

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2021-369

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.08.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.02.2023**
(Věstník č. 7/2023)

- (71) Přihlašovatel:
CB21 Pharma, s.r.o., Brno, Bohunice, CZ
- (72) Původce:
Ing. Jan Storch, Ph.D., Praha 10, Strašnice, CZ
prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D., Olomouc, Nová Ulice,
CZ
Ing. Lenka Průšová, Kladno, Kročehlavy, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
Léčivý přípravek ve formě zubního gelu

- (57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje léčivý přípravek pro dentální použití, který obsahuje účinnou složku kanabidiol a rozpouštědlo skvalan, přičemž přípravek je ve formě zubního gelu. Přípravek může dále obsahovat účinnou složku kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl. Přípravek je určen pro léčbu a/nebo prevenci chronického zánětu gingivy a/nebo parodontitidy.

Léčivý přípravek ve formě zubního gelu

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká léčivého přípravku ve formě zubního gelu, vhodného zejména pro podpůrnou terapii hojení chronického zánětu gingivy a parodontu.

10 Dosavadní stav techniky

Zvýšená tvorba zubního plaku a jeho kalcifikace vede k tvorbě supra/sub-gingiválního zubního kamene. Akumulací zubního kamene dochází k narušení dentogingiválního uzávěru, což je příčinou nebakteriálního zánětu gingivy (gingivitidy). U jedince s oslabenou imunitní ochranou, vrozenou genovou dispozicí, psychickými problémy nebo špatně prováděnou ústní hygienou dochází k narušení orální ekologie a změnám ve složení ústní mikroflóry a osídlení gingivy parodontopatogenními anaerobními bakteriemi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola* a fakultativně anaerobními bakteriemi *Streptococcus oralis*, *S. mitis*, *S. sanguis* a *S. mutans*. Virulentní a prozánětlivé faktory těchto bakterií aktivují makrofágy a neutrofil/leukocyty, klíčové buňky imunitního systému tkáně dutiny ústní, k masivní produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Pandit N, Changela R, Bali D, Tikoo P, Gugnani S. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. J Int Clin Dent Res Organ 2015;7:51-8). Zánětlivý proces, vyvolaný periopatogeny, ničí jak tyto bakterie, tak působí destrukci tkáně parodontu, zejména fibroblastů parodontálních ligament, cementoblastů dentinu a osteoblastů alveolární kosti. Toto stadium zánětu a onemocnění gingivy je klasifikováno jako akutní nebo chronická parodontitida (Kinane DF, Mobelli A. Periodontal disease. *Frontiers of oral biology* Vol. 15. S. Karger AG, Basel 2012, ISBN 978-3-8055-9833-0).

30 Gingivitida resp. parodontitida je zdravotním problémem, který se týká 20 až 50 % světové populace (Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sciences* 2016;1:1-9). Přípravky ústní hygieny (zubní pasty, gely a ústní vody) by měly obsahovat syntetické nebo přírodní látky s účinky na zpomalení tvorby bakteriálního biofilmu a následnou kalcifikaci zubního plaku, mít protizánětlivý a hojivý účinek na gingivu, bakteriostatický nebo baktericidní účinek na patogenní bakterie s malým vlivem na komenzální bakterie ústní mikroflóry. Použití takových přípravků v denně prováděné ústní hygieně může významně snížit riziko nebo průběh onemocnění parodontu (závěsného aparátu zubu, dentinu a kosti zubního lůžka) (Pihstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. *Periodontal diseases*. *Lancet* 2005;366:1809-1820).

