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Lang, Universitätsmedizin Rostock, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Niels Grabow, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Biomedizinische Technik
3. Gutachterin: Prof. Dr. Marcella Esteves Oliveira, Universitätsmedizin Tübingen, Poliklinik für Zahnerhaltung

Datum der Einreichung: 04.04.2025

Datum der Verteidigung: 18.11.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Parodontitis.....	6
1.2 Therapie	9
1.2.1 Kausale Therapie.....	9
1.2.2 Adjuvante Therapie.....	10
1.3 Parodontale Drug Delivery Systeme	11
1.4 Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Alginat.....	15
2.1.2 Atorvastatin.....	16
2.1.3 Methylcellulosegel.....	17
2.1.4 Kunstspeichel	18
2.1.5 Divinylsulfon.....	19
2.2 Herstellung von Alginatpartikeln.....	20
2.2.1 Inkorporation von Atorvastatin in Alginat	20
2.2.2 Externe Gelation mittels Ultraschallscaler und -prozessor.....	20
2.2.3 Vergleich direkter und nachträglicher Wirkstoffbeladung	22
2.2.4 Größensortierung der Partikel	22
2.3 Verschiedene Partikelformulierungen.....	25
2.3.1 Variation der Alginatkonzentration.....	25
2.3.2 Variation der Partikelgröße.....	25
2.3.3 Variation der Atorvastatinkonzentration.....	25
2.3.4 Chemische Quervernetzung mit Divinylsulfon	25
2.4 Freisetzungsuntersuchung.....	26
2.4.1 Aufbau der Freisetzungsstudie.....	26
2.4.2 Bestimmung der Wirkstoffkonzentration mit HPLC	27
2.5 Ermittlung der Freisetzungseigenschaften	28
2.5.1 Bewertung der Trägerstabilität	28
2.5.2 Mathematische Modellierung der Wirkstofffreisetzung	28
2.5.3 Statistische Untersuchungen.....	30

3. Ergebnisse	31
3.1 Screening: Vergleich direkter und nachträglicher Beladung	31
3.2 Konzipierte Formulierungen	33
3.3 Freisetzungseigenschaften	34
3.4 Freisetzungsprofil aus Methylcellulosegel und Ultraschallscaler erzeugten Partikeln.....	35
3.5 Einfluss der Alginatkonzentration und der Partikelgröße auf das Freisetzungsprofil.....	37
3.6 Einfluss der Atorvastatinkonzentration auf das Freisetzungsprofil	40
3.7 Einfluss von Divinylsulfon auf das Freisetzungsprofil	41
3.8 Mechanismen der Wirkstofffreisetzung verschiedener Formulierungen..	42
4. Diskussion	43
4.1 Entwicklung parodontaler Drug Delivery Systeme.....	43
4.2 Alginatpartikel	44
4.3 Inkorporation von Atorvastatin.....	47
4.4 Drug Release aus verschiedenen Formulierungen.....	47
4.5 Ausblick auf klinische Anwendung	51
5. Zusammenfassung	53
6. Thesen.....	54
7. Publikation	55
8. Selbstständigkeitserklärung.....	56
9. Danksagung	57
10. Anhang	58
10.1 Abbildungsverzeichnis	58
10.2 Tabellenverzeichnis	61
11. Literatur.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Alg	<i>Alginat</i>
Ator	<i>Atorvastatin</i>
DVS	<i>Divinylsulfon</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MC	<i>Methylcellulose</i>
PAMP	<i>Pathogen-assoziiertes molekulares Muster</i>
SRP	<i>Scaling and Root Planing</i>
UP	<i>Ultraschallprozessor</i>
US	<i>Ultraschallscaler</i>

1. Einleitung

1.1 Parodontitis

Parodontitis bezeichnet eine bakterielle Infektion des Zahnhalteapparats. Archäologische Funde belegen, dass diese oft chronisch verlaufende Erkrankung bereits bei den Neandertalern und im alten ägyptischen Volk auftrat [1]. Heute zählt Parodontitis zu den weltweit häufigsten Krankheiten und ist neben Karies eine der Hauptursachen für Zahnverlust. In Deutschland ist laut der fünften Mundgesundheitsstudie fast jeder zweite jüngere Erwachsene von einer parodontalen Erkrankung betroffen [2]. Weltweit, so zeigen neuere Schätzungen, ist das Ausmaß im letzten Jahrzehnt größer als vermutet. Demnach waren zwischen 2011 und 2020 etwa 62 % der globalen Bevölkerung von einer moderaten und 23,6 % von einer schweren parodontalen Erkrankung betroffen [3]. Menschen in einkommensstarken Ländern sind dabei häufiger betroffen als Menschen in Ländern mit niedrigem Einkommen [4].

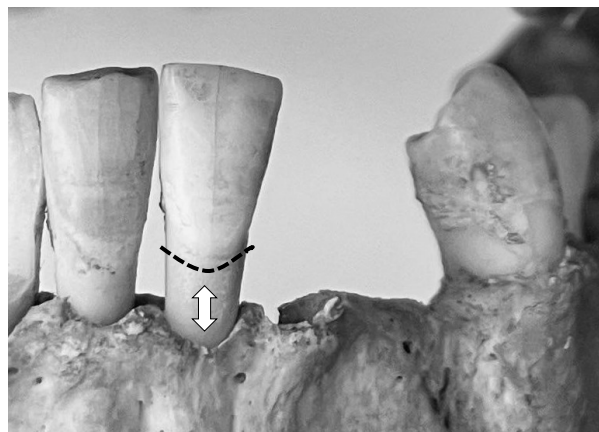


Abbildung 1: Rückgang des Alveolarknochens an Zahn 31 als Folge einer Parodontitis

Aufgrund anatomischer Gegebenheiten ist das Parodont eine der Regionen, an denen eine besonders rasche Penetration von Bakterien in das Gewebe erfolgen kann [5]. Das klinische Bild der Parodontitis ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende entzündliche Destruktion des Zahnhalteapparats, welche sich als Immunantwort des Gewebes auf Bakterien an der Zahnoberfläche verstehen lässt. Greift die Entzündung auf tiefere Strukturen über, kommt es zur Ausbildung einer gingivalen Tasche und dem Abbau des Alveolarknochens (Abbildung 1). Diese Prozesse, auch als klinischer Attachmentverlust bezeichnet, können ohne eine adäquate zahnärztliche Behandlung in Lockerung der Zähne und deren Verlust resultieren [6]. Zahnverlust wiederum hat bei vielen Menschen

eine Verschlechterung der Kau- und Sprechfunktion sowie ästhetische Beeinträchtigungen zur Folge. Die Konsequenzen sind weitreichend. So kann ein ungenügender Zahnersatz, der möglicherweise infolge angefertigt wird, die Lebensqualität stark einschränken [7].

Es ist allgemein bekannt, dass Parodontiden eine heterogene Gruppe von Erkrankungen repräsentieren. Die geläufigen Formen beruhen jedoch auf einer gemeinsamen Kette pathogenetischer Ereignisse. Es ist hervorzuheben, dass die klinische Ausprägung maßgeblich durch den individuellen Immunstatus des Patienten, durch genetische Dispositionen sowie durch externe Risikofaktoren beeinflusst wird [8]. Es besteht beispielsweise ein evidenter Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus Typ 2 und Parodontitis. In der globalen Klassifikation der Parodontalerkrankungen wird Diabetes deshalb auch als Risikofaktor für Parodontitis berücksichtigt. Weiterhin kann Rauchen und Tabakkonsum als verhaltensbedingter Faktor ein 2- bis 5-fach höheres Risiko für die Erkrankung bedeuten [9]. Zahlreiche Belege gibt es weiterhin für die Assoziation von Herz-Kreislaufkrankungen mit parodontalen Erkrankungen [10, 11].

Die Parodontitis entwickelt sich in der Regel aus einer Gingivitis, einer reversiblen Entzündung des Zahnfleisches. Diese stellt eine physiologische Abwehrreaktion des Körpers gegen pathogene Mikroorganismen dar, die auf der Zahnoberfläche einen organisierten Biofilm (Plaque) gebildet haben. Wird der bei jedem Menschen täglich neu entstehende Biofilm durch adäquate häusliche Mundhygiene und regelmäßige professionelle Plaque- und Zahnsteinentfernung eliminiert, kann schon die primäre Gingivitis beherrscht und eine Heilung ad integrum stattfinden [6]. Die Besiedlung des Zahnes mit nicht-pathogenen, kommensalen Bakterien ist physiologisch, zudem produzieren B-Zellen und Plasmazellen im gesunden Parodont genügend Antikörper, um eventuell eindringende Bakterien abzuwehren [12]. Bei unzureichender Mundhygiene und längerem Fortbestehen der Plaque, nimmt jedoch die Anzahl parodontopathogener Bakterien zu. Das Mikrobiom verändert sein Spektrum von überwiegend aeroben grampositiven Bakterienstämmen hin zu überwiegend anaeroben gramnegativen Bakterienspezies. Das Vorhandensein von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) auf den Bakterien sorgt über Rezeptoren von angeborenen Immunzellen für die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr. Ein wichtiges Beispiel für PAMPs ist das Lipopolysaccharid (LPS), welches in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt und über Pattern Recognition Rezeptoren von Immunzellen erkannt wird. Die Bakterien erzeugen Metabolite, auf die in das Parodont eingewanderte Entzündungszellen mit Ausschüttung

proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine reagieren. Die immunologische Beseitigung der Noxen kann bei parodontalen Entzündungen jedoch kaum gelingen, da Biofilmbakterien weitestgehend resistent gegen Phagozytose und humorale Effektorproteine sind [13]. Residente Fibroblasten, die im gesunden Parodont üblicherweise Kollagen für den Zahnhalteapparat aufbauen, erzeugen als Reaktion auf die gestörte Gewebshomöostase Abbauenzyme, die zur Ausbildung einer gingivalen Tasche führen. Diesen komplexen Prozessen zugrunde liegt der Versuch des Organismus, sich gegen unkontrollierte Ausbreitung infektiöser Bakterien und ihren Virulenzfaktoren zu schützen [13]. Die pathogene Plaque kann in ihrem Fortbestehen noch tiefer ins Parodont vordringen und über Aktivierung von Osteoklasten zum entzündlichen Abbau des Alveolarknochens führen, welcher in Zahnlockerung und -verlust resultieren kann [6]. Erschwert wird die immunologische Abwehr zusätzlich durch komplexe Strategien der pathogenen Keime. *Porphyromonas gingivalis*, einer der wichtigsten Markerkeime bei Parodontitispatienten, enthält beispielsweise Phosphatasen, die LPS in eine nicht-immunogene Form umwandeln können. Dies begünstigt das Überleben der Bakterien, da sie anschließend nicht mehr adäquat von der körpereigenen Abwehr erkannt werden [14].

Der Schweregrad einer Parodontitis wird mithilfe von klinischen und röntgenologischen Kriterien in vier Stadien von „beginnend“ bis „sehr schwer“ beschrieben. Zudem wird entsprechend der Progredienz die Einteilung in Grade vorgenommen (langsam - moderat - schnell fortschreitend). Sofern bei einem Menschen mehr als 30% der Zähne vom Rückgang des Parodonts betroffen sind, wird von einer generalisierten Parodontitis gesprochen [9].

1.2 Therapie

1.2.1 Kausale Therapie

Zu den primären Zielen der Parodontitistherapie zählen die Reduktion der Entzündung, eine Verkleinerung der parodontalen Taschen und die Verhinderung weiteren Attachmentverlusts. Von einer vollständigen Regeneration des Parodonts kann in der Regel nicht ausgegangen werden [6]. Die sogenannte subgingivale Instrumentierung, auch als „Scaling and Root Planing“ (SRP) bezeichnet, wird seit Jahrzehnten mit Erfolg als Goldstandard bei Parodontitispatienten durchgeführt [15]. Mithilfe von scharfen Handküretten und/oder maschinellen Ultraschallsystemen entfernt der Behandler den auf der Wurzeloberfläche befindlichen pathogenen Biofilm und Zahnstein. Es findet dabei gleichzeitig eine Glättung der Wurzeloberfläche statt [6]. Schwierigkeiten beim SRP, bei welchem der Zahnfleischsulkus als Eingang zur Tasche genutzt wird, sind ein eingeschränkter Zugang der Instrumente für tiefe Taschen, Wurzelfurkationen und Wurzelkonkavitäten. Auch Dentintubuli, kleinere Spalten und Hohlräume auf der Wurzeloberfläche lassen sich schwer bearbeiten [16]. Im Gegensatz zum geschlossenen Verfahren, kann eine Instrumentierung deshalb auch im offenen Verfahren unter Sicht mittels chirurgischer Freilegung der Wurzeloberfläche und anschließender plastischer Deckung erfolgen. Diese Intervention wird von Fachgesellschaften jedoch erst bei Taschentiefen ≥ 6 mm oder bei refraktären Fällen als indiziert angesehen [17].

Eine absolute Eliminierung der Bakterien ist unabhängig von der gewählten Behandlungsmethode weder zu erreichen, noch für den Behandlungserfolg notwendig [16]. Die subgingivale Instrumentierung ist dennoch von entscheidender Bedeutung, da Biofilme in vielerlei Hinsicht resistent gegenüber äußeren Einwirkungen sind. Desinfektiva oder Pharmaka können nur begrenzt in den organisierten Verband der Mikroorganismen eindringen. Das Hauptanliegen der Instrumentierung ist daher neben der Reduktion supra- und subgingivaler parodontopathogener Keime, das Aufbrechen der Matrixstrukturen des Biofilms. Der Vorgang führt zu einer besseren Zugänglichkeit für adjuvante Substanzen und letztlich zu einem verbesserten immunologischen Gleichgewicht im Parodont [13].

1.2.2 Adjuvante Therapie

Laut Untersuchungen findet an einer (freiliegenden) gesäuberten Wurzeloberfläche eine rasche Rekolonisierung mit pathogenen Bakterien innerhalb von 3-6 Monaten statt [13]. In der Parodontitistherapie stellt die Anwendung adjuvanter Medikamente, die der mechanischen Instrumentierung stets ergänzend zuzuordnen sind, einen üblichen Ansatz dar. Bei schnell voranschreitenden Parodontitiden werden systemische Pharmaka, wie beispielsweise Antibiotika, eingesetzt. Allerdings bestehen dabei Bedenken bezüglich unerwünschter Nebenwirkungen und der Entwicklung von Resistenzen auf globaler Ebene [18]. Demgegenüber bieten lokal, d.h. in der Zahnfleischtasche applizierte Pharmaka, Vorteile in Form von hoher Wirksamkeit am verabreichten Ort sowie dem Wegfallen systemischer Nebenwirkungen [6]. Ziele sind eine verbesserte Infektionskontrolle, das Aufhalten der Gewebedestruktion und die Beeinflussung von Regenerationsprozessen im Parodont [19]. Gängige Beispiele sind die subgingivale Anwendung von Chlorhexidin als Antiseptikum sowie Arzneimittelsysteme mit antibiotischen Präparaten, z. B. Doxycyclin. Im Verlauf der historischen Entwicklung wurden eine Reihe alternativer Produkte als therapeutische Maßnahmen zur Behandlung von Zahnfleiscentzündungen eingesetzt. Dazu zählen Enzyme, ätherische Öle, Metallsalze, Ammoniumverbindungen sowie Kräuterextrakte. Die Effektivität letztgenannter Produkte konnte in klinischen Studien jedoch nicht nachgewiesen werden [20]. Das über die letzten Jahrzehnte neu erworbene Verständnis der Pathogenese parodontaler Erkrankungen lässt neue Präparate in den Fokus wissenschaftlicher Forschung rücken, die Entzündungen auf zellulärer Ebene modulieren können. Statine als Medikamentenklasse werden als neue, hochwirksame zahnmedizinische Therapeutika vorgeschlagen, insbesondere für Parodontitispatienten [21]. Statine werden in der Medizin primär zur Behandlung von Patienten mit erhöhten Cholesterinwerten eingesetzt. Sie haben aber auch wichtige pleiotrope Wirkungen, darunter immunmodulatorische, entzündungshemmende und antiresorptive Eigenschaften [22]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die lokale Anwendung von Statinen, als Ergänzung zur nicht-chirurgischen Parodontalbehandlung von tiefen Taschen, zu einer statistisch signifikanten klinischen und röntgenologischen Verbesserung von Knochendefekten im Vergleich zur alleinigen Instrumentierung führen kann [19, 23].

1.3 Parodontale Drug Delivery Systeme

Damit die oben beschriebenen lokalen Adjuvantien in der Zahnfleischtasche ihre optimale Wirkung entfalten können, ist die Verabreichung mittels eines geeigneten Medikamententrägers (Drug Delivery Systems) notwendig. Die Medikamente würden ohne Träger sonst leicht durch Speichel und Sulkusflüssigkeit aus der parodontalen Tasche ausgewaschen werden. Das Prinzip von Drug Delivery Systemen beruht im Allgemeinen darauf, dass Medikamente mit Hilfsstoffen kombiniert werden. Diese sorgen für eine gleichmäßigere Freisetzung und Bioverfügbarkeit des eigentlichen Wirkstoffs und schützen es vor Abbau [24]. Hilfsstoffe üben keine direkte therapeutische Wirkung aus. Jedoch bestimmen Sie über die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Absorption des Arzneimittels und können somit seine klinische Wirkung potenziell beeinflussen. Auch wenn die Entwicklung neuer Medikamententräger mit einem hohen Aufwand verbunden ist, könnten diese aufgrund verbesserter pharmakologischer Profile letztlich eine kosteneffizientere Alternative zu herkömmlichen Formulierungen darstellen [25].

Werden Drug Delivery Systeme so konzipiert, dass Arzneimittel sofort oder mit einer Verzögerung von weniger als 24 h freigesetzt werden, spricht man von „Non-sustained“ oder „Sustained-release Systemen“ (Abbildung 2).

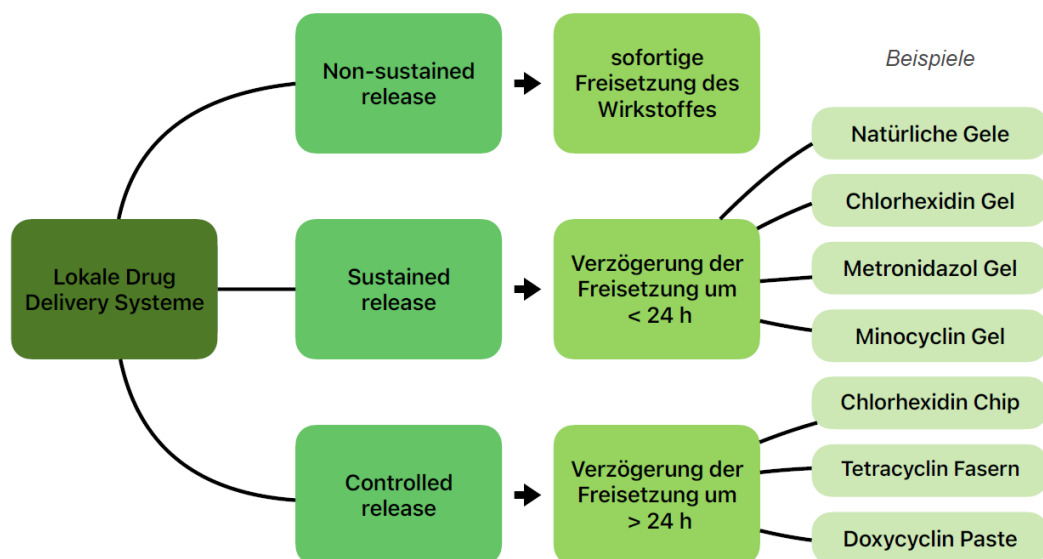


Abbildung 2: Einteilung parodontaler Drug Delivery Systeme mit Beispielen [20]

Medikamententräger mit einer Verzögerung von über 24 h, bei denen eine reproduzierbare Kinetik der Wirkstofffreisetzung erfolgt, werden als „Controlled Release Systeme“ bezeichnet [26]. Hydrogele und Chips auf Polymerbasis haben ihren Nutzen in der Parodontologie als Controlled Release Systeme bereits unter Beweis gestellt. Auch die Verwendung von Polymerfilmen, Fasern, vesikulären Systemen und Pasten wurden in mehreren klinischen Studien erforscht [27, 28]. Die bestehenden Systeme weisen jedoch Nachteile auf. So müssen z. B. Parodontalchips zum Teil manuell an die Größe der Zahnfleischtasche angepasst werden (z. B. 4 x 5 mm bei PerioChip®), was einen zeitaufwändigen Prozess darstellt. Pasten haben den Nachteil einer tendenziell schnellen und insgesamt kurzzeitigen Freisetzung. Früher verwendete Träger (wie z.B. Ethylvinylacetatfasern) sind wiederum nicht biologisch resorbierbar und mussten durch den Behandler von Hand wieder entfernt werden [14].