40

K chemoprophylaxi dutiny ústní jsou v kosmetických/zdravotních přípravcích aktivními komponentami anorganické soli jako např. fluorid sodný, chlorid/síran zinečnatý, fluorid cínatý nebo laktát hlinitý. Ze syntetických organických sloučenin to jsou aminfluorid, cetylpyridinium chlorid, hexetidín a problematický triklosan. Nejčastěji zastoupeným chemoprophylaktikem v přípravcích ústní hygieny, používaným jak pacienty, tak zubními lékaři, je chlorhexidin a jeho soli chlorhexidin glukonát nebo diglukonát (Shapiro S, Guggenheim B, Chemoprophylaxis in the oral cavity: „plus on change les choses, plus elles devraient rester les memes“ v *Oral Biology at the Turn of the Century*. (Edits. Guggenheim B, Shapiro S) S. Karger AG. Str. 226-238. Zurich 1998). Chlorhexidin patří k silným („hard“) chemoprophylaktikům, která působí proti širokému spektru gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, kvasinkám, některým plísním a virům. Jeho aplikace ve formě gelu (1%) může být doprovázena řadou nežádoucích účinků, jako jsou zvýšená tvorba zubního kamene, hyperkeratóza chuťových buněk jazyka, deskvamace epidermis ústní sliznice a zbarvení zubní skloviny (James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, Whelton H, Riley P. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival

health. Cochrane Database of Systematic Reviews 2017, Issue 3. Art. No.: CD008676. DOI: 10.1002/14651858.CD008676.pub2.).

- 5 Častou složkou v prostředcích ústní hygieny jsou komplexní extrakty léčivých rostlin nebo jednotlivá fytoceutika s protizánětlivými účinky, antimikrobiálními účinky vůči gram-pozitivním a/nebo gram-negativním bakteriím a antiadherenčním účinkem na tvorbu bakteriálního biofilmu na sliznici a pevných strukturách v dutině ústní (Groppo FC, Bregamaschi CdeCC, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, de Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res.* 2008;22:993-998.; Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and diseases: A review. *J Dentistry* 2009;37:413-423; Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by the green tea catechins. *Carries Res.* 2006;40:265-270; Feghali K, Feldman M, Vu Dang La, Santos J, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins: Natural Weapons against periodontal diseases. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 5728-35.).
- 10
- 15 Fytoceutikem, o kterém je dosud málo klinických údajů o jeho účinku na gingivu a parodont je kanabidiol (CBD), nepsychotropní majoritní sloučenina komplexního extraktu rostlin rodu *Cannabis*. CBD je agonista CB2 receptoru endokanabinoidního systému, který po aktivaci tlumí tvorbu prozánětlivých cyto- a chemokinů, makrofágů a neutrofilů/leukocytů slizničního imunitního systému (Gu Z, Singh S, Niyogi RG, Lamont GJ, Wang H, Lamont RJ, Scott DA. Marijuana-Derived Cannabinoids Trigger a CB2/PI3K Axis of Suppression of the Innate Response to Oral Pathogens, *Front Immunol* 2019; 10: Article 2288). Protizánětlivé působení CBD na měkké tkáně modulací imunitní odpovědi může být prospěšné pro pacienty po stomatochirurgickém zásahu nebo u pacientů s parodontologickými problémy či na snížení resorpce alveolární kostní tkáně. V nedávné době bylo prokázáno, že CBD snižuje u *P. gingivalis* tvorbu membránových váčků, inhibuje komunikaci mezi bakteriemi a tím tvorbu biofilmu s komenzálními bakteriemi hostitele (Kosgodage US, Matewele P, Awamaria B, Kraev I, Warde P, Mastroianni G, Nunn AV, Guy GW, Bell JD, Inal JM, Lange S. Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9: Article 324).
- 20
- 25
- 30 Na druhou stranu bylo nedávno pozorováno, že zdravotním problémem pro měkké tkáně parodontu je užívání konopí a konopných přípravků, které obsahují CBD, nebo jeho kombinaci s Δ^9 -THC. Je prokázáno, že CBD způsobuje edém gingivy, stomatitidy a uvulitidu (a. Rawal SY, Tatakis DN, Tipton DA. Periodontal and oral manifestations of marijuana use. *J Tenn Dent Assoc* 2012;92:26-31, b. Park JB, Jung KM, Piomelli D, J. *Periodontal Implant. Sci.* 2020, 50, 355). CBD je také toxický pro některé bakterie v dutině ústní, čímž dochází k narušení orální ekologie a změnám ve složení ústní mikroflóry a osídlení gingivy parodontopatogenními anaerobními bakteriemi a fakultativně anaerobními bakteriemi. Protizánětlivý efekt CBD dále utlumí imunitní odpověď organismu proti těmto patogenům. Následkem toho dochází k neřízenému rozvoji zánětlivého procesu, či progresi již existujícího.
- 35
- 40