In dieser Arbeit stehen Mikropartikel aus Alginat als Träger für parodontale Medikamente im Fokus, da sie biokompatibel und leicht zu applizieren sind. Durch ihre Größe passen sie in jede Zahnfleischtasche und können dort optimal verteilt werden. Die mukoadhäsiven Eigenschaften des Alginats könnten außerdem zu einer verlängerten Verweildauer in der Zahnfleischtasche führen [16]. Den Prozess, Arzneimitteln und andere funktionelle Moleküle in einem Material zu verpacken, um sie von der Umgebung abzuschirmen, wird auch als Mikroverkapselung bezeichnet. Verfahren dazu sind in der pharmazeutischen Produktion und in anderen Bereichen wie der Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie von großem Interesse [29–31]. Betrachtet man die morphologischen Parameter von Mikrokapseln, so lassen sich diese in drei Kategorien einteilen (Abbildung 3). Unterschieden werden einkernige und mehrkernige Kapseln von Matrixkapseln.

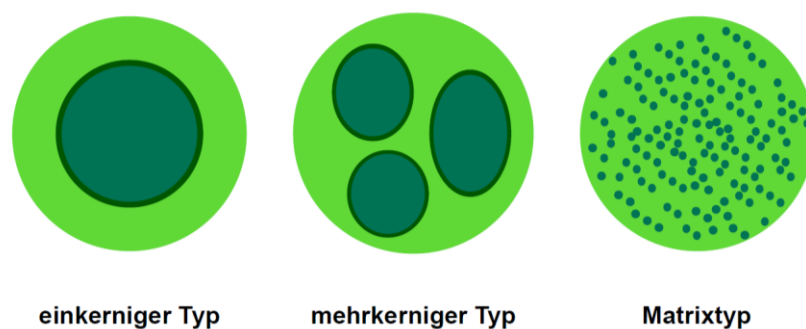


Abbildung 3: Typisierung von Mikrokapseln [32]

Während erstgenannte einen oder mehrere Hohlkammern mit Wirkstoffen innerhalb des Materials aufweisen, so ist der Wirkstoff bei Matrixkapseln gleichmäßig in einer Matrix verteilt [32]. Dieses strukturelle Merkmal resultiert in einer vergleichsweise kontinuierlichen und gleichmäßigen Freisetzung von Arzneimitteln. Um diese Eigenschaft gezielt zu nutzen, ist die Erzeugung von Mikropartikeln vom Matrixtyp ein zentrales Anliegen dieser Arbeit.

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser experimentellen Studie wird die Entwicklung eines alginatbasierten Drug Delivery Systems zur verzögerten Freisetzung („Controlled release“) von Atorvastatin für den klinischen Einsatz in der Parodontaltherapie untersucht. Zu diesem Zweck wird die von unserer Arbeitsgruppe zuvor beschriebene Präparationsmethode für ultraschallergezeugte arzneimittelbeladene Mikropartikel [33] unter Zuhilfenahme eines Ultraschallprozessors optimiert. Nach der Beladung der Partikel mit dem entzündungsmodulierenden Medikament Atorvastatin erfolgt die präklinische Testung der Wirkstofffreisetzung. Dafür wird die Freisetzung von Atorvastatin aus den Partikeln unter annähernd physiologischen Bedingungen in-vitro (37 °C im Wärmeschrank) unter Einfluss von künstlichem Speichel mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Ein herkömmliches Hydrogel auf der Basis von Methylcellulose (MC-Gel) dient als Referenzsystem für die Freisetzung von Atorvastatin. Um die Wirkstofffreisetzung kontrolliert auf mehrere Tage auszudehnen, werden Parameter im Herstellungsprotokoll, wie die Partikelgröße, Alginat- und Atorvastatinkonzentration variiert und der Einfluss auf das Freisetzungsprofil untersucht. In Folgeversuchen soll das Freisetzungsprofil von mit Divinylsulfon kovalent vernetzten Partikeln analysiert werden. Es soll festgestellt werden, ob durch die Verwendung eines zusätzlichen Vernetzungsmittels (Crosslinker) die Stabilität der Partikel erhöht und damit die Wirkstofffreisetzung verlängert werden kann. Ziel dieser Arbeit ist die Zubereitungstechnik für Mikropartikel zu optimieren und ein Freisetzungssystem für die subgingivale Anwendung von Statinen, insbesondere für Atorvastatin, zu entwickeln.

2. Material und Methoden

Im Kapitel 2.1 werden die verwendeten Reagenzien und deren Herstellung detailliert beschrieben und ihre Verwendung im Kontext dieser Arbeit begründet. Das anschließende Kapitel 2.2 dient der ausführlichen Darstellung der angewandten Methoden.

2.1 Materialien

2.1.1 Alginat

Aufgrund seiner vielseitigen Eigenschaften hat sich Alginat als Biomaterial in zahlreichen wissenschaftlichen und technischen Anwendungen bewährt [34]. Alginat sind natürliche Polysaccharidpolymere, die aus Bakterien oder braunem Seetang isoliert werden. Zur Gewinnung aus Seetang wird mithilfe einer alkalischen Lösung die Alginsäure extrahiert. Hinzugefügte Mineralsäuren wandeln anschließend die Säuren in ihre entsprechenden Salze um [26]. Alginat aus verschiedenen natürlichen Quellen unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihrer Zusammensetzung. Im Allgemeinen handelt es sich um lineare Copolymere mit Blöcken aus 1,4-verknüpften β -d-Mannuronat und α -l-Guluronat. Die Mengenanteile des Guluronat und Mannuronat können variieren, ebenso die Länge der Blöcke und die Reihenfolge der Guluronat- und Mannuronatreste. Fügt man einer wässrigen Alginatlösung zweiwertige Ionen (z.B. Ca^{2+}) hinzu, führt dies zu einer Gelstruktur. Die zweiwertigen Kationen binden sich vor allem ionisch an die Guluronatblöcke. Diese wiederum gehen Verbindungen mit den Guluronatblöcke benachbarter Polymerketten ein und ergeben die typische Vernetzung des Alginats in Form des sogenannten „Eierkartonmodells“ (Abbildung 4) [34].

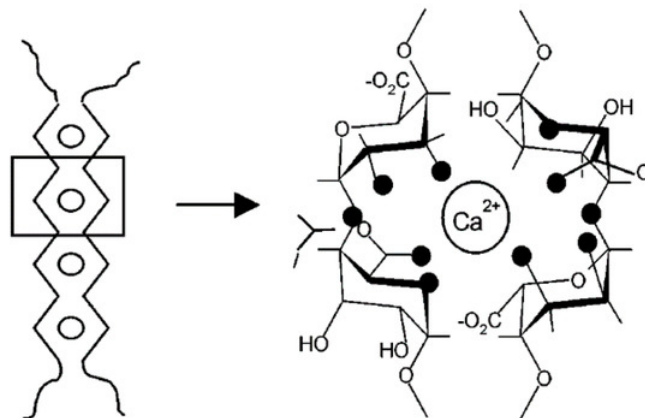


Abbildung 4: Eierkartonmodell des vernetzten Alginats [35]

2.1.2 Atorvastatin

Atorvastatin ist ein synthetisch hergestellter Lipidsenker aus der Wirkstoffgruppe der Statine (Abbildung 5). Als Hemmer der 3-hydroxy-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase greift es inhibitorisch in den Cholesterinstoffwechsel ein und bewirkt eine Reduktion der LDL-Konzentration im Blut [36]. Atorvastatin wird seit über 20 Jahren standardmäßig zur Behandlung der Hypercholesterinämie eingesetzt und dient nachweislich der Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Es handelt sich um ein gut verträgliches Medikament, welches für ein breites Spektrum von Patienten verschiedener Risikogruppen Verwendung findet und selten schwerwiegende Nebenwirkungen zeigt [37, 38].

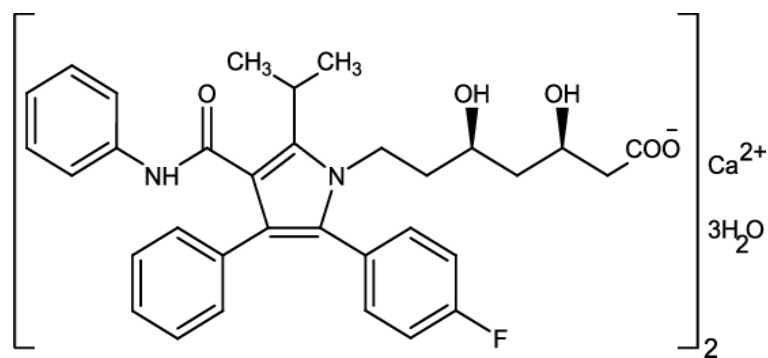


Abbildung 5: Strukturformel von Atorvastatin [39]

Neuere Studien zeigen, dass Atorvastatin auch einen entzündungshemmenden Effekt und außerdem noch eine positive Wirkung auf die Knochenneubildung hat [40]. Darüber hinaus konnten bei dem Präparat die Hemmung gewebsabbauender Enzyme und das Vorhandensein antimikrobieller Eigenschaften nachgewiesen werden. Da diese pleiotropen Wirkungen relevant für eine Beeinflussung der Pathogenese parodontaler Erkrankungen sind, stellt Atorvastatin vielfach einen Bestandteil klinischer Studien dar [41]. Aufgrund von Bedenken hinsichtlich der zunehmenden bakteriellen Resistenz bilden Statine eine vielversprechende Alternative zu Antibiotika [19].

2.1.3 Methylcellulosegel

In vergangenen klinischen Studien wurden Statine für die parodontale Anwendung vielfach in Hydrogele inkorporiert. Hierbei fungierte Methylcellulose wiederholt als Medikamententräger [19, 23]. Als Vergleich zur Freisetzung aus Alginatpartikeln wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Freisetzung von Atorvastatin aus Methylcellulosegel als Referenzträger untersucht. Methylcellulose ist einer der wichtigsten kommerziellen Ether der Cellulose. Für die synthetische Herstellung werden an der Anhydrokulose-Einheit der Cellulose Hydroxylgruppen durch Methylgruppen substituiert (Abbildung 6). In kaltem Wasser gelöst bildet Methylcellulose eine transparent kolloidale Lösung [42].

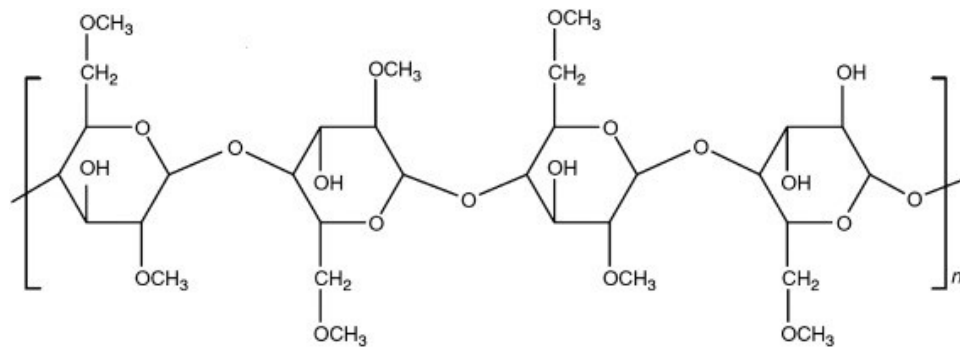


Abbildung 6: Strukturformel von Methylcellulose [43]

Für die Herstellung des Gels wurden 4 g Methylcellulose (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) unter ständigem Rühren bei 50°C auf einem Magnetrührer (Heidolph MR 3001, Schwabach, Deutschland) in 96 g Aqua dest. gelöst, bis eine homogene Masse entsteht. Um eine Konzentration von 1% Atorvastatin zu erreichen wurden 4,92 g vom Gel mit 59 mg Atorvastatin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) für 5 min in einem SpeedMixer® (DAC 150.1, Farmington Hills, USA) vermischt.

2.1.4 Kunstspeichel

Alginat enthält keine vom Menschen hydrolisierbaren Bindungen. Der Zersetzungsprozess *in vivo* wird durch den Austausch der vernetzenden zweiwertigen Kalziumionen durch monovalente Kationen, wie z.B. Natrium- oder Kaliumionen, erreicht [44]. Im Rahmen der Untersuchung erfolgt die Evaluierung der Wirkstofffreisetzung von Atorvastatin aus Alginatmikropartikeln unter dem Einfluss von künstlichem Speichel. In der Fachliteratur sind zahlreiche Formulierungen für dessen Zusammensetzung zu finden [45]. Für die vorliegende Arbeit wurde die Rezeptur vereinfacht, da wie oben beschrieben insbesondere das Vorliegen von monovalenten Elektrolyten (Na^+ , K^+) eine wesentliche Rolle für die Degradation der Partikel spielt (Tabelle 1). Der pH-Wert der Formulierung belief sich auf 7.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kunstspeichels

Reagenzien	Gewicht pro 100 g
Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0,12
Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0,085
Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)	0,25
Aqua dest.	99,545

2.1.5 Divinylsulfon

Wie bereits erwähnt, findet in Anwesenheit von monovalenten Ionen ein Prozess der Zersetzung von Alginat statt. Der Wunsch, diese biologische Reaktion zu beeinflussen und die physikalischen Eigenschaften des Alginats hinsichtlich der Stabilität zu verbessern, hat in der Forschung zu dem Interesse geführt, Alginathydrogele nicht nur ionisch, sondern auch kovalent zu vernetzen. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, dass es sich bei Vernetzungsreagenzien potenziell um toxische Substanzen handelt. Es ist somit essenziell, die Rückstände nach der Verwendung sorgfältig aus dem Gel zu entfernen. Beispiele für erfolgreiche Vernetzungsmoleküle sind Adipinsäuredihydrazid oder auch Methacrylat, das im Rahmen der Fotovernetzung mit einem Initiator unter Aktivierung eines Lasers Alginat kovalent quervernetzen kann [34].

Divinylsulfon (DVS) ist ein häufig verwendetes Kupplungsreagenz aus der Gruppe der Vinylsulfone (Abbildung 7). Da Vinylsulfone sich aufgrund ihrer elektronenarmen Doppelbindung leicht konjugieren lassen, werden sie häufig zur Quervernetzung von Peptiden genutzt. DVS ist aufgrund seiner Reaktivität, Stabilität, Wasserlöslichkeit und seines günstigen Preises ein beliebtes Vernetzungsreagenz unter den Bisvinylsulfonen und hat deshalb eine Vielzahl von Anwendungen in der Biokonjugation, der Proteomik und bei der Herstellung von Netzwerken auf Polysaccharidbasis [46–48]. Im medizinischen Bereich wird Divinylsulfon genutzt, um pharmazeutisch verwendete Hyaluronsäure-Mikropartikel zu vernetzen und deren Stabilität zu verbessern [49]. Auf Grundlage dieser beschriebenen Erfahrungen dient in dieser Arbeit erstmalig DVS für die kovalente Vernetzung von Alginat.

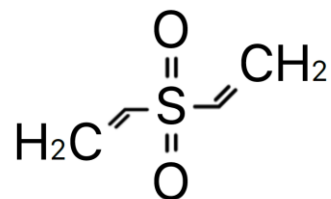


Abbildung 7: Strukturformel von Divinylsulfon [50]

2.2 Herstellung von Alginatpartikeln

2.2.1 Inkorporation von Atorvastatin in Alginat

Natriumalginat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) wurde in Aqua dest. gelöst, um Lösungen von 2 %, 3 %, 4 %, 5 % und 6 % (w/w) herzustellen. Diese wurden 24 h lang mit einem Magnetrührer (Heidolph MR 3001, Schwabach, Deutschland) bei 300 U/min gerührt. Kalzium-Atorvastatin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) wurde mit einer Präzisionswaage (Denver Instrument, Norfolk, England) abgewogen und zu den Alginatlösungen (5 ml) hinzugefügt, um Wirkstoffkonzentrationen von 1 %, 2 % und 4 % (w/w) zu erreichen. Das anfängliche Einrühren erfolgte mit einem Glasstab. Zur Gewährleistung der Homogenität wurde anschließend eine maschinelle Vermischung mithilfe eines SpeedMixers® (DAC 150.1, Farmington Hills, USA) bei 3500 U/min für die Dauer von 5 min vorgenommen (Abbildung 8).



Abbildung 8: Homogenes Gemisch aus Alginat und Atorvastatin nach 5 min im SpeedMixer®

2.2.2 Externe Gelation mittels Ultraschallscaler und -prozessor

Die Herstellung von Alginatpartikeln erfolgte gemäß der von Scholz et al. beschriebenen Methode [33]. In den ersten Versuchen wurde das Handstück eines dentalen Ultraschallscalers (EMS Mini Piezon, Domat/Ems, Schweiz), in späteren Versuchen dann ein Ultraschallprozessor (UP100H, Hielscher, Teltow, Deutschland) mit einer Sonotrode der Größe 3 an einem Stativ befestigt (Abbildung 9). In einem Abstand von 3 cm zur Gerätespitze wurde ein Becherglas mit 200 ml 3%-iger Kalziumchloridlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einem Magnetrührer platziert, wobei die Rührgeschwindigkeit auf 300 U/min eingestellt wurde. Der dentale Ultraschallscaler wurde auf maximale Leistung eingestellt. Beim Ultraschallprozessor wurde die Amplitude auf 60 % und der Zyklus

auf 100 %/s festgelegt, da mit dieser Einstellung in Vorversuchen die schnellste Zerstäubung des Alginats stattfand (0,05 ml in < 2 s). Das Alginat-Atorvastatin-Gemisch wurde mit einer Spritze (5 ml; 20G-Nadel; 0,9 x 40 mm) langsam und kontinuierlich auf das Arbeitsende des Gerätes aufgetragen. Nach dem Zerstäuben von 5 ml wurde dann eine milchige Trübung des Kalziumbades beobachtet, was auf eine erfolgreiche Dispersion der Mikropartikel in der Flüssigkeit hindeutet. Bei Alginatkonzentrationen von 5 % und 6 % (w/w) konnten aufgrund der hohen Viskosität, die das erforderliche Sprühen verhin- derte, keine Partikel hergestellt werden.

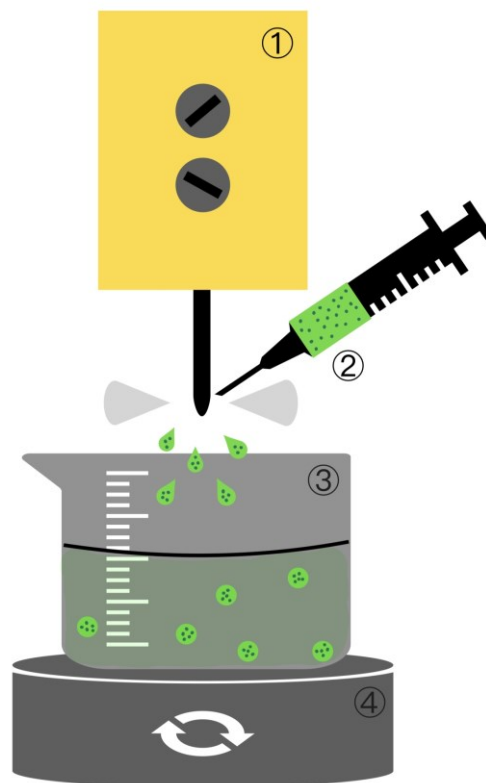


Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf für Herstellung von Alginatpartikeln; Versuchsanordnung bestehend aus einem Ultraschallscaler oder Ultraschallprozessor (1), einer Spritze mit einer 20-G-Kanüle (2), mit der das Alginat-Atorvastatin-Gemisch auf die Spitze der Sonotrode aufgetragen wurde; ein Becherglas mit einer 3%igen Kalziumchloridlösung (3), in dem Alginatpartikel gebildet und aufgefangen wurden; einem Magnetrührer (4), um eine Agglomeration der Partikel zu verhindern

2.2.3 Vergleich direkter und nachträglicher Wirkstoffbeladung

Im Rahmen der Untersuchung alternativer Verfahren der Wirkstoffbeladung sollte in einem Screening neben der direkten Inkorporation von Atorvastatin (s. Kapitel 2.2.1) auch eine nachträgliche Beladung der Partikel getestet werden. Zu diesem Zweck wurden für die im Vorfeld definierten Zeiträume von vier Stunden und vier Tagen jeweils eine Spatelspitze (10 mg) wirkstofffreier Partikel (1 % w/w Alginat, Herstellung mittels dentalem Ultraschallscaler) in 1 ml einer gesättigten Atorvastatinlösung (151 mg/ml) gelagert. Im Anschluss wurde der Überstand entnommen und die Partikel mit 1 ml Aqua dest. gewaschen. Nach kurzem Trocknen (10 s) auf Filterpapier wurde der in den Partikeln vorhandene Wirkstoff mittels 1 ml Methanol vollständig extrahiert. Zum Zweck des Vergleichs wurden Partikel mit vorheriger Inkorporation des Atorvastatins über den dentalen Ultraschallscaler hergestellt (1 % w/w Alginat, 1 % Atorvastatin). Eine Spatelspitze (10 mg) direkt beladener Partikel wurde ebenso mit Aqua dest. gewaschen und das vorhandene Atorvastatin mit 1 ml Methanol extrahiert. Bei allen Proben wurde neben der Quantifizierung des Atorvastatingehalts in Methanol auch die Atorvastatinmasse im Waschwasser der jeweiligen Probe mittels HPLC gemessen, um die Menge des oberflächlich an die Partikel gebundenen Arzneimittels zu ermitteln.