Podstata vynálezu

- 45 Předmětem předkládaného vynálezu je léčivý přípravek pro dentální použití, který obsahuje účinnou složku sestávající z kanabidiolu (CBD) a pomocné látky skvalanu. Skvalan má v přípravku nezastupitelnou roli, která se projevuje v efektivním prostupu CBD skrz sliznici/pokožku, čímž je umožněno jeho vstřebávání do gingiválních fibroblastů. Tímto mechanismem je snížena jeho koncentrace na povrchu dásně a výsledkem je významná redukce negativních účinků kanabidiolu na složení ústní mikroflóry. Tento přípravek je s výhodou ve formě zubního gelu.
- 50
- Ve výhodném provedení je součástí účinné složky také kyselina hyaluronová nebo její farmaceuticky přijatelná sůl. Funkcí kyseliny hyaluronové je snižovat cytotoxicitu kanabidiolu. Tím lze navýšit jeho koncentraci ve finálním preparátu až o dva řády, v porovnání s IC_{50} hodnotami pro lidské gingivální fibroblasty.
- 55

Léčivý přípravek podle předkládaného vynálezu je vhodný pro uživatele/pacienty s chronickým zánětem gingivy nebo parodontitidou způsobenou sníženou imunitní ochranou organismu, vrozenou dispozicí a/nebo špatným životním stylem (dietou, alkoholem, kouřením, stresem). Příznivý farmakologický účinek gelu je kombinací účinků CBD a pomocné látky skvalanu, a s výhodou i kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, a projevuje se ve zpomalení tvorby plaku, krvácivosti gingivy, hojení parodontálních chobotů a snížení (modulaci) počtu přítomných druhů parodontopatogenních bakterií subgingivální mikroflóry. V měkkých a tvrdých tkáních dutiny ústní má účinná složka regulační funkci v zánětlivé odpovědi organismu vyvolané mechanicky nebo parodontopatogenními bakteriemi.

Přípravek nevykazuje žádné nežádoucí vedlejší účinky a je vhodný k dlouhodobé domácí chemoprophylaktické terapii doplňující odborná ošetření parodontologem. Vzhledem k přítomnosti velmi nízkého obsahu chlorhexidinu či jeho derivátů, pouze pro účely konzervace, nevykazuje přípravek nežádoucí účinky, které jsou s touto látkou spojené. Chlorhexidin a jeho deriváty jsou schváleny jako konzervační látky v kosmetických přípravcích do zastoupení 0,3 % hmotn. Výsledkem komplexního účinku jedné nebo obou aktivních komponent a skvalanu je významné zlepšení průběhu/oddálení návratu zánětu gingivy a parodontu.

S výhodou jsou kanabidiol a kyselina hyaluronová nebo její farmaceuticky přijatelná sůl přítomny v poměru 20:1 až 1:1, výhodněji 20:1 až 5:1, ještě výhodněji 15:1 až 8:1.

Léčivý přípravek podle vynálezu může s výhodou obsahovat 0,1 až 5 % hmotn. kanabidiolu, výhodněji 0,5 až 2 % hmotn. kanabidiolu, a popřípadě do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu.

Léčivý přípravek podle vynálezu může ve výhodném provedení obsahovat 0,1 až 5 % hmotn. kanabidiolu, 0,01 až 2 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, a popřípadě do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu.

Výhodněji může léčivý přípravek obsahovat 0,5 až 2 % hmotn. kanabidiolu, 0,05 až 1 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Kyselina hyaluronová nebo její farmaceuticky přijatelná sůl má s výhodou nízkou až střední molekulovou hmotnost v rozmezí 200 až 1800 kDa.

Farmaceuticky přijatelnými solemi kyseliny hyaluronové jsou typicky sodná sůl a draselná sůl. Pro dentální gel je preferováno použití sodné soli kyseliny hyaluronové.