2.2.4 Größensortierung der Partikel

Die Mikropartikel aus dem Kalziumbad wurden gesammelt und mittels Sieben mit einer Maschenweiten von 10 µm (Innovatek, Stammham, Deutschland), 200 µm und 400 µm (Labstellar, Ulm, Deutschland) sortiert. Hierzu wurde ein 200-ml-Becherglas unter ein 400-µm-Sieb gestellt und das Kalziumchlorid-Partikel-Gemisch vorsichtig hindurch filtriert. Die Partikel (> 400 µm), welche sich auf dem Sieb befanden, wurden verworfen. Für die nächste Trennung wurde ein weiteres 200-ml-Becherglas unter ein 200-µm-Sieb gestellt und die Filtration wiederholt. Die Partikel (200–400 µm), die auf dem Filter zurückblieben, wurden sorgfältig mit 50 ml gereinigtem Wasser gewaschen und anschließend mit einem Heidemann-Spatel in Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Die verbliebene Mischung im Becherglas, die Partikel < 200 µm enthielt, wurde durch ein 10-µm-Sieb gegeben. Nach denselben Waschschritten wurden die gesammelten Partikel in Falcon-Röhrchen überführt. Im Rahmen dieses Prozesses wurden zwei Fraktionen mit unterschiedlichen Größenordnungen gewonnen: Partikel mit einem Durchmesser von 10–200 µm und Partikel mit einem Durchmesser 200–400 µm. Alle Partikel wurden im Kühlschrank bei einer Temperatur von 5 °C in 10 ml Aqua dest. gelagert, bis sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden. Die Morphologie der Partikel wurde mithilfe eines Lichtmikroskops (Scope.A1, AxioCam ICc 1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

untersucht, wobei runde oder tropfenförmige Partikel sichtbar wurden (Abbildung 10 und Abbildung 11).

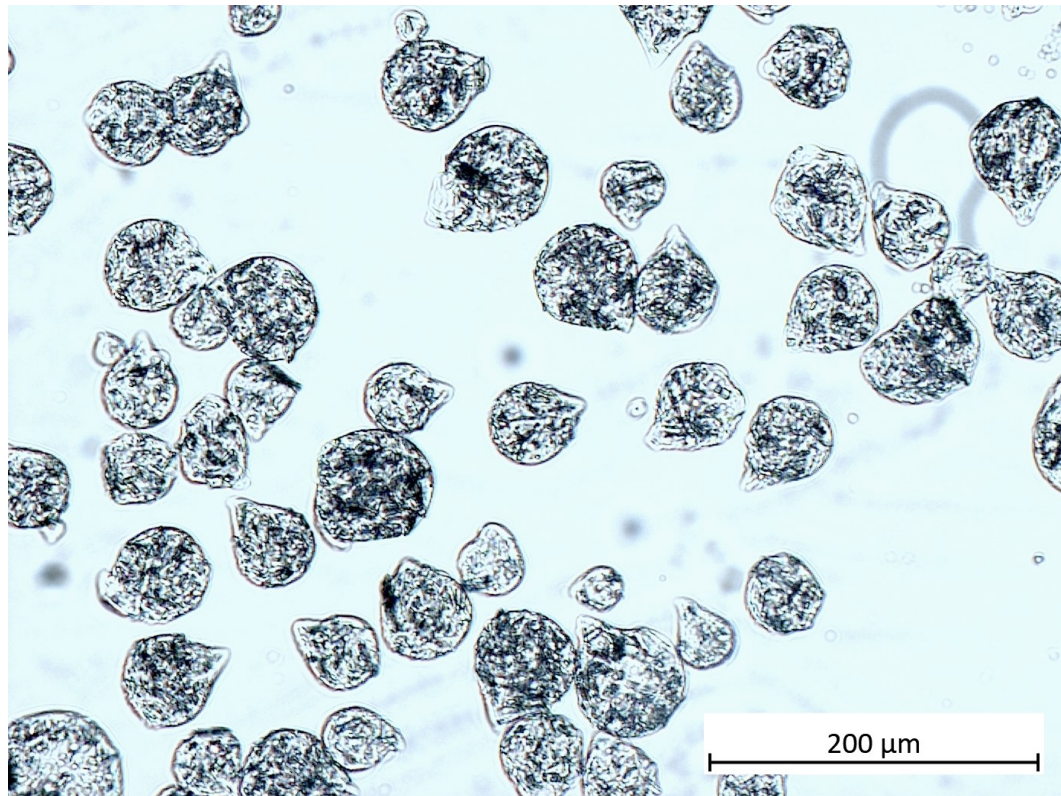


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit Atorvastatin beladenen Alginatpartikeln; Partikel mit Durchmessern von 10–200 µm, durch einen Ultraschallprozessor erzeugt (10-fach vergrößert)

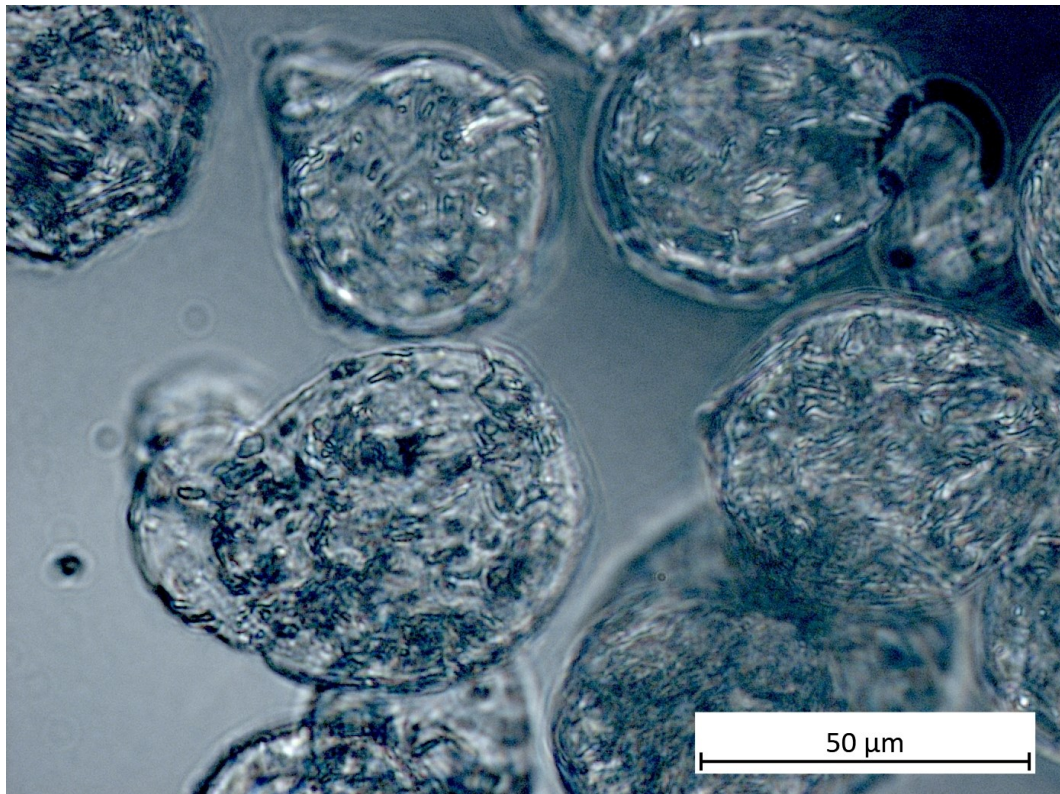


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit Atorvastatin beladenen Alginatpartikeln; Partikel mit Durchmessern zwischen 10–200 µm durch einen Ultraschallprozessor erzeugt (40-fach vergrößert)

2.3 Verschiedene Partikelformulierungen

2.3.1 Variation der Alginatkonzentration

Um den Einfluss der Konzentration der Alginatlösung auf die spätere Wirkstofffreisetzung zu ermitteln, wurden Ansätze von Alginat von 1%, 2%, 3%, 4%, 5% und 6% (w/w) hergestellt. Die rheologischen Eigenschaften der Alginatlösungen mit 5% und 6% (w/w) Alginat ließen keine Partikelproduktion mit dem Ultraschallscaler oder -prozessor zu. Zu beobachten war ein einzelner Tropfen am Arbeitsende der Geräte, der sich nicht versprühen ließ.

2.3.2 Variation der Partikelgröße

Um den Einfluss der Partikelgröße auf die Freisetzung des Wirkstoffes zu untersuchen, wurden Mikropartikel mithilfe von Sieben nach unterschiedlichen Durchmessergrößen gefiltert und der Freisetzungsstudie unterzogen. Partikel im Größenbereich 10–200 µm und 200–400 µm wurden wie oben beschrieben unterschieden.

2.3.3 Variation der Atorvastatinkonzentration

Alginatpartikel mit 1%, 2% und 4% (w/w) Atorvastatin wurden hergestellt und in die Freisetzungsstudie integriert.

2.3.4 Chemische Quervernetzung mit Divinylsulfon

Die erfolgreiche Quervernetzung des Polymers Hyaluronsäure mit Divinylsulfon wurde von Shimojo, Pires et. Al beschrieben [51]. Die Bildung reaktiver Radikale im Divinylsulfon wird durch ein alkalisches Medium, wie beispielsweise Natriumhydroxid, induziert. In Anlehnung an dieses Protokoll wurden für die Herstellung quervernetzter Alginatpartikel 10 ml Alginat mit 2,5 ml Divinylsulfon unter langsamer Zugabe von 12,5 ml NaOH gemischt und für 4 h bei 25°C im Wärmeschrank gelagert. Das fertige Präparat wurde für die Erzeugung von Partikeln für das oben beschriebene Ultraschallverfahren genutzt.

Alle Formulierungen sind in tabellarischer Form im Ergebnisteil dieser Arbeit (Kapitel 3.2) aufgelistet.

2.4 Freisetzungsuntersuchung

2.4.1 Aufbau der Freisetzungsstudie

Es wurde ein einheitliches Protokoll entwickelt, um die Wirkstofffreisetzung von Atorvastatin aus den hergestellten Medikamententrägern standardisiert zu untersuchen. Vor Beginn der Freisetzungsstudie wurden die hergestellten Partikel für 10 s auf Filterpapier (90 mm Durchmesser, Whatman, United Kingdom) getrocknet und mit einem Löffelspatel in ein Eppendorf Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend wurde die Masse jeder Probe mithilfe einer Präzisionswaage erfasst. Der im Vorfeld zubereitete Kunstspeichel (600 µl) wurde mittels Mikropipette in das Mikroreaktionsgefäß gegeben. Um größere Verklumpungen zu vermeiden und damit eine Vergleichbarkeit der Proben herzustellen, wurden die Partikel für 5 s auf einem Vortexer (VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland) gleichmäßig aufgeschüttelt und anschließend für festgelegte Zeiträume (0.25, 0.75, 1.5, 3, 6, 10, 17, 33, 57, 81, 105, 129, 153 and 177 h) bei 37°C im Wärmeschrank aufbewahrt.

Nach Ablauf des jeweiligen Zeitintervalls im Wärmeschrank wurde jede Probe für 3 Minuten zentrifugiert (Fresco™ 17, Thermo Fisher, Darmstadt, Germany), um ein Absetzen der Partikel auf dem Boden des Gefäßes zu erreichen. Vom Überstand wurden daraufhin 100 µl des künstlichen Speichels in ein HPLC-Vial überführt. Die restlichen 500 µl des abpipettierten Kunstspeichels wurden verworfen und dafür neue 600 µl Kunstspeichel für das nächste Zeitintervall auf die Probe gegeben, um die Freisetzung mit frischem Elutionsmittel weiterzuführen. Da zum Beginn der Freisetzung eine Quellung der Partikel verbunden mit Wirkstoffaustritt zu erwarten war, wurden die ersten acht Messzeitpunkte enger getaktet und sukzessiv vergrößert. Das letzte Zeitintervall von 24 h wurde wiederholt bis nur noch Spuren von Atorvastatin per HPLC im Kunstspeichel nachzuweisen waren. Abschließend wurde eine Restextraktion durchgeführt, um den Wirkstoff aus den letzten erhaltenen Partikeln freizusetzen. Hierfür wurden 1 ml Methanol auf die letzten Partikel gegeben, diese bei für 4 h bei 37°C im Wärmeschrank gelagert und die Wirkstoffkonzentration per HPLC erfasst.

2.4.2 Bestimmung der Wirkstoffkonzentration mit HPLC

Nach Ablauf des jeweiligen Zeitintervall wurden 100 µl künstlicher Speichel aus der Probe mit 900 µl Methanol (99,9 %, Rotisolv, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration des Atorvastatins im entnommenen Kunstspeichel erfolgte unter Anwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC).

Die Wirkstofffreisetzung wurde als kumulative Freisetzung (in %) über die Zeit (in h) angegeben. 100 % entsprach hierbei der Masse des insgesamt in der Probe enthaltenen Atorvastatins, die nach der oben beschriebenen Restextraktion ermittelt werden konnte.

Die technischen Eigenschaften und Analysebedingungen der HPLC werden in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Analysebedingungen der HPLC (Firma Knauer Berlin Smartline Pump 1000)

Säule	Knauer Eurospher-100 C18 5µm 250 × 4 mm
Mobile Phase	Methanol/ Phosphatpuffer pH4,0 70/30 (v/v)
Säulentemperatur	62°C
Flussrate	1 ml/min
Detektion	UV 248 nm
Injiziertes Probenvolumen	20 µl
Retentionszeit	2,0 min
Kalibrationsstandards	0,1; 1; 5; 10; 20; 50 Atorvastatin in Methanol gelöst, Verdünnungsreihe mit Methanol/ Wasser 80/20 (v/v) angesetzt
Kalibrierter Messbereich	0,1–50 µg/ml

2.5 Ermittlung der Freisetzungseigenschaften

2.5.1 Bewertung der Trägerstabilität

Um die Stabilität der Wirkstoffträger zu bestimmen, wurde die Auflösungszeit (dissolution time = DT) als Wert eingeführt. Sie gibt das Zeitintervall an, in dem der Wirkstoffträger makroskopisch nicht mehr von künstlichem Speichel unterschieden werden kann.

2.5.2 Mathematische Modellierung der Wirkstofffreisetzung

„Drug Release“ (Wirkstofffreisetzung) beschreibt die Migration von Arzneimittel-molekülen vom ursprünglichen Ort im Trägersystem zur äußeren Oberfläche und in das umgebende Medium [52]. Um diesen Prozess zu beschreiben, werden in der Biopharmazie und Pharmakokinetik mathematische Modelle als ein wesentliches Instrument eingesetzt. Ihre Anwendung erlaubt einen fundierten Vergleich der In-vitro-Freisetzungsprofile unterschiedlicher Träger und ermöglicht das Erlangen von Erkenntnissen bezüglich der zugrundeliegenden Transportmechanismen. Auf Basis dieser Modelle lassen sich Formulierungen weiterentwickeln und letztendlich verbessern [52]. Zu den in der wissenschaftlichen Literatur häufig beschriebenen Drug-Release-Modellen gehören die Modelle erster und nullter Ordnung, sowie die Modelle nach Korsmeyer-Peppas [53], Higuchi [54], Hixson-Crowell [55] oder Weibull [56]. Hinsichtlich der Freisetzung aus Polymeren hat sich insbesondere das Korsmeyer-Peppas-Modell etabliert. Auch als „Potenzgesetz“ bezeichnet, zeigt es eine einfache exponentielle Beziehung zwischen der Menge des freigesetzten Medikaments und der Dauer der Freisetzung:

$$M_t/M = k t^n,$$

wobei M_t/M den Anteil des freigesetzten Arzneimittels zum Zeitpunkt t , k die kinetische Konstante und n den Freisetzungsexponenten repräsentiert.

Die logarithmische Form der Gleichung wurde für die lineare Regressionsanalyse verwendet.

$$\log (M_t/M) = n \log t + \log k$$

Der Diffusionssexponent n wurde als die Steigung der logarithmischen Kurve der anfänglichen 60% Prozent der Freisetzungsphase bestimmt. Die ermittelten Werte sind im Ergebnisteil Kapitel 3.2 dieser Arbeit zusammengefasst.

k ist eine Konstante, in die strukturelle und geometrische Informationen über das Abgabesystem und das Arzneimittel einfließen. In der Literatur wird sie mitunter auch als Transportkonstante bezeichnet. Der Diffusionsexponent n (auch Freisetzungs- oder Transportexponent genannt) ist ein Maß für die möglichen Mechanismen (Tabelle 3), die an der Freisetzung von Arzneimitteln beteiligt sind [53].

Tabelle 3: Von Diffusionsexponent n abgeleitete Mechanismen des Stofftransportes aus Medikamententrägern

Diffusionsexponent n	Transportmechanismus
$n \leq 0,45$	Ficksche Diffusion (Case-I-Transport)
$0,45 < n < 0,89$	Nicht-Ficksche Diffusion
$n = 0,89$	Case-II-Transport
$n > 0,89$	Super-Case-II-Transport

Liegen die Voraussetzungen für einen Stofftransport gemäß Fickscher Gesetze vor, so wird dies als Case-I-Transport bezeichnet. Bei Polymeren kann es hingegen auch zu einem nicht-Fickschen Verhalten kommen. Dieser „anomale Stofftransport“ kann auf die Relaxation des Polymers zurückgeführt werden, die stattfindet, wenn das lösliche Medium, in dieser Studie künstlicher Speichel, in das molekulare Netzwerk aufgenommen wird. Makroskopisch ist diese Umstrukturierung als Quellung sichtbar [57]. In Drug Delivery Systemen mit Fickscher Diffusion erfolgt die Relaxation so schnell, dass sie als sofortig angesehen werden kann. Bei Polymeren wie Alginat, ist die Relaxation jedoch häufig langsamer und kann daher den Diffusionsprozess hemmen. Der Grenzfall, in dem die Relaxationsraten langsamer sind als die Lösungsmittelmobilität und folglich die Diffusionskinetik bestimmen, wird als Case-II-Transport bezeichnet. Der Super-Case-II-Transport tritt in Erscheinung, wenn die Freisetzungsrates primär durch die Relaxation der Polymermatrix gesteuert wird [57, 58].

2.5.3 Statistische Untersuchungen

Die für die Freisetzung von 50 % und 99,5 % des Wirkstoffs erforderliche Zeit ($t_{50\%}$ und $t_{99,5\%}$) wurde arithmetisch ermittelt. Statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung des Softwareprogramms SPSS (IBM Version 29.0.1.1.) durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Für die Vergleiche der $t_{50\%}$ und $t_{99,5\%}$ -Werte wurden nichtparametrische Varianzanalysen durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test wurde als Vortest für Gruppenvergleiche mit $n > 2$ verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für paarweise Vergleiche unabhängiger Gruppen verwendet. P-Werte $< 0,05$ (Bonferroni korrigiert für multiples Testen) wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Screening: Vergleich direkter und nachträglicher Beladung

Unabhängig von der Beladungsmethode konnte in allen Proben ein Nachweis für Atorvastatin erbracht werden (Abbildung 12). Direkt beladene Partikel wiesen eine Gesamtmenge von 82,87 µg Atorvastatin auf. Da im verwendeten Waschwasser nur eine marginale Menge Atorvastatin nachgewiesen werden konnte (0,129 µg), ist davon auszugehen, dass das Atorvastatin fest in die Matrix der Partikel eingebettet ist.

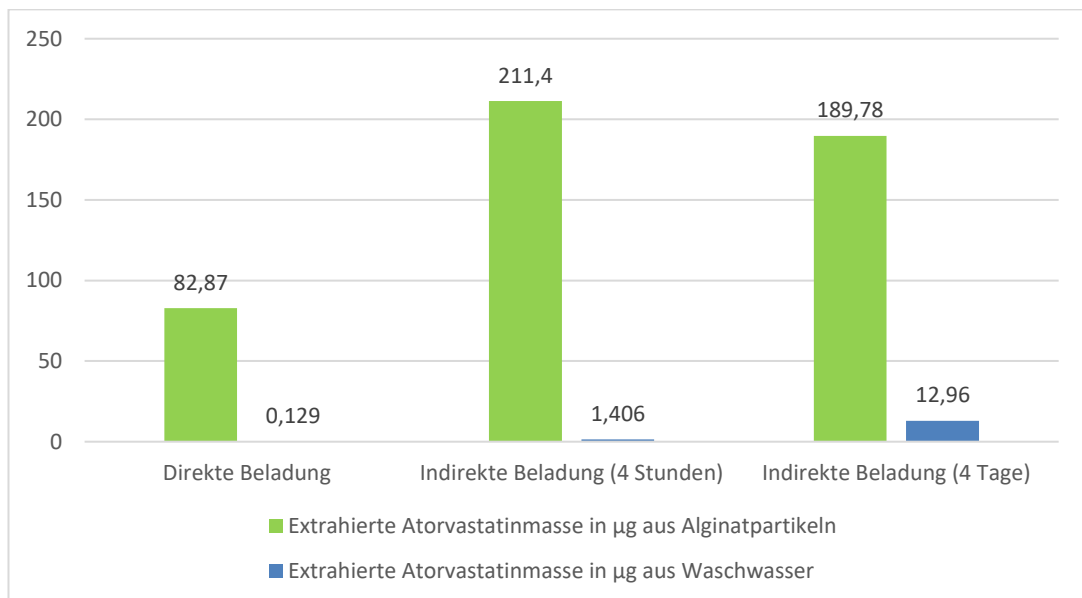


Abbildung 12: Vergleich der aus 10 mg Alginatepartikeln mit Methanol extrahierten absoluten Atorvastatinmasse in µg nach direkter und nachträglicher Wirkstoffbeladung für 4 Stunden/ 4 Tage und der absolut in 1 ml Waschwasser enthaltene Atorvastatinmasse in µg; Messung mit HPLC; n=1

Bei den Partikelproben der indirekten Beladungsmethode zeigte sich, dass eine längere Verweildauer der Partikel in der gesättigten Atorvastatinlösung zu einer geringfügigen Abnahme des Wirkstoffgehalts führt, was durch eine Rückdiffusion des Wirkstoffes in die Lösung oder eine beginnende Degradation der Partikel zu erklären sein könnte. Partikel, die vier Stunden in der gesättigten Atorvastatinlösung lagen, wiesen nach Extraktion mit 1 ml Methanol eine Atorvastatinmasse von 189,8 µg auf. Die Partikel, die nur vier Stunden in der Lösung verblieben, wiesen mit 211,4 µg/ml 10,3% mehr Atorvastatin auf. Es ist davon auszugehen, dass ein

Teil des Wirkstoffs oberflächlich an den Partikeln haftete. Dies wird durch die erhöhte Menge an Atorvastatin im Waschwasser der Partikel (1,406 bzw. 12,96 µg) deutlich, die im Vergleich zum Waschwasser der direkt beladenen Partikel deutlich erhöht ist.

Die erwünschte Wirkungsweise eines Controlled Release Systems zielt auf eine kontrollierte und graduelle Freisetzung des Arzneistoffes ab. Gemäß theoretischen Überlegungen ist eine solche Freisetzung nur möglich, wenn der Wirkstoff stabil in der Matrix des Hilfsstoffes eingebettet ist. Basierend darauf wurden für weitere Untersuchungen ausschließlich direkt beladene Alginatpartikel als geeignet erachtet und im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

3.2 Konzipierte Formulierungen

Die im Zuge dieser Arbeit konzipierten Formulierungen für ein Controlled Release System werden in Tabelle 4 charakterisiert.

Tabelle 4: Formulierungen für ein Controlled Release System, das auf Methylcellulosegel (MC) oder Alginat basiert, mittels eines dentalen Ultraschallscalars (DS) oder eines Ultraschallprozessors (UP) und mit oder ohne einen zusätzlichen Vernetzer (Crosslinker) mit Divinylsulfon (DVS) hergestellt wurde

Formu- lierung Nr.	Methode	Alginat- gehalt [%]	Atorvasta- tingehalt [%]	Partikelgröße [µm]	Cross- linker
1	MC	-	1	–	–
2	DS	2	1	10–200	–
3	DS	2	1	200–400	–
4	UP	2	1	10–200	–
5	UP	3	1	10–200	–
6	UP	4	1	10–200	–
7	UP	2	1	200–400	–
8	UP	3	1	200–400	–
9	UP	4	1	200–400	–
10	UP	2	2	200–400	–
11	UP	2	2	200–400	DVS
12	UP	2	4	200–400	–

3.3 Freisetzungseigenschaften

Tabelle 5 zeigt die ermittelten Freisetzungseigenschaften aller Formulierungen. In den nachfolgenden Kapiteln werden die detaillierten Freisetzungsprofile sämtlicher Formulierungen präsentiert und gegenübergestellt.

Tabelle 5: Freisetzungseigenschaften verschiedener Formulierungen; Unterscheidung von Fickscher Diffusion ($n \leq 0,45$), Nicht-Fickscher Diffusion ($0,45 < n < 0,89$), Case-II-Transport ($n = 0,89$) und Super-Case-II-Transport ($n > 0,89$); $t_{50\%}$ / $t_{99,5\%}$ als rechnerisch ermittelte Zeit für die Freisetzung von 50 % und 99,5 % des Wirkstoffs; der statistischer Vergleich von $t_{50\%}$ und $t_{99,5\%}$ erfolgte innerhalb von Gruppen, gekennzeichnet durch Farbmarkierung (gelb, grün, rot)

Formu- lierung Nr.	Freisetzungs- exponent n	$t_{50\%} \pm \text{SD [h]}$	$t_{99,5\%} \pm \text{SD [h]}$	DT [h]
1	1,09	$1,78 \pm 0,18$	12,5	17
2	0,21	0,45 [†]	169 [†]	> 177
3	1,57	$3,08 \pm 0,39$	$26,44 \pm 6,66$	> 177
4	0,55	$4,15 \pm 0,98^{*\dagger}$	$71,35 \pm 19,86^{\dagger}$	> 177
5	1,23	$2,24 \pm 0,42$	$30,82 \pm 10,88$	> 177
6	1,06	$1,91 \pm 0,21$	$19,09 \pm 8,38$	> 177
7	0,37	$1,00 \pm 0,27$	$17,54 \pm 8,09$	> 177
8	1,46	$2,58 \pm 0,90^*$	$24,10 \pm 8,62$	> 177
9	1,52	$1,94 \pm 0,68$	$12,65 \pm 5,11$	> 177
10	0,91	$4,97 \pm 1,32$	$91,26 \pm 11,19$	> 177
11	1,08	$7,52 \pm 3,08^*$	$95,84 \pm 16,07$	> 177
12	0,90	$10,83 \pm 1,07$	$123,35 \pm 3,55$	> 177

* Statistisch signifikant verlängerte Wirkstofffreisetzung in der farblich markierten Gruppe ($p < 0,05$)

† Erhöhte Agglomeration der Partikel

3.4 Freisetzungsprofil aus Methylcellulosegel und Ultraschallscaler erzeugten Partikeln

Zunächst wurde die Freisetzungskinetik von Atorvastatin aus einem konventionellen Methylcellulosegel (MC-Gel, Formulierung Nr.1) mit der Freisetzungskinetik aus Alginatpartikeln verglichen, die mit einem dentalen Ultraschallscaler hergestellt wurden. Das MC-Gel, das 1 % Atorvastatin enthielt, setzte 50 % des Wirkstoffs ($t_{50\%}$) nach $1,78 \pm 0,18$ h Inkubation in künstlichem Speichel frei und erreichte nach 12,5 h sein Maximum von 99,5 % ($t_{99,5\%}$) (Tabelle 5; Abbildung 13). Die vollständige Auflösung des MC-Gels wurde nach 17 h Inkubation beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Stabilität des Gels auf weniger als einen Tag begrenzt war.

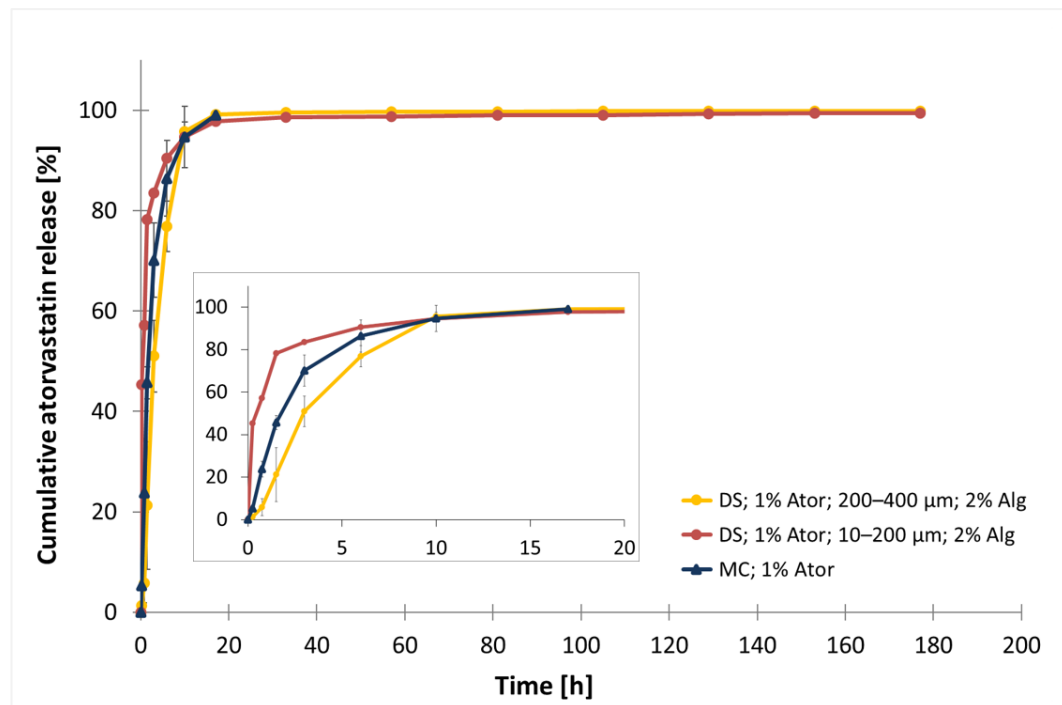


Abbildung 13: Normierte kumulative Atorvastatinfreisetzung aus Methylcellulosegel (MC) in Kunstspeichel bei 37°C mit Atorvastatinkonzentration (Ator) 1 % (n=3) und aus Alginatpartikeln, hergestellt mittels dentalem Ultraschallscaler (DS), Alginatkonzentration 2 % (Alg), Atorvastatinkonzentration 1 % im Größenbereich 10–200 µm (n=3) und Größenbereich 200–400 µm (n=1); alle Mittelwert $\pm$ SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm

Im Gegensatz dazu zeigten die Formulierungen der Alginatpartikel mit 1 % Atorvastatin und 2 % Alginatkonzentration je nach Partikelgröße andere Freisetzungsprofile (Abbildung 13). Kleinere Partikel (10–200 µm; Formulierung Nr. 2) gaben die Hälfte des eingeschlossenen Wirkstoffs viermal schneller (0,45 h) frei als das MC-Gel. Andererseits zeigten größere Partikel (200–400 µm, Formulierung Nr. 3) im Vergleich zum MC-Gel eine 2-mal langsamere Freisetzung mit einer $t_{50\%}$ von $3,08 \pm 0,39$ h. Die vollständige Wirkstofffreisetzung ($t_{99,5\%}$) wurde bei den kleineren Partikeln nach 169 h und bei den größeren Partikeln nach $26,44 \pm 6,66$ h erreicht. Allerdings wurde während der Freisetzungsstudie eine deutliche Agglomeration der kleineren Partikel beobachtet, was ihre Leistung potenziell beeinflusst haben könnte.

Beachtenswert ist, dass Alginatpartikel ihre strukturelle Stabilität über 177 h beibehielten, was eine Haltbarkeit von mindestens 7 Tagen gewährleistet.

3.5 Einfluss der Alginatkonzentration und der Partikelgröße auf das Freisetzungsprofil

Im Rahmen der zeitoptimierten Partikelherstellung wurde ein Ultraschallprozessor (UP) eingesetzt. Um die Atorvastatinfreisetzung über einen Zeitraum von 180 h (7,5 Tage) zu analysieren, wurden mehrere Partikelformulierungen mit unterschiedlichen Alginatkonzentrationen (2 %, 3 % oder 4 %) untersucht (Abbildung 14 und Abbildung 15).

In der Gruppe der kleineren Partikel war bei Partikeln mit 4 % Alginat (Formulierung Nr. 6) der $t_{50\%}$ -Wert nach $1,91 \pm 0,21$ h Inkubation erreicht. Bei einem Alginatgehalt von 3 % (Formulierung Nr. 5) erhöhte sich der $t_{50\%}$ -Wert leicht auf $2,24 \pm 0,42$ h. Partikel mit der niedrigsten Alginatkonzentration (2 %, Formulierung Nr. 4) wiesen eine statistisch signifikant verlängerte Wirkstofffreisetzung auf und erreichten den $t_{50\%}$ -Wert nach $4,15 \pm 0,98$ h, was doppelt so lang war wie bei Partikeln mit 4 % Alginat ($p = 0,008$). Es ist bemerkenswert, dass die mit UP hergestellten kleinen Partikel eine fast viermal so lange $t_{50\%}$ erreichten wie die mit DS unter ähnlichen Bedingungen (1 % Atorvastatin, 2 % Alginat, Formulierung Nr. 2) hergestellten Partikel und doppelt so lange wie das MC-Gel. Die umgekehrte Beziehung zwischen Alginatgehalt und Freisetzungskinetik spiegelte sich auch im $t_{99,5\%}$ -Wert wider. Das kürzeste $t_{99,5\%}$ -Intervall wurde für die 4%ige Alginatgruppe ($19,09 \pm 8,38$ h; Formulierung Nr. 6) gemessen, gefolgt von der 3%igen Alginatgruppe ($30,82 \pm 10,88$ h, Formulierung Nr. 5). Die 2%ige Alginatgruppe wies das längste Freisetzungsintervall auf ($71,35 \pm 19,86$ h; Formulierung Nr. 4), obwohl hier erneut eine merkliche Agglomeration der Partikel die Freisetzungskinetik potenziell beeinflusst haben könnte.

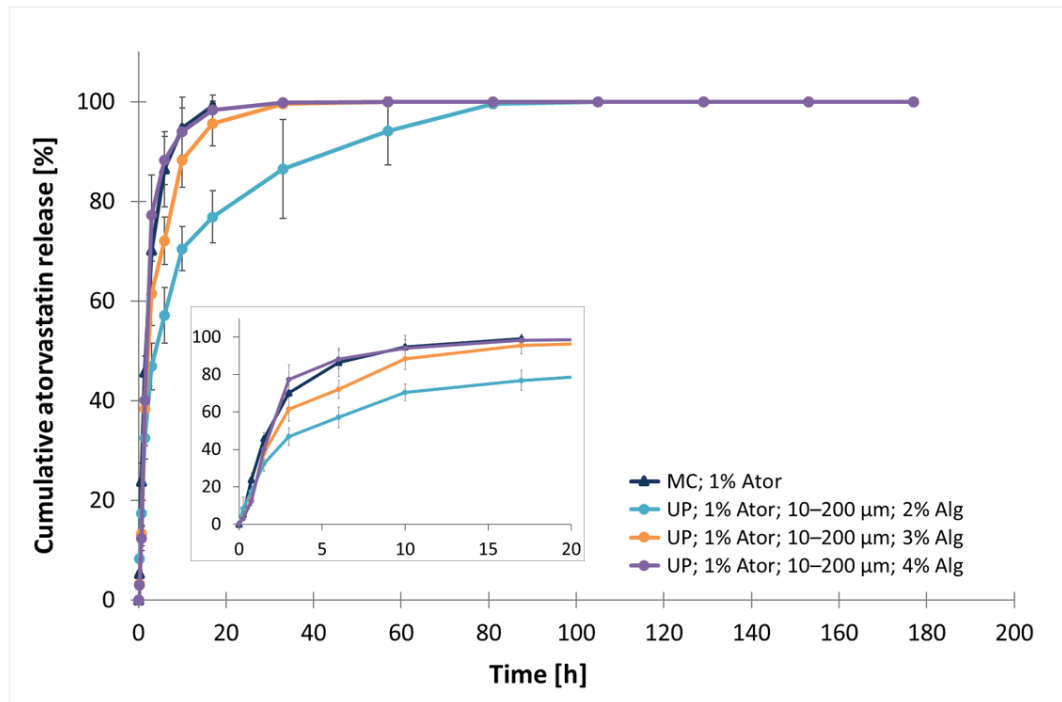


Abbildung 14: Auswirkung der Alginatkonzentration auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 %, 3 % oder 4 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (UP) hergestellt wurden; Größenbereich 10–200 µm (n=5), alle Mittelwert $\pm$ SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm

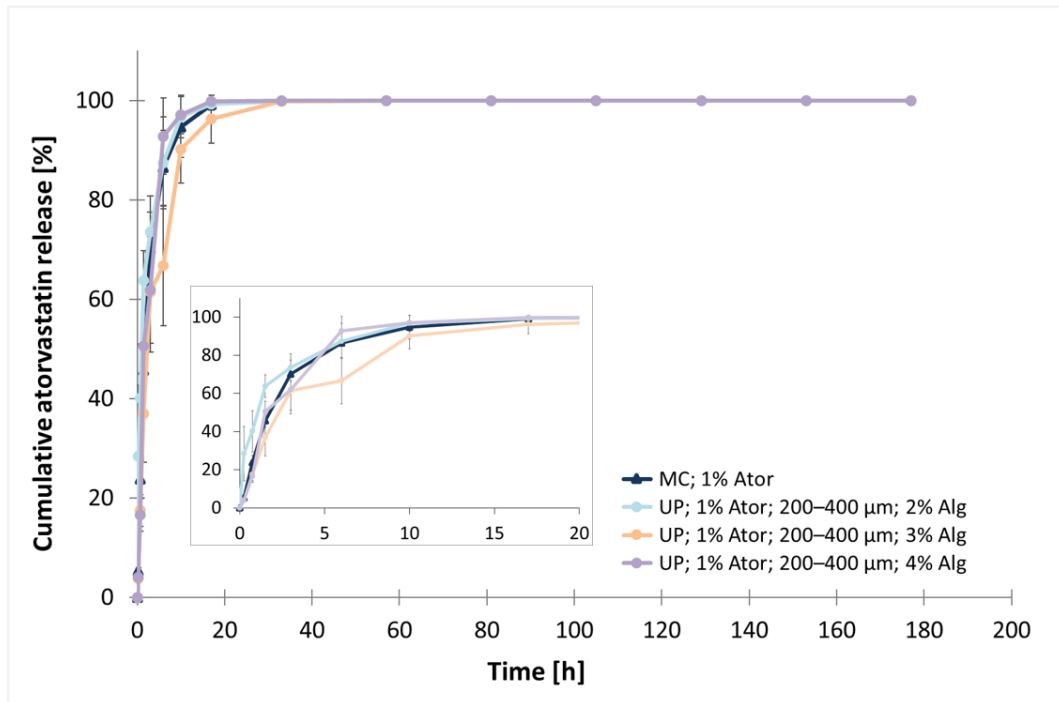


Abbildung 15: Auswirkung der Polymerkonzentration auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 %, 3 % oder 4 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (UP) hergestellt wurden; Größenbereich 200–400 µm (n=5), alle Mittelwert $\pm$ SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm

Die Gruppe der größeren Partikel (200–400 µm) zeigte ein vergleichbares Freisetzungsprofil bei Verwendung eines höheren Alginategehalts (Abbildung 15). Partikel mit 3 % Alginat (Formulierung Nr. 8) wiesen eine $t_{50\%}$ von $2,58 \pm 0,90$ h auf, was statistisch signifikant länger war als bei einem Gehalt von 2 % ($1,00 \pm 0,27$ h, $p = 0,008$). Eine Erhöhung der Konzentration auf 4 % (Formulierung Nr. 9) führte zu keiner statistisch signifikanten Verlängerung der $t_{50\%}$ ($1,94 \pm 0,68$ h). Die 2%ige Gruppe (Formulierung Nr. 7) setzte den Wirkstoff viermal schneller frei als die entsprechende kleinere Gruppe und drei Stunden schneller als ähnliche Partikel, mit einem dentalen Ultraschallscaler hergestellt wurden. Bei einem Intervall von $t_{99,5\%}$ erreichte nur die 3 %-Formulierung (Formulierung Nr. 8) eine verzögerte Freisetzung des verkapselten Atorvastatins von $24,10 \pm 8,62$ h, die die Leistung des MC-Gels übertraf.

Aus makroskopischer Perspektive konnte eine Strukturstabilität der Partikel über einen Zeitraum von mindestens 177 Stunden nachgewiesen werden.

3.6 Einfluss der Atorvastatinkonzentration auf das Freisetzungsprofil

Um den Einfluss der Beladungskapazität der Alginatpartikel in Bezug auf das Freisetzungsprofil zu bewerten, wurde die Konzentration von Atorvastatin auf 2 % und 4 % erhöht. Um mögliche Auswirkungen der Agglomeration zu vermeiden, wurden ausschließlich Partikel im Bereich von 200–400 µm analysiert. Die Verwendung von 2 % Natriumalginat wurde bevorzugt, um mehr freies Volumen im Polymer für die Inkorporation des Wirkstoffs zu schaffen. Beladene Partikel im Größenbereich von 200–400 µm mit 2 % Natriumalginat (Formulierung Nr. 10) wurden unserer Analyse unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Verdopplung des Atorvastatingehalts auf 2 % den $t_{50\%}$ -Wert auf $4,97 \pm 1,32$ h verlängerte (Abbildung 16). Dies entspricht einer fünffachen Verlängerung im Vergleich zur 1 %igen Wirkstoffbeladung.

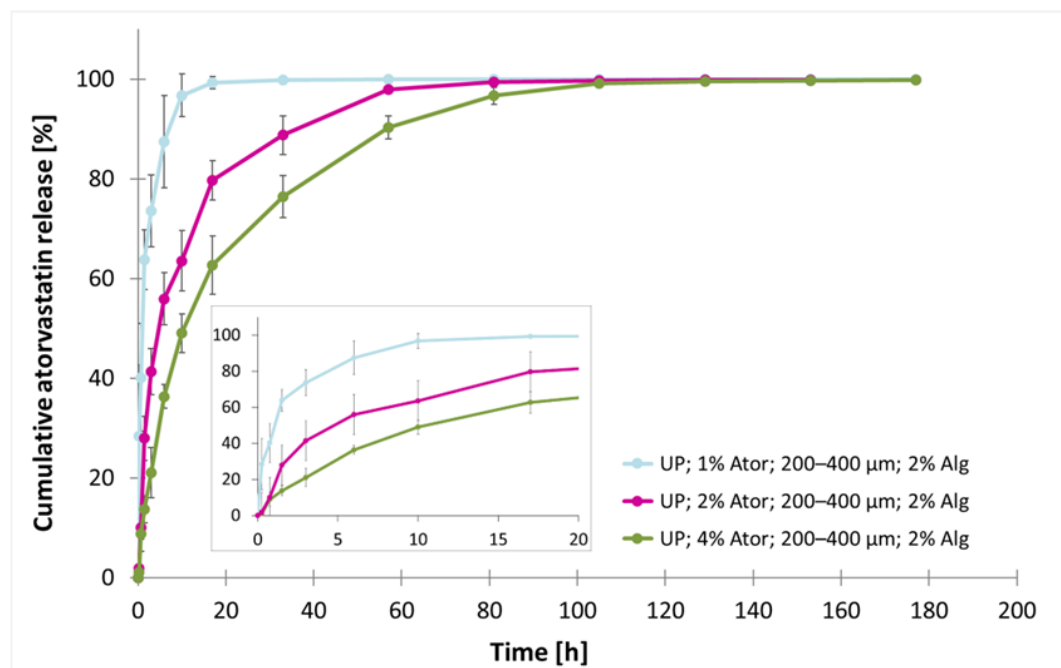


Abbildung 16: Auswirkung der Wirkstoffbeladung auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (US) hergestellt wurden; Größenbereich 200–400 µm (n=5), alle Mittelwert $\pm$ SD, Atorvastatingehalt (Ator) von 1 % (n=5), 2 % (n=15) oder 4 % (n=3); vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm

Eine weitere Verdoppelung des Atorvastatingehalts auf 4 % Atorvastatin (Formulierung Nr. 12) resultierte in einer Verlängerung des $t_{50\%}$ -Wertes auf $10,83 \pm 1,07$ h. Die Zeit bis zum Nachweis von 99,5 % des freigesetzten Wirkstoffs wurde für die 2 %ige und 4 %ige Atorvastatin Formulierung mit 91,26 Stunden (3,8 Tage) bzw. 123,35 Stunden (5,1 Tage) ermittelt. Es wurde bei Partikeln mit 4% Wirkstoffbeladung eine mindestens 7-fache Verlängerung der Freisetzung beobachtet.

3.7 Einfluss von Divinylsulfon auf das Freisetzungsprofil

In der Formulierung Nr. 11 wurde Divinylsulfon als kovalenter Vernetzer zugesetzt, um die Partikelstabilität zu erhöhen. Für dieses Experiment wurde die Atorvastatinkonzentration auf 2 % festgelegt und erneut nur Partikel im Größenbereich 200–400 μm untersucht, um die Auswirkungen der Agglomeration auf die Freisetzung zu vermeiden (Abbildung 17).

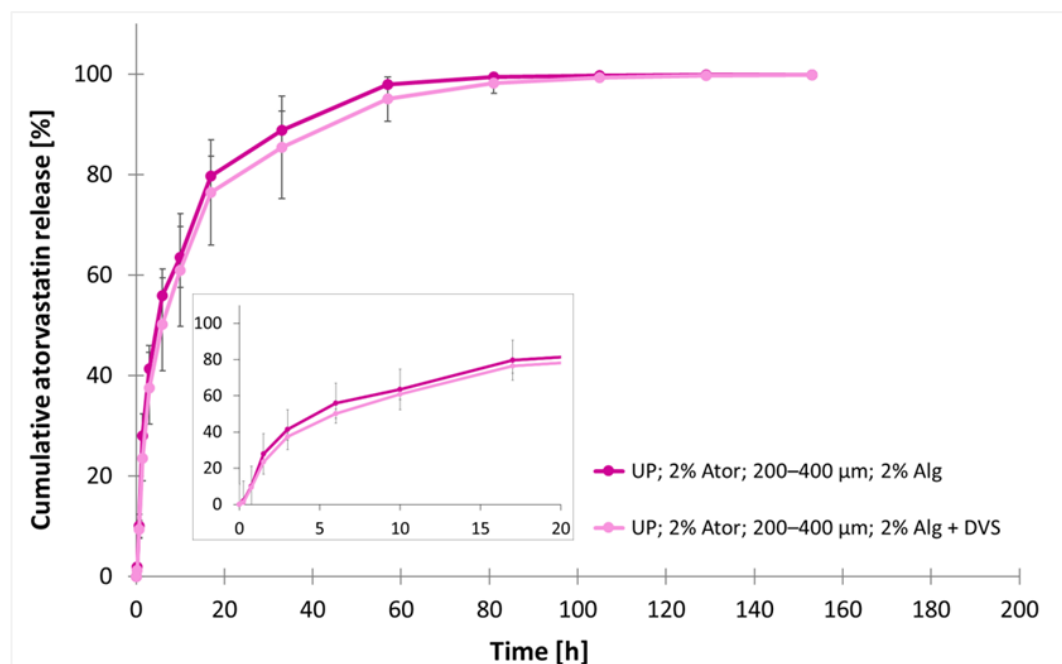


Abbildung 17: Auswirkung der Zugabe von Divinylsulfon (DVS) auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin aus Mikropartikeln im Größenbereich 200–400 μm , hergestellt mit einem Ultraschallprozessor (US); 2 % Atorvastatin (Ator) und 2 % Natriumalginat (Alg); alle mit Mittelwert $\pm$ SD dargestellt und $n = 15$; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm

Die Zugabe von DVS führte zu einer statistisch signifikanten Verzögerung des $t_{50\%}$ -Wertes von $4,97 \pm 1,32$ h auf $7,52 \pm 3,08$ h ($p = 0,006$). Die Zeit bis zur 99,5-prozentigen Freisetzung wurde durch die DVS-Vernetzung nicht statistisch signifikant beeinflusst ($t_{99,5\%} = 95,84 \pm 16,07$ h mit DVS vs. $t_{99,5\%} = 91,26 \pm 11,19$ h ohne DVS).

3.8 Mechanismen der Wirkstofffreisetzung verschiedener Formulierungen

Zur Beschreibung des Freisetzungsmechanismus der vorgestellten Formulierungen wurde das Korsmeyer-Peppas-Modell angewandt, wobei der berechnete Diffusionsexponent n als Ausgangspunkt diente (Tabelle 5). Das konventionelle MC-Gel wies einen polymergesteuerten Super-Case-II Transport ($n > 0,89$) auf. Von dentalen Ultraschallscaler erzeugte Partikel zeigten demgegenüber einen diffusionskontrollierten Transport bei kleinen Partikeln ($n < 0,45$) und ein Super-Case-II-Verhalten bei großen Partikeln. Die vom Ultraschallprozessor hergestellten Partikel folgten einem gemischten (anormalen) Transportmodus ($0,45 < n < 0,89$) bei kleinen Partikeln und hauptsächlich Fickscher Diffusion bei größeren Partikeln ($n < 0,45$). Mit zunehmender Alginatkonzentration in den Formulierungen des Ultraschallprozessors verlagerte sich die Freisetzung von der Fickscher Diffusion zum Super-Case-II-Transport. Eine Erhöhung der Atorvastatinbeladung resultierte in einem grenzwertigen Transport von Case-II zu Super-Case-II ($n = 0,90$). Der Zusatz von DVS begünstigte die Freisetzung im Super-Case-II ($n = 1,08$).

4. Diskussion

Aus den anatomisch-physiologischen Gegebenheiten der gingivalen bzw. parodontalen Tasche ergeben sich spezielle Anforderungen an Drug Delivery und Controlled Release Systeme für die Parodontaltherapie. Ein Medikamententräger sollte leicht zu applizieren sein und trotz der kontinuierlichen Sekretion von Speichel und Sulkusflüssigkeit klinisch wirksame Konzentrationen aufrechterhalten können [59]. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit Mikropartikel in Durchmessern von 10–200 µm und 200–400 µm aus dem natürlichen Biopolymer Alginat mittels Ultraschallverfahren erzeugt und mit Atorvastatin beladen. Eine Analyse der Wirkstofffreisetzung wurde unter simulierten physiologischen Bedingungen (Inkubation in künstlichem Speichel bei 37 °C) über einen Zeitraum von mehreren Tagen für verschiedene Partikelformulierungen durchgeführt. Dabei wurden die Parameter Partikelgröße, Alginatgehalt, Wirkstoffbeladung und Zusatz des kovalenten Vernetzers Divinylsulfon variiert. Die konzipierten Mikropartikel sind für die Anwendung im Parodont geeignet, da ihre Beschaffenheit einerseits die Applikation in konventionellen Spritzensystemen zulässt. Andererseits ist die Größe der Partikel hinsichtlich der klinischen Anwendung optimal, da parodontale Taschen Ausmaße von mindestens 4 mm x 0,5mm zirkulär haben, um bei der diagnostischen Sondierung als pathologisch aufzufallen [60].

4.1 Entwicklung parodontaler Drug Delivery Systeme

Die Entwicklung von Drug Delivery Systemen in der Medizin ist ein verhältnismäßig junges Forschungsfeld und lässt sich auf den Beginn der 1950er Jahre zurückführen [61]. In der Parodontologie ist die Motivation seit Jahrzehnten groß, geeignete lokal einsetzbare Medikamententräger gegen den irreversiblen Abbau des Parodonts zu finden. Maßgebliche Gründe dafür sind, dass die systemische Verabreichung von Arzneimitteln mit einer schlechten Steuerung der Wirkung, unzureichender Verteilung im Körper, sowie Nebenwirkungen einhergeht [62]. Zudem bietet sich die parodontale Tasche als Applikationsort gut an, da Medikamententräger über den Parodontalspalt leicht und direkt zu platzieren sind.

Viele früher in der Parodontaltherapie entwickelte Medikamententräger, wie beispielsweise nicht-resorbierbare Fasern und Filme, mussten am Ende der Behandlung wieder vom Zahnarzt entfernt werden [63, 64]. Im Fokus stehen heute bei der Entwicklung von Medikamententrägern biologisch abbaubare Polymere. Für die

Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln sind neben Alginat auch Chitosan, Pektin, Hyaluronsäure oder Polyethylenglykol als untersuchte Medikamententräger zu nennen [65]. Diese lösen sich auf natürliche Weise auf und erfordern keinen zusätzlichen Eingriff für die Entfernung.

Polymere spielen in der technologischen Entwicklung von Drug Delivery Systemen eine wichtige Rolle, da sie neben bereits vorhandenen günstigen Eigenschaften auch die Möglichkeiten für weitere physikalisch-chemische Modifikationen bieten [43]. Eine kritische Komponente bei der Entwicklung von Formulierungen ist jedoch, dass die Verträglichkeit natürlicher Polymere zu evaluieren und deren Ausscheidung über den regulären Stoffwechselweg zu untersuchen ist. Herausforderungen können sich aus der Notwendigkeit ergeben, Polymere umfassend von Verunreinigungen zu befreien und aufwändige Verfahren für eine reproduzierbare Herstellung zu etablieren [59].

4.2 Alginatpartikel

Alginat fand ursprünglich im großen Umfang als Zusatzstoff und Zutat in der Lebensmittelindustrie Gebrauch. Seine physikalischen Eigenschaften, die Biokompatibilität, die biologische Abbaubarkeit und die Möglichkeit der kostengünstigen Gewinnung waren Gründe dafür, Alginat in dieser Studie als Medikamententräger zu verwenden [25]. Alginatbasierte Materialien können in zahlreiche Formen, wie z.B. Kugeln, Blöcke, Schwämme und Partikel in Mikro- und Nanogröße gebracht werden. Ermöglicht wird dies durch Vernetzungsmittel, welche ionische oder kovalente Bindungen erzeugen [66]. Wie eingangs beschrieben, bildet Alginat in Gegenwart von mehrwertigen Kationen unter milden Bedingungen ein hydrophiles Gel, da zweiwertigen Ionen mit Blöcken der Guluronsäureeinheiten des Alginats interagieren und Ionenbrücken zwischen den verschiedenen Ketten bilden können [34]. Diese Art der ionischen Vernetzung wurde für die Partikelherstellung unserer Arbeit genutzt. Obwohl Mørch et al. herausgearbeitet haben, dass zweiwertige Kationen wie beispielsweise Pb^{2+} , Cu^{2+} und Cd^{2+} die stabileren Vernetzer von Alginat sind, so finden diese im medizinischen Bereich aufgrund ihrer Toxizität bei höheren Konzentrationen kaum Einsatz [67]. Die gute Biokompatibilität und Degradation von kalziumvernetztem Alginat hat dazu geführt, dass dieses in der Medizin schon flächendeckend als Medikamententräger oder im Tissue Engineering genutzt wird [68]. Es dient im klinischen Alltag für Wund- und Hydrogelverbände, sowie für die Verkapselung von Medikamenten oder Probiotika [26, 34]. In der Zahnheilkunde sind alginatbasierte Werkstoffe vor allem als Abdruckmaterial und als Haftsalben

für Prothesen im Einsatz [69]. Für die Endodontie zeigen Studien, dass Alginat sich als Zellträger in der regenerativen Endodontie oder als Bestandteil von Wurzelkanalversieglern eignet [70]. Wenige klinische Studien liegen bisher zu der Anwendung von Alginat in der Parodontologie vor. Erste Versuche wurden hinsichtlich der regenerativen Therapie infraalveolärer Defekte vorgenommen. Fernandes et al. beschreiben den erfolgreichen Einsatz von Alginatpartikeln für die Zufuhr von mit Wachstumsfaktoren angereichertem Plasma, das die in vivo Knochenregeneration statistisch signifikant förderte [71]. In anderen Studien, die sich auf Ratten und menschliche Zellen konzentrierten, wurden Systeme auf Alginatbasis als zuverlässiges Verabreichungsinstrument für verschiedene Anwendungen in der Zahnmedizin empfohlen [72–75].

Das in dieser Studie verwendete Herstellungsverfahren für Mikropartikel lässt sich als ionische Gelierung einordnen. Sie wird charakterisiert durch das Eintropfen einer Alginatlösung in ein Salzbad mit zweiwertigen Ionen. Es handelt sich um eines der am häufigsten verwendeten einstufigen Verfahren [76]. Die Methode zeichnet sich durch eine einfache Durchführung, toxikologisch-unbedenklich Reagenzien und günstige chemische Bedingungen aus, die für die Beladung mit Arzneimitteln geeignet sind. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich zahlreiche weitere Methoden zur Herstellung von Alginatpartikeln, wobei physikalische Verfahren wie Sprühtrocknung und Elektrodispersion, sowie physikalisch-chemische Methoden wie Emulgierung zum Einsatz kommen [77–79]. Physikalisch-chemische Verfahren eignen sich jedoch hauptsächlich für die Herstellung von Partikeln im Nanometerbereich und erfordern eine anspruchsvolle Laborausstattung. Die Emulgierung wiederum ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zusätzliche Reagenzien benötigt werden, um die Partikel aus der Emulsion zu lösen, was die Produktionszeit erheblich verlängert [76, 80]. Die Verwendung der ionischen Gelierung gewährleistet eine effiziente und technisch-einfache Methode. Überdies sind die benötigten Inhaltsstoffe kostengünstig und weithin verfügbar.

Für die Erzeugung von feinen Partikeln existieren diverse Sprühtechniken, darunter luftunterstützte, druckbasierte, elektrostatische, mikrofluidische oder düsenunterstützte Systeme [81, 82]. Ultraschallzerstäuber haben sich als vorteilhaftes neues Werkzeug für die Mikroverkapselung im Vergleich zu herkömmlichen Methoden erwiesen, da mit diesem Verfahren homogene Partikel hinsichtlich Form und Größe gebildet werden können. Darüber hinaus benötigt der Produktionspro-

zess wenig Energie und bietet eine höhere Betriebsgeschwindigkeit, sowie industrielle Skalierbarkeit [83, 84]. Derzeit existieren wenige Studien, die den wissenschaftlichen Nachweis für das ultraschallgestützte Sprühen zur Verkapselung von Arzneimitteln in Alginatpolymeren erbracht haben. Cascone et al. (2012) untersuchten die Wirkstofffreisetzung aus Alginatmikroperlen unter sauren Bedingungen, um die Magen Umgebung zu simulieren [85]. Aufgrund der geringen Wirkstoffbeladung konnte die gewünschte kontrollierte Freisetzung nicht erreicht werden. Das unzureichende Ergebnis wurde jedoch mit der geringen Molekülmasse des Medikaments und der Säureeinwirkung anstelle der Ultraschallzerstäubung begründet. Scholz et al. haben eine Methode zur Partikelerzeugung über externe Gelierung beschrieben. Mithilfe eines dentalen Ultraschallscalers kann Alginat als Aerosol zerstäubt und in einer Lösung mit zweiwertigen Kationen (Ca^{2+}) aufgefangen werden [33]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls auf diese Technik zurückgegriffen. Obwohl die mit dem dentalen Ultraschallscaler hergestellten Partikel in der größeren Gruppe (Formulierung 3) eine verzögerte Medikamentenfreisetzung in unseren Experimenten erreichten ($t_{50\%} = 3,08 \text{ h}$ und $t_{99,5\%} = 26,44 \text{ h}$), mangelte es dem Arbeitsverfahren generell an Zeiteffizienz. Des Weiteren finden Ultraschallscaler primär Anwendung im Rahmen der Zahnhygiene zur Entfernung von Plaque und Zahnstein. Ihre Konzeption zielt nicht auf die Herstellung von Biomaterialien ab, weshalb ihre praktische Verwendung für die Mikroverkapselung als potentiell unzuverlässig zu betrachten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine schnelle alternative Methode zur Herstellung ultraschallerzeugter Alginatpartikel untersucht. Die technische Umsetzung erfolgte unter Verwendung eines Ultraschallprozessors, dessen Funktionsweise der eines Ultraschallscalers ähnelt, jedoch eine statistisch signifikant höhere Leistung erbringt. Infolgedessen kann die gleiche Menge an Partikeln innerhalb von Minuten statt Stunden produziert werden. Lichtmikroskopisch waren mikrogroße Alginatpartikel mit tropfenförmigem Querschnitt nachzuweisen. Zu untersuchen bleibt, wie die Größe und Form der Partikel, sowie die Oberflächenbeschaffenheit durch den Versuchsaufbau zu beeinflussen sind. Beispielsweise könnte ein größerer Abstand zwischen Ultraschallspitze und Kalziumchloridbad dazu führen, dass die Partikel mit kleinerer Geschwindigkeit auf die Oberfläche auftreffen und die Tropfenform einer runden Form weicht [86]. Zudem ist bekannt, dass durch externe Gelation erzeugte Partikel tendenziell eine inhomogene Matrix mit einer hohen Kationen- und Alginatkonzentration an der Oberfläche haben können, als Partikel, die durch andere Verfahren gewonnen wurden [87].

4.3 Inkorporation von Atorvastatin

Im Rahmen der Experimente wurde die Wirkstoffbeladung der Partikel mit Atorvastatin auf zwei verschiedene Weisen analysiert. Sowohl eine direkte Beladung mit Atorvastatin als auch eine nachträgliche (indirekte) Beladung der Partikel über Diffusion konnte erfolgen. Beide Verfahren führten zur Detektion des Wirkstoff nach dessen Extraktion. Die Aufnahme von Stoffen in Alginat über Diffusion konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden [88–90]. Als entscheidend stellten Tanaka et al. dabei die Molekülmasse heraus. Substanzen mit einer molekularen Masse von weniger als 2×10^4 g/mol können ungehindert in kalziumvernetztes Alginatperlen diffundieren [90]. Mit einem Molekulargewicht von 1209,39 g/mol ist Atorvastatin demnach problemlos in der Lage, Poren im Alginat zu passieren. Vorteilhaft daran ist, dass mit dieser einfachen Beladungsmethode auch die Möglichkeit einer Zubereitung des Medikamententrägers vor Ort bestünde. Andererseits bedeutet die freie Beweglichkeit des Atorvastatins auch, dass unter regelmäßiger Zufuhr eines Elutionsmittels innerhalb kurzer Zeit der Austritt des Wirkstoffs erfolgen könnte. Die vorliegende Arbeit befasst sich nicht mit dieser Thematik, sondern stellt lediglich einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Weiterverfolgt wurde stattdessen der Ansatz, den Wirkstoff direkt vor Partikelproduktion in das Alginat einzurühren. Dies wurde auch von anderen Autoren erfolgreich durchgeführt. Dewangan et al. verkapselten ebenfalls Atorvastatin in Alginatmikrokügelchen und bestätigten durch Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, dass Alginat als neutraler Träger fungiert und keine Wechselwirkung mit dem geladenen Arzneimittel zeigt. Diese Eigenschaft ist entscheidend für die Kompatibilität und Sicherheit bei künftigen klinischen Anwendungen [91].

4.4 Drug Release aus verschiedenen Formulierungen

In vergangenen klinischen Studien wurden Statine für die parodontale Anwendung hauptsächlich in Methylcellulose-Hydrogele eingearbeitet [19, 92–94]. Methylcellulose ist einer der wichtigsten kommerziellen Ether von Cellulose [42]. Zu den größten Nachteilen solcher Hydrogele gehören jedoch die begrenzte Retention in der Zahnfleischtasche, die schnelle Verdünnung durch Speichel und die uneinheitliche Wirkstofffreisetzung. In unseren Experimenten wurde das Methylcellulosegel nach 17 h Inkubation in künstlichem Speichel aufgelöst, sodass das eingeschlossene Atorvastatin (1 %) in weniger als 24 h vollständig freigesetzt wurde. Das Resultat dieser Untersuchung zeigt Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen einer Studie

von Ahmed et al., die ebenfalls eine vollständige Wirkstofffreisetzung aus Methylcellulose mit 1,2 % Atorvastatin innerhalb eines Tages beobachteten [95]. Die produzierten Alginatpartikel wiesen eine deutlich höhere Stabilität für mindestens sieben Tage auf, was einer zehnfach verlängerten Degradationsdauer im Vergleich zu Methylcellulosegel entspricht. Die hohe Stabilität von Alginat lässt sich durch den langsamen Austausch von Natriumionen aus dem umgebenden Medium gegen Kalziumionen in den Partikeln während des Degradationsprozesses erklären [96].

Um die Freisetzung von Atorvastatin kontrolliert zu verlängern wurden in dieser Arbeit verschiedene Variationen am Herstellungsprotokoll der Alginatpartikel vorgenommen. Eine Modifikation der Polymerkonzentration wurde bereits von anderen Autoren als effektive Methode zur Optimierung des Wirkstoffeinschlusses dokumentiert. Reddy & Nagabhushanam produzierten mit Atorvastatin beladene und auf Alginat basierende Hydrogelkügelchen durch ionische Gelierung. Die Autoren stellten fest, dass niedrige Alginatkonzentrationen (1-2 %) zu einem lockeren Polymer Netzwerk führten, welches eine höhere Flüssigkeitsabsorption und eine höhere Quellungsrate zur Folge hatte. Eine lockere Matrix war jedoch auch für erleichterte Wirkstoffdiffusion verantwortlich, die die Freisetzungsrates erhöhte. Im Gegensatz dazu verlangsamte die Erhöhung der Alginatkonzentration auf 3 % die Wirkstofffreisetzung [97]. Die von Reddy & Nagabhushanam untersuchten Partikel wiesen größere Durchmesser auf (480–1132 μm), jedoch wurden ähnliche Tendenzen in den Freisetzungsprofilen zu in dieser Arbeit hergestellten Partikeln beobachtet. Bei der Gruppe der größeren Partikel (200–400 μm) führte die Erhöhung der Alginatkonzentration zu einer Verlängerung der Zeit, welche erforderlich war, um 50 % des gebundenen Atorvastatins wieder freizusetzen ($t_{50\%}$). Es wurde eine 2-fache Verzögerung der Freisetzung erreicht, indem der Alginatgehalt von 2 % (Formulierung Nr. 7) auf 3 % (Formulierung Nr. 8) erhöht wurde (1,00 h vs. 2,58 h). Eine weitere Polymeranreicherung auf 4 % Alginat (Formulierung Nr. 9) verkürzte das $t_{50\%}$ -Intervall allerdings geringfügig (1,94 h). Letztere Beobachtung indiziert, dass die Polymerkonzentration bei Partikeln mit Durchmesser $<400\ \mu\text{m}$ eine weniger starke Rolle für Freisetzung spielt als bei den größeren Partikeln ($\sim 1\ \text{mm}$), wie sie Reddy und Nagabhushanam untersuchen. Alginatkonzentrationen über 5 % und 6 % führten zu einer Lösung, die sich nicht adäquat dispergieren ließ. Diese Beobachtung lässt sich durch die rheologischen Eigenschaften von Natriumalginatlösungen erklären. Wie bereits andere Autoren beschrieben haben, nimmt die Viskosität mit zunehmender Konzentration stark zu [98, 99]. Aus der Analyse der

Gruppe der kleineren Partikel (Formulierungen Nr. 4, 5 und 6) geht hervor, dass das $t_{50\%}$ -Intervall (4,15 h) bei einer niedrigen Alginatkonzentration (2 %) am längsten ist, was im Widerspruch zu Reddy & Nagabhushanam Beobachtungen steht. Die Verlängerung des Intervalls ist jedoch auf die beobachtete Agglomeration der Partikel zurückzuführen, welche die Arzneimitteldiffusion potenziell verhindert haben könnte. Die Agglomeration wird in der Fachliteratur als eine häufige Reaktion bei kleinen Partikeln mit niedrigem Polymergehalt (2 %) beschrieben [100, 101].

Die Anwendung des Korsmeyer-Peppas-Modells zeigt, dass die Wirkstofffreisetzung in der Gruppe der größeren Partikel mit 2 % Alginatkonzentration (Formulierung Nr. 7) einem Fickschen Diffusionsmuster folgte, bei dem die geringe Dichte der Polymermatrix eine schnelle Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten ermöglicht (Case-I-Transport). Aufgrund von Verklumpungen war die Gruppe der kleineren Partikel (Formulierung Nr. 4) durch eine erhebliche Freisetzungverzögerung gekennzeichnet, was wahrscheinlich auf den nicht-Fickschen Transportmechanismus zurückzuführen ist, der eine Kombination aus passiver Diffusion und Polymerrelaxation darstellt. Demgegenüber führte ein erhöhter Polymergehalt in beiden Gruppen zu einer gesteigerten Netzwerkichte und einer Verschiebung des Freisetzungsmechanismus von passiver Diffusion zu Super-Case-II-Transport. Dies lässt den Schluss zu, dass die Degradation des Polymers und nicht die reine Diffusion der dominierende Faktor für die verzögerte Wirkstofffreisetzung war. Dieser Übergang ist von besonderer Relevanz für Arzneimittelformulierungen, die eine kontrollierte und verlängerte Freisetzung anstreben.

Diese Studie hat ergeben, dass die enthaltene Wirkstoffmenge in den Partikeln der maßgebliche Faktor für eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über mehrere Tage ist. Um eine Agglomeration und deren potenzielle Auswirkungen auf die Wirkstofffreisetzung zu verhindern, wurden ausschließlich Partikel im Bereich von 200–400 μm untersucht. Die Alginatkonzentration wurde auf 2 % festgelegt, um für die erhöhte Arzneimitteldosierung mehr Fläche für den Werkstoffeinbau zur Verfügung zu stellen. Die Erhöhung der Atorvastatinkonzentration von 1 % auf 4 % (Formulierung Nr. 12) resultierte in einer Verlängerung des $t_{50\%}$ -Intervalls von 1,00 h auf 10,83 h und in einer Verschiebung des Freisetzungsmechanismus von passiver Diffusion zu Case II-Transport. Demnach fungierten Polymerquellung und -relaxation als Hauptantriebskräfte für die verzögerte Wirkstofffreisetzung. Der Nachweis von freigesetztem Atorvastatin konnte bis zu $123,35 \pm 3,55$ h nach der Inkubation erbracht werden, was auf ein effektives Freisetzungsintervall von ca. 5

Tagen hinweist. Dies stellt eine 7-fache Verbesserung im Vergleich zu einem konventionellen Methylcellulose-Träger dar. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten Olukman et. al, die in ihrer Arbeit Alginatbeads mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil beluden. Je höher der Wirkstoffanteil in den hergestellten Partikeln war, desto langsamer erfolgte die kumulative Freisetzung. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass das lösliche Medium bei einem geringeren Wirkstoffgehalt schneller ins Polymernetz eindringen kann und den Wirkstoff herauslöst [102].

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, eine Verzögerung der Freisetzung zu erreichen, indem Alginat ein kovalentes Vernetzungsmittel hinzugefügt wird. Im Allgemeinen wird hierbei die beträchtliche Anzahl reaktiver funktioneller Gruppen wie Carboxyl- und Hydroxylgruppen entlang des Alginatgerüsts genutzt. Die Carboxylgruppen des Alginats können beispielsweise durch Carbodiimid- und Veresterungsreaktionen modifiziert werden [103]; die chemische Veränderung der Hydroxylgruppen kann durch Oxidation, Sulfatierung, Pfropfcopolymerisation, Acetylierung und Phosphorylierung erreicht werden [104]. Vernetzungsmitteln haben Einfluss auf die Struktur und die Eigenschaften des Alginats. Parameter wie Porosität oder Wirkstofffreisetzungsprofil können verändert werden, sowie eine mechanische Festigkeit durch Stabilisierung der Alginatmatrix erreicht werden [103]. Divinylsulfon hat sich als Kopplungsreagenz bei der Vernetzung von Hyaluronsäure bewährt und wird zu diesem Zweck klinisch bereits eingesetzt [105–107]. DVS-modifizierte Hyaluronsäure weist eine größere mechanische Stabilität, eine verlängerte Abbauphase und eine gleichbleibende In-vitro-Biokompatibilität bei DVS-Konzentrationen von bis zu 50 mM auf [108]. Obwohl DVS bereits in verschiedenen Forschungsgebieten Anwendung fand, wurde es bis dato nicht zur Stabilisierung von Alginatpartikeln genutzt. Im Jahr 2012 führten Yu und Chau eine Studie durch, in der sie die Auswirkungen von DVS auf verschiedene Polymere mit Hydroxylgruppen, darunter Alginat, untersuchten. Zu diesem Zweck wurden die Polymere mit 0,1 M NaOH und DVS vermischt und die resultierenden Mischungen mittels Protonen-Kernresonanzspektroskopie analysiert. Das Vorhandensein von Vinylgruppen wurde in den Spektren aller untersuchten Polymere nachgewiesen, wodurch die festgestellten Vernetzungseigenschaften bestätigt wurden [109]. Die Implementierung von DVS in unsere Zubereitungsmethode führte zu einer statistisch signifikanten Verlängerung des $t_{50\%}$ -Intervalls um ~3 h, was auf eine verbesserte Freisetzungskontrolle hindeutet; das Gesamtfreisetzungsintervall wurde durch DVS jedoch nicht statistisch signifikant beeinflusst. Diese Beobachtung könnte auf die stabilere Struktur der DVS-modifizierten Partikel zurückzuführen

sein, die eine anfänglich stärkere Resistenz gegen eine Quellung des Polymers bewirkt. Der Wirkstofftransport verlagerte sich nach der Zugabe von DVS von einem Case-II- zu einem Super-Case-II-Verhalten ($n = 0,91$ bzw. $n = 1,08$). Es wird vermutet, dass die Erosion des Polymers die Freisetzung des Medikaments nach Beginn der Quellung erleichterte, während die Partikel ohne DVS-Vernetzung weniger von der Degradation betroffen waren. Die DVS-Vernetzung hatte eine verzögerte Freisetzung zur Folge, indem sie die mechanische Stabilität der Matrix erhöhte, während $t_{99,5} \%$ aufgrund der Wirkstofffreisetzung durch die später einsetzende Polymerdegradation unbeeinflusst blieb. Folgestudien und die Optimierung des Vernetzungsprotokolls sind erforderlich, um die Vorteile der Vernetzung zu bewerten, einschließlich der Prüfung unterschiedlicher DVS-Konzentrationen oder anderer biokompatibler kovalenter Vernetzer.

4.5 Ausblick auf klinische Anwendung

Alginate-Mikropartikel von einer Größe bis 400 μm könnten zukünftig eine vielversprechende Alternative für die subgingivale Verabreichung von Statinen darstellen. Die in dieser Forschungsarbeit hergestellten Partikel mit 1 % Atorvastatin (Formulierungen Nr. 2 und Nr. 3) wiesen im Freisetzungsprofil Ähnlichkeit mit einem in der Vergangenheit klinisch verabreichten Methylcellulosegel auf. Letzteres zeigte bei Patienten mit Parodontitis nach bereits einer einmaligen Verabreichung statistisch signifikante Verbesserungen der klinischen Parameter [92]. In einer anderen In-vivo-Studie wurde bei Ratten mit Parodontitis nach der Behandlung mit 2 % Atorvastatin, das über ein Chitosan-Gel verabreicht wurde, eine statistisch signifikante Heilung des Alveolarknochens und eine Abnahme der Entzündung festgestellt [40]. Die systemischen Dosen von Atorvastatin liegen im klinischen Kontext zwischen 10 und 80 mg/Tag. Für die lokale Gabe des Statins werden in der Literatur niedrigere Dosen zwischen 1 μg und 50 mg/Körpergewicht angegeben [110]. Bei schweren parodontalen Defekten kann die Taschentiefe 4 mm bis 12 mm betragen, was für die Applikation von 250 mg Alginate-Mikropartikeln ausreichend wäre. Bei einer Wirkstoffbeladung mit 2 % Atorvastatin könnten ca. 5 mg Wirkstoff an der Applikationsstelle freigesetzt werden. Dies läge im Bereich der therapeutischen Konzentrationen, die üblicherweise in verschiedenen In-vitro-Studien verwendet werden [110]. Obgleich orale Statine diverse unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufweisen, konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass die lokale Applikation von Atorvastatin nicht toxisch für Membranen und Weichgewebe

ist [111, 112]. In der klinischen Praxis wurde Atorvastatin jedoch noch nicht in größerem Umfang eingesetzt. Um die optimale Dosis für die parodontale Anwendung festzulegen, sind weitere In-vivo- und klinische Studien notwendig.

Diese experimentelle Studie lieferte erste Hinweise auf die Funktionalität alginat-basierter Mikropartikel für die parodontale Anwendung von Atorvastatin. Die Aussagekraft von In-vitro-Untersuchungen sind jedoch begrenzt und können die komplexen Wechselwirkungen im lebenden Organismus oder die Bedingungen in einer Zahnfleischtasche nicht vollständig widerspiegeln. Daher müssen die Stabilität und der Abbau der Alginatpartikel in weiteren Studien experimentell untersucht werden. Neben den intrinsischen Eigenschaften, die das Freisetzungsprofil bestimmen, wie z.B. Partikelgröße, Wirkstoffmenge, Polymergehalt und die Einbeziehung zusätzlicher Stabilisatoren, können auch externe Faktoren von entscheidender Bedeutung sein. Zu Letztgenannten lassen sich pH-Wert und Temperatur zählen [57, 113]. Für Kalziumalginat ist bekannt, dass unter sauren Bedingungen kaum eine Quellung stattfindet und Wirkstoffe zunächst hauptsächlich über Diffusion aus Partikeln abgegeben werden. Unter neutralen Bedingungen hingegen hängt die Freisetzung vorwiegend von Quellungs- und Erosionsprozessen ab [114]. In dieser Arbeit wurde Kunstspeichel mit einem neutralen pH-Wert verwendet. Die initiale Quellung konnte dementsprechend bei allen Versuchen beobachtet werden und ist eine Erklärung für die verhältnismäßig schnelle Freisetzung zu Beginn des Messzeitraumes bei nahezu allen untersuchten Proben. Diskutiert man eine klinische Anwendung, so ist zu betonen, dass der pH-Wert der Sulkusflüssigkeit verschiedener Patienten Schwankungen aufweisen kann. Während an der gesunden Gingiva durchschnittlich ein pH-Wert von 6,5 zu messen ist, so kann dieser bei moderaten und schweren Entzündungen der Gingiva auf 5,4 absinken [115]. Nachfolgende Studien könnten den Schwerpunkt auf die Freisetzungsraten unter verschiedenen pH-Bedingungen legen, um eine angemessene Dosierung zu gewährleisten. Weitere In-vivo-Validierungen sind ebenfalls erforderlich, um die Wirksamkeit und Verträglichkeit unseres Systems sicherzustellen.

5. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine weltweit verbreitete Erkrankung des Zahnhalteapparats. Die demografische Entwicklung der Gesellschaft lässt in Deutschland einen Anstieg der Prävalenz dieser Erkrankung erwarten [116]. In der Parodontistherapie steht die instrumentelle Reinigung des Zahnes und der Wurzeloberfläche im Vordergrund, um pathogene Bakterien zu eliminieren. Aufgrund der wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Pathogenese parodontaler Erkrankungen gewinnt jedoch auch der Einsatz von adjuvanten Medikamenten, wie z. B. antiinflammatorischen und immunmodulierenden Medikamenten, zunehmend an Bedeutung. Zu diesen Medikamenten gehört die Medikamentenklasse der Statine. In dieser In-vitro-Arbeit wurde ein optimiertes Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln auf Alginatbasis mit einem Ultraschallprozessor entwickelt und die Freisetzung von Atorvastatin aus verschiedenen Partikelformulierungen unter Einfluss von künstlichem Speichel bei 37°C untersucht. Die Mikropartikel wiesen im Vergleich zu herkömmlichem Methylcellulosegel eine bessere Wirkstoffrückhaltung und Stabilität auf. Die Integration von Divinylsulfon in die Formulierung stabilisierte die Atorvastatinabgabe in der frühen Freisetzungsphase statistisch signifikant. Ein niedriger Alginatgehalt von 2 % war für die häufige Agglomeration zwischen kleinen Partikeln (10–200 µm) verantwortlich, die in der entsprechenden großen Gruppe (200–400 µm) fehlte. Der Polymergehalt von 3 % war für beide Gruppen optimal und ermöglichte eine doppelt so lange Freisetzung wie in dem Methylcellulose-Träger. Die stärkste Auswirkung auf die Verlangsamung der Wirkstofffreisetzung wurde durch eine Erhöhung der Wirkstoffmenge auf 2 % und 4 % Atorvastatin erreicht, wodurch das kontrollierte Freisetzungsprofil über mehrere Tage aufrechterhalten werden kann.

In Zukunft könnten Alginatmikropartikel eine wertvolle Alternative zu bestehenden Medikamententrägern im Bereich der Parodontologie darstellen. Um die zytotoxischen und therapeutischen Wirkungen zu bewerten, sind weitere In-vitro- und In-vivo-Validierungsstudien erforderlich.

6. Thesen

- 1) Alginatpartikel können mithilfe eines Ultraschallprozessor im Größenbereich von 10–400 µm hergestellt werden. Sie sind im Sinne eines Controlled Release Systems für die parodontale Anwendung geeignet.
- 2) Alginatpartikel lassen sich direkt und nachträglich (indirekt) über Diffusion mit Atorvastatin beladen.
- 3) Atorvastatinbeladene Alginatpartikel geben das Medikament unter Einfluss von künstlichem Speichel und simulierter Körperwärme (37 °C) verzögert wieder ab.
- 4) Die Freisetzung von Atorvastatin lässt sich über die Variation von Herstellungsparametern wie Partikelgröße, Alginatkonzentration oder Atorvastatinkonzentration steuern und kontrollieren.
- 5) Eine Quervernetzung des Alginats mit Divinylsulfon hat einen verzögernden Einfluss auf das Freisetzungsprofil atorvastatinbeladener Alginatpartikel.

7. Publikation

Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2025 im Journal *Polymers* von MDPI unter dem Titel “In Vitro Release Dynamics of Atorvastatin-Loaded Alginate Particles for Enhanced Periodontal Treatment” publiziert.

<https://doi.org/10.3390/polym17030427> 

8. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Inanspruchnahme fremder Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Aus Veröffentlichungen wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen habe ich in jedem einzelnen Fall als solche kenntlich gemacht habe.

Hiermit versichere ich weiterhin, dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen oder mich für ein solches beworben habe. Die eingereichte Schrift wurde in dieser oder ähnlicher Fassung an keiner anderen in- oder ausländischen Fakultät vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

9. Danksagung

Zunächst möchte ich besonderen Dank an meinen Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Hermann Lang richten. Er unterstützte den Fortgang dieser Dissertation mit seiner Expertise und war bei Fragen stets für mich erreichbar. Darüber hinaus waren seine ermutigenden Worte in herausfordernden Phasen des Forschungsprozesses besonders wertvoll.

Ich möchte mich weiterhin ausdrücklich und herzlich bei Herrn Dr. Thomas Reske bedanken. Unsere regelmäßigen Treffen in Warnemünde, die fachliche Beratung und die kontinuierliche Unterstützung im Labor bildeten für mich das Fundament dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch Oleksandra Chabanovska, die mit viel Hingabe in das Thema eingetaucht ist und mich mit ihrer wissenschaftlichen Kompetenz unterstützt hat. Unsere Konsultationen und ihr Engagement haben einen maßgeblichen Beitrag zum Abschluss dieser Dissertation geleistet.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Malte Scholz bedanken, der mir mit fachlicher Begeisterung bei der Themenfindung und Methodenentwicklung geholfen hat.

Auch bedanke ich mich bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern:innen des IBMT, insbesondere bei Herrn Dr. Stefan Oschatz und Andrea Rohde, die mich mit fachlicher und praktischer Hilfe unterstützten und mir immer das Gefühl gaben, am Institut willkommen zu sein.

Für die statistische Beratung bedanke ich mich bei Frau Dr. Aenne Glass.

Danke an meine Schwestern, die an mich geglaubt haben. Und danke an meinen Freund Martin, der mir bei der Aneignung statistischer Grundlagen verhalf und mir mit viel Geduld zur Seite stand.

Mein besonderer und liebevoller Dank gebührt meinen Eltern, die mit Hingabe und Weitsicht die Grundlage für meinen Bildungsweg geschaffen haben und mir somit eine solide Basis für meine heutigen beruflichen Möglichkeiten verliehen haben.

10. Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rückgang des Alveolarknochens an Zahn 31 als Folge einer Parodontitis.....	6
Abbildung 2: Einteilung parodontaler Drug Delivery Systeme mit Beispielen [20].....	11
Abbildung 3: Typisierung von Mikrokapseln [32]	12
Abbildung 4: Eierkartonmodell des vernetzten Alginats [35].....	15
Abbildung 5: Strukturformel von Atorvastatin [39]	16
Abbildung 6: Strukturformel von Methylcellulose [43].....	17
Abbildung 7: Strukturformel von Divinylsulfon [50]	19
Abbildung 8: Homogenes Gemisch aus Alginat und Atorvastatin	20
Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf für Herstellung von Alginatpartikeln; Versuchsanordnung bestehend aus einem Ultraschallscaler oder Ultraschallprozessor (1), einer Spritze mit einer 20-G-Kanüle (2), mit der das Alginat-Atorvastatin-Gemisch auf die Spitze der Sonotrode aufgetragen wurde; ein Becherglas mit einer 3%igen Kalziumchloridlösung (3), in dem Alginatpartikel gebildet und aufgefangen wurden; einem Magnetrührer (4), um eine Agglomeration der Partikel zu verhindern	21
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit Atorvastatin beladenen Alginatpartikeln; Partikel mit Durchmessern von 10–200 µm, durch einen Ultraschallprozessor erzeugt (10-fach vergrößert)	23
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit Atorvastatin beladenen Alginatpartikeln; Partikel mit Durchmessern zwischen 10–200 µm durch einen Ultraschallprozessor erzeugt (40-fach vergrößert)	24
Abbildung 12: Vergleich der aus 10 mg Alginatpartikeln mit Methanol extrahierten absoluten Atorvastatinmasse in µg nach direkter und nachträglicher Wirkstoffbeladung für 4 Stunden/ 4 Tage und der absolut in 1 ml Waschwasser enthaltene Atorvastatinmasse in µg; Messung mit HPLC; n=1	31

- Abbildung 13: Normierte kumulative Atorvastatinfreisetzung aus Methylcellulosegel (MC) in Kunstspeichel bei 37°C mit Atorvastatinkonzentration (Ator) 1 % (n=3) und aus Alginatpartikeln, hergestellt mittels dentalem Ultraschallscaler (DS), Alginatkonzentration 2 % (Alg), Atorvastatinkonzentration 1 % im Größenbereich 10–200 µm (n=3) und Größenbereich 200–400 µm (n=1); alle Mittelwert ± SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm..... 35
- Abbildung 14: Auswirkung der Alginatkonzentration auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 %, 3 % oder 4 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (UP) hergestellt wurden; Größenbereich 10–200 µm (n=5), alle Mittelwert ± SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm..... 38
- Abbildung 15: Auswirkung der Polymerkonzentration auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 %, 3 % oder 4 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (UP) hergestellt wurden; Größenbereich 200–400 µm (n=5), alle Mittelwert ± SD; vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm..... 39
- Abbildung 16: Auswirkung der Wirkstoffbeladung auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin (Ator) aus Mikropartikeln, die 2 % Natriumalginat (Alg) enthielten und mit einem Ultraschallprozessor (US) hergestellt wurden; Größenbereich 200–400 µm (n=5), alle Mittelwert ± SD, Atorvastatingehalt (Ator) von 1 % (n=5), 2 % (n=15) oder 4 % (n=3); vergrößerte Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm..... 40
- Abbildung 17: Auswirkung der Zugabe von Divinylsulfon (DVS) auf die normalisierte kumulative Freisetzung von Atorvastatin aus Mikropartikeln, hergestellt mit einem Ultraschallprozessor (US); 2 % Atorvastatin (Ator) und 2 % Natriumalginat (Alg); alle mit Mittelwert ± SD dargestellt und n = 15; vergrößerte

Darstellung der ersten 20 h der Freisetzung im zentral positionierten Diagramm	41
---	----

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kunstspeichels	18
Tabelle 2: Analysebedingungen der HPLC (Firma Knauer Berlin Smartline Pump 1000).....	27
Tabelle 3: Von Diffusionsexponent n abgeleitete Mechanismen des Stofftransportes aus Medikamententrägern.....	29
Tabelle 4: Formulierungen für ein Controlled Release System, das auf Methylcellulosegel (MC) oder Alginat basiert, mittels eines dentalen Ultraschallscalars (DS) oder eines Ultraschallprozessors (UP) und mit oder ohne einen zusätzlichen Vernetzer (Crosslinker) mit Divinylsulfon (DVS) hergestellt wurde.....	33
Tabelle 5: Freisetzungseigenschaften verschiedener Formulierungen; Unterscheidung von Fickscher Diffusion ($n \leq 0,45$), Nicht-Fickscher Diffusion ($0,45 < n < 0,89$), Case-II-Transport ($n = 0,89$) und Super-Case-II-Transport ($n > 0,89$); $t_{50\%}$ / $t_{99,5\%}$ als rechnerisch ermittelte Zeit für die Freisetzung von 50 % und 99,5 % des Wirkstoffs; der statistischer Vergleich von $t_{50\%}$ und $t_{99,5\%}$ erfolgte innerhalb von Gruppen, gekennzeichnet durch Farbmarkierung (gelb, grün, rot)	34

11. Literatur

1. Arnold, W. H. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 66 Tab, 3., unveränd. Aufl.; Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde; Thieme: Stuttgart, 2010. Seite 251. DOI: 10.1055/b-002-19446
2. Jordan, R. A.; Bodechtel, C.; Hertrampf, K.; Hoffmann, T.; Kocher, T.; Nitschke, I.; Schiffner, U.; Stark, H.; Zimmer, S.; Micheelis, W. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC oral health [Online]* 2014, 14, 161. DOI: 10.1186/1472-6831-14-161.
3. Trindade, D.; Carvalho, R.; Machado, V.; Chambrone, L.; Mendes, J. J.; Botelho, J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Journal of clinical periodontology [Online]* 2023, 50 (5), 604–626. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcpe.13769#jcpe13769-bib-0092>. DOI: 10.1111/jcpe.13769.
4. Nazir, M.; Al-Ansari, A.; Al-Khalifa, K.; Alhareky, M.; Gaffar, B.; Almas, K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The-ScientificWorldJournal [Online]* 2020, 2020, 2146160. DOI: 10.1155/2020/2146160.
5. Kornman, K. S.; Page, R. C.; Tonetti, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000 [Online]* 1997, 14, 33–53. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00191.x.
6. Wolf, H. F., Rateitschak, E. M., Rateitschak, K.-H., Schroeder, H. E., Eds. Einleitung. In *Parodontologie. Farbatlanten der Zahnmedizin* 1, 3., vollst. überarb. und erw. Aufl.; Thieme: Stuttgart, 2012. Seiten 1-4. DOI: 10.1055/b-002-41852.
7. N. U. Zitzmann. Die Folgen der Zahnlosigkeit für das Individuum. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 2004, No. 59, 617–625. Zugriff am 03.03.2024
8. Page, R. C.; Kornman, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000 [Online]* 1997, 14, 9–11. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x.
9. Papapanou, P. N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D. H.; Flemmig, T. F.; Garcia, R.; Giannobile, W. V.; Graziani, F.; Greenwell, H.; Herrera, D.; Kao, R. T.; Kebschull, M.; Kinane, D. F.; Kirkwood, K. L.; Kocher, T.; Kornman, K. S.; Kumar, P. S.; Loos, B. G.; Machtei, E.; Meng, H.; Mombelli, A.; Needleman, I.; Offenbacher, S.; Seymour, G. J.; Teles, R.; Tonetti,

- M. S. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology [Online]* 2018, 45 Suppl 20, S162-S170. DOI: 10.1111/jcpe.12946.
10. Sanz, M.; Marco Del Castillo, A.; Jepsen, S.; Gonzalez-Juanatey, J. R.; D'Aiuto, F.; Bouchard, P.; Chapple, I.; Dietrich, T.; Gotsman, I.; Graziani, F.; Herrera, D.; Loos, B.; Madianos, P.; Michel, J.-B.; Perel, P.; Pieske, B.; Shapira, L.; Shechter, M.; Tonetti, M.; Vlachopoulos, C.; Wimmer, G. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of clinical periodontology* 2020, 47 (3), 268–288. DOI: 10.1111/jcpe.13189.
 11. Naderi, S.; Merchant, A. T. The Association Between Periodontitis and Cardiovascular Disease: an Update. *Current atherosclerosis reports [Online]* 2020, 22 (10), 52. DOI: 10.1007/s11883-020-00878-0.
 12. Paster, B. J.; Boches, S. K.; Galvin, J. L.; Ericson, R. E.; Lau, C. N.; Levanos, V. A.; Sahasrabudhe, A.; Dewhirst, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology* 2001, 183 (12), 3770–3783. DOI: 10.1128/jb.183.12.3770-3783.2001.
 13. Sanderink, R. B. A., Renggli, H. H., Saxer, U. P., Eds. In *Orale Präventivmedizin. Eine interdisziplinäre Herausforderung*, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, 2022. Seite 334. DOI: 10.1055/b-006-149528.
 14. Naito, M.; Sakai, E.; Shi, Y.; Ideguchi, H.; Shoji, M.; Ohara, N.; Yamamoto, K.; Nakayama, K. Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. *Molecular microbiology [Online]* 2006, 59 (1), 152–167. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04942.x.
 15. Cobb, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clinic Periodontology [Online]* 2002, 29 (s2), 22–32. DOI: 10.1034/j.1600-051X.29.s2.4.x.
 16. Rabbani, G. M.; Ash, M. M.; Caffesse, R. G. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *Journal of Periodontology [Online]* 1981, 52 (3), 119–123. DOI: 10.1902/jop.1981.52.3.119.
 17. Sanz-Sánchez, I.; Montero, E.; Citterio, F.; Romano, F.; Molina, A.; Aimetti, M. Efficacy of access flap procedures compared to subgingival debridement in the treatment of periodontitis. A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology [Online]* 2020, 47 Suppl 22, 282–302. DOI: 10.1111/jcpe.13259.

18. Wise, R.; Hart, T.; Cars, O.; Streulens, M.; Helmuth, R.; Huovinen, P.; Sprenger, M. Antimicrobial resistance: Is a major threat to public health. *BMJ : British Medical Journal* 1998, 317 (7159), 609–610.
19. Bertl, K.; Parllaku, A.; Pandis, N.; Buhlin, K.; Klinge, B.; Stavropoulos, A. The effect of local and systemic statin use as an adjunct to non-surgical and surgical periodontal therapy-A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry [Online]* 2017, 67, 18–28. DOI: 10.1016/j.jdent.2017.08.011.
20. Figuero, E.; Serrano, J.; Arweiler, N. B.; Auschill, T. M.; Gürkan, A.; Emingil, G. Supra and subgingival application of antiseptics or antibiotics during periodontal therapy. *Periodontology 2000* 2023. DOI: 10.1111/prd.12511
21. Tahamtan, S.; Shirban, F.; Bagherniya, M.; Johnston, T. P.; Sahebkar, A. The effects of statins on dental and oral health: a review of preclinical and clinical studies. *Journal of translational medicine [Online]* 2020, 18 (1), 155. DOI: 10.1186/s12967-020-02326-8.
22. German, C. A.; Liao, J. K. Understanding the molecular mechanisms of statin pleiotropic effects. *Archives of toxicology [Online]* 2023, 97 (6), 1529–1545. DOI: 10.1007/s00204-023-03492-6.
23. Bertl, K.; Steiner, I.; Pandis, N.; Buhlin, K.; Klinge, B.; Stavropoulos, A. Statins in nonsurgical and surgical periodontal therapy. A systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo trials. *Journal of periodontal research [Online]* 2018, 53 (3), 267–287. DOI: 10.1111/jre.12514.
24. Amato, M.; Santonocito, S.; Polizzi, A.; Tartaglia, G. M.; Ronsivalle, V.; Viglianisi, G.; Grippaudo, C.; Isola, G. Local Delivery and Controlled Release Drugs Systems: A New Approach for the Clinical Treatment of Periodontitis Therapy. *Pharmaceutics* 2023, 15 (4). DOI: 10.3390/pharmaceutics15041312.
25. Wertheimer, A. I.; Santella, T. M.; Finestone, A. J.; Levy, R. A. Drug delivery systems improve pharmaceutical profile and facilitate medication adherence. *Advances in therapy* 2005, 22 (6), 559–577. DOI: 10.1007/bf02849950.
26. Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy [Online]* 2002, 28 (6), 621–630. DOI: 10.1081/DDC-120003853.
27. Ghavami-Lahiji, M.; Shafiei, F.; Najafi, F.; Erfan, M. Drug-loaded polymeric films as a promising tool for the treatment of periodontitis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology [Online]* 2019, 52 (2), 122–129. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.04.034.

28. Zamani, M.; Morshed, M.; Varshosaz, J.; Jannesari, M. Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nano-fibers for periodontal diseases. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* [Online] 2010, 75 (2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144711/>. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.02.002.
29. Gimeno, M. An overview of the latest development of microencapsulation for agricultural products. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* [Online] 1996, 31 (3), 407–420. DOI: 10.1080/03601239609373001.
30. Gouin, S. Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology* [Online] 2004, 15 (7-8), 330–347. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005.
31. Peanparkdee, M.; Iwamoto, S.; Yamauchi, R. MICROENCAPSULATION: A REVIEW OF APPLICATIONS IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. *RAS* [Online] 2016, 4 (0), 56–65. DOI: 10.7831/ras.4.56.
32. Dubey, R.; Shami, T. C.; Bhasker Rao, K. U. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Scine Journal* [Online] 2009, No. 1, 82–95.
33. Scholz, M.; Reske, T.; Böhmer, F.; Hornung, A.; Grabow, N.; Lang, H. In vitro chlorhexidine release from alginate based microbeads for periodontal therapy. *PLoS ONE* [Online] 2017, 12 (10), e0185562. DOI: 10.1371/journal.pone.0185562.
34. Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science* 2012, 37 (1), 106–126. DOI: 10.1016/j.prog-polymsci.2011.06.003.
35. Fu, S.; Thacker, A.; Sperger, D. M.; Boni, R. L.; Buckner, I. S.; Velankar, S.; Munson, E. J.; Block, L. H. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *AAPS PharmSciTech* [Online] 2011, 12 (2), 453–460. DOI: 10.1208/s12249-011-9587-0.
36. Blumenthal, R. S. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. *American heart journal* [Online] 2000, 139 (4), 577–583. DOI: 10.1016/S0002-8703(00)90033-4.
37. Arca, M. Atorvastatin. *Drugs* [Online] 2007, 67 (1), 63–69. <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200767001-00007>. DOI: 10.2165/00003495-200767001-00007.
38. Davidson, M. H. Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors: treatment and trust. *Drugs* [Online] 2001, 61 (2), 197–206. DOI: 10.2165/00003495-200161020-00005.

39. Rassi, S. F. Chemically modified carbon paste ion-selective electrodes for determination of atorvastatin calcium in pharmaceutical preparations. *Analytical Chemistry Research [Online]* 2017, 12, 65–73. DOI: 10.1016/j.ancr.2017.06.001.
40. Özdoğan, A. I.; İlarıslan, Y. D.; Kösemehmetoğlu, K.; Akca, G.; Kutlu, H. B.; Comerđov, E.; İskit, A. B.; Şenel, S. In vivo evaluation of chitosan based local delivery systems for atorvastatin in treatment of periodontitis. *International Journal of Pharmaceutics [Online]* 2018, 550 (1-2), 470–476. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.058.
41. Shah, S. R.; Werlang, C. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G. Novel applications of statins for bone regeneration. *National science review [Online]* 2015, 2 (1), 85–99. DOI: 10.1093/nsr/nwu028.
42. Wüstenberg, T. *Cellulose und Cellulosederivate. Grundlagen, Wirkungen und Applikationen*, 1. Aufl.; Behr: Hamburg, 2013. p. 92.
43. Brady, J.; Dürig, T.; Lee, P. I.; Li, J.-X. Polymer Properties and Characterization. *Developing Solid Oral Dosage Forms*; Elsevier, 2017; pp 181–223. DOI: 10.1016/B978-0-12-802447-8.00007-8.
44. Kumar, A. *Supermacroporous Cryogels*; CRC Press, 2016. DOI: 10.1201/b19676.
45. Pytko-Polończyk, J.; Jakubik, A.; Przeklasa-Bierowiec, A.; Muszyńska, B. Artificial saliva and its use in biological experiments. *Journal of Physiology and Pharmacology [Online]* 2017, 68 (6). <https://ruj.uj.edu.pl/xmlui/handle/item/142909>.
46. Forristal, I. The chemistry of α , β -unsaturated sulfoxides and sulfones: an update. *Journal of Sulfur Chemistry [Online]* 2005, 26 (2), 163–185. DOI: 10.1080/17415990500100115.
47. Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J. Vinyl sulfones: synthetic preparations and medicinal chemistry applications. *Medicinal research reviews [Online]* 2006, 26 (6), 793–814. DOI: 10.1002/med.20074.
48. Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Muñoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Organic & biomolecular chemistry [Online]* 2010, 8 (3), 667–675. DOI: 10.1039/B920576D.
49. Lai, J.-Y. Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid. *Carbohydrate polymers [Online]* 2014, 101, 203–212. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.060.

50. Kim, J.-T.; Lee, D.-Y.; Kim, Y.-H.; Lee, I.-K.; Song, Y.-S. Effect of pH on Swelling Property of Hyaluronic Acid Hydrogels for Smart Drug Delivery Systems. *Journal of Sensor Science and Technology [Online]* 2012, 21 (4), 256–262. DOI: 10.5369/JSST.2012.21.4.256.
51. Shimojo, A. A. M.; Pires, A. M. B.; Lichy, R.; Santana, M. H. A. The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society [Online]* 2015.
52. Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *American Association for the Advancement of Science [Online]*, Sep 28, 1990. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2218494> (accessed February 16, 2025).
53. Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science [Online]* 1981, 9 (3), 211–227. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738800802653>. DOI: 10.1016/S0376-7388(00)80265-3.
54. HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of pharmaceutical sciences [Online]* 1961, 50, 874–875. DOI: 10.1002/jps.2600501018.
55. Hixson, A. W.; Crowell, J. H. Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. *Ind. Eng. Chem. [Online]* 1931, 23 (8), 923–931. DOI: 10.1021/IE50260A018.
56. Mircioiu, C.; Voicu, V.; Anuta, V.; Tudose, A.; Celia, C.; Paolino, D.; Fresta, M.; Sandulovici, R.; Mircioiu, I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2019, 11 (3). DOI: 10.3390/pharmaceutics11030140.
57. Langer, R.; Peppas, N. Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C [Online]* 1983, 23 (1), 61–126. DOI: 10.1080/07366578308079439.
58. Wilmers, J.; Bargmann, S. Simulation of non-classical diffusion in polymers. *Heat Mass Transfer [Online]* 2014, 50 (11), 1543–1552. DOI: 10.1007/s00231-014-1365-6.
59. Magdalena Zięba; Paweł Chaber; Khadar Duale; Magdalena Martinka Maksymiak; Maciej Basczok; Marek Kowalczuk; Grazyna Adamus. Polymeric

- Carriers for Delivery Systems in the Treatment of Chronic Periodontal Disease. *Polymers [Online]* 2020, 12 (7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407295/>. DOI: 10.3390/polym12071574.
60. Al Shayeb, K. N. A.; Turner, W.; Gillam, D. G. Periodontal probing: a review. *Primary dental journal [Online]* 2014, 3 (3), 25–29. DOI: 10.1308/205016814812736619.
61. Yun, Y. H.; Lee, B. K.; Park, K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *Journal of Controlled Release [Online]* 2015, 219, 2–7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915301747>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.005.
62. Jain, N.; Jain, G. K.; Javed, S.; Iqbal, Z.; Talegaonkar, S.; Ahmad, F. J.; Khar, R. K. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug discovery today [Online]* 2008, 13 (21-22), 932–943. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.07.010.
63. Goodson, J. M.; Offenbacher, S.; Farr, D. H.; Hogan, P. E. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *Journal of Periodontology [Online]* 1985, 56 (5), 265–272. DOI: 10.1902/jop.1985.56.5.265.
64. Soskolne, W. A. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists [Online]* 1997, 8 (2), 164–174. DOI: 10.1177/10454411970080020501.
65. H R, R.; Dhamecha, D.; Jagwani, S.; Rao, M.; Jadhav, K.; Shaikh, S.; Puzhankara, L.; Jalalpure, S. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society [Online]* 2019, 307, 393–409. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.06.038.
66. Sharpe, L. A.; Daily, A. M.; Horava, S. D.; Peppas, N. A. Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery. *Expert opinion on drug delivery [Online]* 2014, 11 (6), 901–915. DOI: 10.1517/17425247.2014.902047.
67. Mørch, Y. A.; Donati, I.; Strand, B. L.; Skjåk-Braek, G. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules [Online]* 2006, 7 (5), 1471–1480. DOI: 10.1021/bm060010d.
68. Aguero, L.; Alpdağtas, S.; İlhan, E.; Zaldivar-Silva, D.; Gunduz, O. Functional role of crosslinking in alginate scaffold for drug delivery and tissue engineering: A review. *European Polymer Journal [Online]* 2021, 160 (30), 110807. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110807.

69. Ragimov, R. M.; Zakaev, C. T.; Abdullaeva, N. M.; Esiev, R. K.; Pushkin, S. V.; Nauruzova, D. M.; Balaeva, M. B.; Povetkin, S. N. Analysis of effectiveness of the use of multifunctional biopolymers of chitosan and alginate in dentistry. *J Adv Pharm Educ Res [Online]* 2022, 12 (3), 21–27. DOI: 10.51847/yWRLcwYTDC.
70. Lin, G. S. S.; Cher, C. Y.; Goh, Y. H.; Chan, D. Z. K.; Karobari, M. I.; Lai, J. C. H.; Noorani, T. Y. An Insight into the Role of Marine Biopolymer Alginate in Endodontics: A Review. *Marine drugs* 2022, 20 (8). DOI: 10.3390/md20080539.
71. Fernandes, G.; Wang, C.; Yuan, X.; Liu, Z.; Dziak, R.; Yang, S. Combination of Controlled Release Platelet-Rich Plasma Alginate Beads and Bone Morphogenetic Protein-2 Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration. *Journal of Periodontology [Online]* 2016, 87 (4), 470–480. DOI: 10.1902/jop.2016.150487.
72. Kaigler, D.; Silva, E. A.; Mooney, D. J. Guided bone regeneration using injectable vascular endothelial growth factor delivery gel. *Journal of Periodontology [Online]* 2013, 84 (2), 230–238. DOI: 10.1902/jop.2012.110684.
73. Sands, R. W.; Verbeke, C. S.; Ouhara, K.; Silva, E. A.; Hsiong, S.; Kawai, T.; Mooney, D. Tuning cytokines enriches dendritic cells and regulatory T cells in the periodontium. *Journal of Periodontology [Online]* 2020, 91 (11), 1475–1485. DOI: 10.1002/JPER.19-0411.
74. Chen, L.; Shen, R.; Komasa, S.; Xue, Y.; Jin, B.; Hou, Y.; Okazaki, J.; Gao, J. Drug-Loadable Calcium Alginate Hydrogel System for Use in Oral Bone Tissue Repair. *International Journal of Molecular Sciences [Online]* 2017, 18 (5), 989. <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/989>. DOI: 10.3390/ijms18050989.
75. Chen, X.; Wu, G.; Feng, Z.; Dong, Y.; Zhou, W.; Li, B.; Bai, S.; Zhao, Y. Advanced biomaterials and their potential applications in the treatment of periodontal disease. *Critical reviews in biotechnology [Online]* 2016, 36 (4), 760–775. DOI: 10.3109/07388551.2015.1035693.
76. Lopes, M.; Abrahim, B.; Veiga, F.; Seíça, R.; Cabral, L. M.; Arnaud, P.; Andrade, J. C.; Ribeiro, A. J. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. *Expert opinion on drug delivery [Online]* 2017, 14 (6), 769–782. DOI: 10.1080/17425247.2016.1214564.
77. Campos, E.; Branquinho, J.; Carreira, A. S.; Carvalho, A.; Coimbra, P.; Ferreira, P.; Gil, M. H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal [Online]* 2013, 49 (8), 2005–

2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305713002255>. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.04.033.
78. Łętocha, A.; Miastkowska, M.; Sikora, E. Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers* 2022, 14 (18). DOI: 10.3390/polym14183834.
79. Dalmoro, A.; d'Amore, M.; Barba, A. A. Droplet size prediction in the production of drug delivery microsystems by ultrasonic atomization. *Translational Medicine @ UniSa [Online]* 2013, 7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24251250/>.
80. Poncelet, D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Annals of the New York Academy of Sciences [Online]* 2001, 944, 74–82.
81. Patel, M. K.; Praveen, B.; Sahoo, H. K.; Patel, B.; Kumar, A.; Singh, M.; Nayak, M. K.; Rajan, P. An advance air-induced air-assisted electrostatic nozzle with enhanced performance. *Computers and Electronics in Agriculture [Online]* 2017, 135, 280–288. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816991631122X>. DOI: 10.1016/j.compag.2017.02.010.
82. Zhang, C.; Grossier, R.; Candoni, N.; Veessler, S. Preparation of alginate hydrogel microparticles by gelation introducing cross-linkers using droplet-based microfluidics: a review of methods. *Biomater Res [Online]* 2021, 25 (1), 41. https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-021-00243-5?utm_source=chatgpt.com#Sec5. DOI: 10.1186/s40824-021-00243-5.
83. Dalmoro, A.; Barba, A. A.; Lamberti, G.; d'Amore, M. Intensifying the microencapsulation process: ultrasonic atomization as an innovative approach. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V [Online]* 2012, 80 (3), 471–477. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641112000070>. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.01.006.
84. Naidu, H.; Kahraman, O.; Feng, H. Novel applications of ultrasonic atomization in the manufacturing of fine chemicals, pharmaceuticals, and medical devices. *Ultrasonics Sonochemistry [Online]* 2022, 86, 105984. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417722000773>. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2022.105984.
85. Cascone, S.; Lamberti, G.; Titomanlio, G.; Barba, A. A.; d'Amore, M. Microencapsulation effectiveness of small active molecules in biopolymer by ultrasonic atomization technique. *Drug development and industrial pharmacy [Online]* 2012, 38 (12), 1486–1493. DOI: 10.3109/03639045.2011.653814.

86. Barba, A. A.; d'Amore, M.; Cascone, S.; Lamberti, G.; Titomanlio, G. Intensification of biopolymeric microparticles production by ultrasonic assisted atomization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification [Online]* 2009, 48 (10), 1477–1483. DOI: 10.1016/j.cep.2009.08.004.
87. Leong, J.-Y.; Lam, W.-H.; Ho, K.-W.; Voo, W.-P.; Lee, M. F.-X.; Lim, H.-P.; Lim, S.-L.; Tey, B.-T.; Poncelet, D.; Chan, E.-S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology [Online]* 2016, 24 (5), 44–60. DOI: 10.1016/j.partic.2015.09.004.
88. Oyaas, J.; Storror, I.; Svendsen, H.; Levine, D. W. The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering [Online]* 1995, 47 (4), 492–500. DOI: 10.1002/bit.260470411.
89. Garbayo, I.; León, R.; Vilchez, C. Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [Online]* 2002, 25 (1), 1–9. DOI: 10.1016/S0927-7765(01)00287-9.
90. Tanaka, H.; Matsumura, M.; Veliky, I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering [Online]* 1984, 26 (1), 53–58. DOI: 10.1002/bit.260260111.
91. Dewangan, H. K.; Sharma, A.; Mishra, A.; Singour, P. Mucoadhesive Microspheres of Atorvastatin Calcium: Rational Design, Evaluation and Enhancement of Bioavailability. *IJPER [Online]* 2021, 55 (3s), S733-S741. <http://dx.doi.org/10.5530/ijper.55.3s.180>. DOI: 10.5530/ijper.55.3s.180.
92. Pradeep, A. R.; Kumari, M.; Rao, N. S.; Martande, S. S.; Naik, S. B. Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2% atorvastatin in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology [Online]* 2013, 84 (7), 871–879. DOI: 10.1902/jop.2012.120393.
93. Kumari, M.; Martande, S. S.; Pradeep, A. R.; Naik, S. B. Efficacy of Subgingivally Delivered 1.2% Atorvastatin in the Treatment of Chronic Periodontitis in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology [Online]* 2016, 87 (11), 1278–1285. DOI: 10.1902/jop.2016.130227.
94. Pradeep, A. R.; Kanoriya, D.; Singhal, S.; Garg, V.; Manohar, B.; Chatterjee, A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 1% alendronate versus 1.2% atorvastatin gel in treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of investigative and clinical dentistry* 2017, 8 (3). DOI: 10.1111/jicd.12215.

95. Ahmed, M. G.; Choudhari, R.; Acharya, A. Formulation and Evaluation of In situ Gel of Atorvastatin for the Treatment of Periodontitis. *RGUHS J Pharm Sci [Online]* 2015, 5 (2), 53–60. DOI: 10.5530/rjps.2015.2.4.
96. Rahimi, M.; Noruzi, E. B.; Sheykhsaran, E.; Ebadi, B.; Kariminezhad, Z.; Molaparast, M.; Mehrabani, M. G.; Mehramouz, B.; Yousefi, M.; Ahmadi, R.; Yousefi, B.; Ganbarov, K.; Kamounah, F. S.; Shafiei-Irannejad, V.; Kafil, H. S. *Carbohydrate polymer-based silver nanocomposites: Recent progress in the antimicrobial wound dressings* 231, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115696.
97. Reddy and Nagabhushanam. Preparation of gastro retentive mucoadhesive beads for atorvastatin by using ionic gelation method with divalence and tri-valence curing agents and their characterization studies. *IJPSR* 2019, 10 (1). DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).157-79.
98. Ma, J.; Lin, Y.; Chen, X.; Zhao, B.; Zhang, J. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. *Food Hydrocolloids [Online]* 2014, 38, 119–128. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.016.
99. Fu, S.; Thacker, A.; Sperger, D. M.; Boni, R. L.; Buckner, I. S.; Velankar, S.; Munson, E. J.; Block, L. H. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *AAPS PharmSciTech [Online]* 2011, 12 (2), 453–460. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21437788/>. DOI: 10.1208/s12249-011-9587-0.
100. Mackin-Mohamou, A.-R. S.; Budzinski, J.; Bastogne, T.; Roques-Carmes, T.; Sadtler, V.; Marchal, P.; Sapin-Minet, A.; Parent, M. Agile quality-by-design development of alginate microparticles for encapsulation of hydrophilic drug. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [Online]* 2024, 693, 134053. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2024.134053.
101. Rajinikanth, P. S.; Sankar, C.; Mishra, B. Sodium alginate microspheres of metoprolol tartrate for intranasal systemic delivery: development and evaluation. *Drug delivery [Online]* 2003, 10 (1), 21–28. DOI: 10.1080/713840323.
102. Olukman, M.; Şanlı, O.; Solak, E. K. Release of Anticancer Drug 5-Fluorouracil from Different Ionically Crosslinked Alginate Beads. *JBNB [Online]* 2012, 03 (04), 469–479. DOI: 10.4236/jbnb.2012.34048.
103. Yang, J.-S.; Xie, Y.-J.; He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate polymers [Online]* 2011, 84 (1), 33–39. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.11.048.

104. Mignon, A.; Belie, N. de; Dubruel, P.; van Vlierberghe, S. Superabsorbent polymers: A review on the characteristics and applications of synthetic, polysaccharide-based, semi-synthetic and 'smart' derivatives. *European Polymer Journal [Online]* 2019, 117 (21), 165–178. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.04.054.
105. Ibrahim, S.; Kang, Q. K.; Ramamurthi, A. The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A [Online]* 2010, 94 (2), 355–370. DOI: 10.1002/jbm.a.32704.
106. Oh, E. J.; Kang, S.-W.; Kim, B.-S.; Jiang, G.; Cho, I. H.; Hahn, S. K. Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. *Journal of biomedical materials research. Part A [Online]* 2008, 86 (3), 685–693. DOI: 10.1002/jbm.a.31681.
107. Sannino, A.; Madaghiele, M.; Conversano, F.; Mele, G.; Maffezzoli, A.; Netti, P. A.; Ambrosio, L.; Nicolais, L. Cellulose derivative-hyaluronic acid-based microporous hydrogels cross-linked through divinyl sulfone (DVS) to modulate equilibrium sorption capacity and network stability. *Biomacromolecules [Online]* 2004, 5 (1), 92–96. DOI: 10.1021/bm0341881.
108. Lai, J.-Y. Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid. *Carbohydrate polymers [Online]* 2014, 101, 203–212. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713009521>. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.060.
109. Yu, Y.; Chau, Y. One-step "click" method for generating vinyl sulfone groups on hydroxyl-containing water-soluble polymers. *Biomacromolecules [Online]* 2012, 13 (3), 937–942. DOI: 10.1021/bm2014476.
110. Oryan, A.; Kamali, A.; Moshiri, A. Potential mechanisms and applications of statins on osteogenesis: Current modalities, conflicts and future directions. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society [Online]* 2015, 215, 12–24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915300341>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.07.022.
111. Miranda-Filho, F. V. de; Barbosa, S.; Panigali, O. A.; Silva, M. C.; Da Costa, M. G.; Da Flores, F. S.; Ervolino, E.; Theodoro, L. H.; Magro-Filho, O.; Faverani, L. P. Effect of local and systemic administration of atorvastatin for improving bone healing on critical defects. *Brazilian dental journal [Online]* 2024, 35, e246114. DOI: 10.1590/0103-6440202406114.
112. Shahrezaee, M.; Oryan, A.; Bastami, F.; Hosseinpour, S.; Shahrezaee, M. H.; Kamali, A. Comparative impact of systemic delivery of atorvastatin,

- simvastatin, and lovastatin on bone mineral density of the ovariectomized rats. *Endocrine [Online]* 2018, 60 (1), 138–150. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12020-018-1531-6>. DOI: 10.1007/s12020-018-1531-6.
113. Arifin, D. Y.; Lee, L. Y.; Wang, C.-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews [Online]* 2006, 58 (12-13), 1274–1325. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.007.
114. Bajpai, S. K.; Sharma, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers [Online]* 2004, 59 (2), 129–140. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002.
115. Dakshayani B; Thamilselvi D; Hannah Rosaline; Kandaswamy D. Evaluation of pH of Gingival Crevicular Fluid as a Local Factor in Etiology of Cervical Lesions. *International Journal of Dental Sciences and Research [Online]* 2020, 8 (4), 95–97. <http://pubs.sciepub.com/ijdsr/8/4/3/index.html>. DOI: 10.12691/ijdsr-8-4-3.
116. Schwendicke, F.; Krois, J.; Kocher, T.; Hoffmann, T.; Micheelis, W.; Jordan, R. A. More teeth in more elderly: Periodontal treatment needs in Germany 1997-2030. *J Clinic Periodontology [Online]* 2018, 45 (12), 1400–1407. DOI: 10.1111/jcpe.13020.