Dentální gel podle předkládaného vynálezu dále obsahuje alespoň jednu pomocnou látku. Pomocné látky zahrnují zejména gelující látky, rozpouštědla, vodu, stabilizátory a ochucovadla.

Gelující látkou může být například glycerin, polyethylen glykol, polymery na bázi akrylové kyseliny (carbomery), a směsi těchto gelujících látek.

Rozpouštědlem pro kanabidiol je skvalan. Skvalan je hydratující lipofilní látka, která dále napomáhá hojení a zklidnění dásní. Zároveň je skvalan vhodné rozpouštědlo pro kanabidiol a je vhodný pro jeho homogenizaci se zbytkem složek gelu. Skvalan dále snižuje jeho koncentraci na povrchu dásně. Poměr skvalanu ke kanabidiolu může s výhodou být v rozmezí 2:1 až 20:1, výhodněji do 10:1 nebo 3:1 až 5:1.

Léčivý přípravek podle vynálezu může obsahovat 0,1 až 5 % hmotn. kanabidiolu, 0,01 až 2 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, 1 až 10 % hmotn. skvalanu, 5 až 40 % hmotnostních gelujících látek, a vodu v množství do 100 % hmotn.

Přípravek může dále obsahovat do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu, s výhodou do 0,1 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu.

- 5 Výhodněji může léčivý přípravek obsahovat 0,5 až 2 % hmotn. kanabidiolu, 0,05 až 1 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, 3 až 8 % hmotn. skvalanu, 5 až 20 % hmotnostních gelujících látek, a vodu v množství do 100 % hmotn.

Objasnění výkresů

10

Obr. 1. Cytotoxicita CBD vyjádřená jako procenta kontroly stanovená metodou MTT na modelu lidských gingiválních fibroblastů ($n = 6$) – Příklad 2.

15

Obr. 2. Produkce IL-6 po 6/24 hodinové aplikaci CBD na lidských gingiválních fibroblastech – Příklad 2.

Obr. 3. Produkce IL-8 po 6/24 hodinové aplikaci CBD na lidských gingiválních fibroblastech – Příklad 2.

20

Obr. 4. Produkce MMP-2 po 6/24 hodinové aplikaci CBD na lidských gingiválních fibroblastech – Příklad 2.

25

Obr. 5. Nárůst koncentrace CBD pozorovaný v lyzátech lidských gingiválních fibroblastů po jejich 6 h a 24 h inkubaci s 0,5 μ M CBD. Stanoveno metodou UHPLC/MS. CBD nebyl v kultivačním médiu detegován – Příklad 5.

30

Obr. 6. Permeace CBD ze zubních gelů s obsahem lipofilní složky (2. a 3. sloupec) a bez lipofilní složky (1. sloupec) skrz syntetickou lidskou kůži Strat-M[®] po 24 h. Stanoveno metodou UHPLC/MS – Příklad 6.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. Složení a příprava zubního gelu

35

Složka	hm. %
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Skvalan	4,00
Kanabidiol	1,00
Hyaluronát sodný	0,10
Chlorhexidin diglukonát	0,02
Čištěná voda	84,38

1. Postup přípravy zubního gelu: V části vody (cca 10 % z celkového množství vody) se rozpustí hyaluronát sodný, vznikne transparentní roztok.

40

2. Ve zbylém množství vody se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.

3. Do suspenze z bodu 2. se přidá glycerin, chlorhexidin diglukonát a roztok z bodu 1, směs se promíchá.

4. Triethylaminem se adjustuje pH směsi získané v bodě 3. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.

5. Ve skvalanu se rozpustí CBD záhřevem na max. 60 °C.

6. Rozpuštěné CBD ve skvalanu se nalije do gelu (viz bod 4.) a směs se promíchá.

7. Pro dokonalou dispergaci CBD v gelu lze doporučit homogenizaci při otáčkách min 3000 minutu – cca 15 sekund.

Příklad 2. Výsledky testování kanabidiolu na lidských gingiválních fibroblastech.

In vitro studii účinku kanabidiolu (CBD) byly použity lidské gingivální fibroblasty (HGF) izolované z gingivy odebrané dobrovolníkům na Klinice ústní, čelistní a obličejové chirurgie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc schválené Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc (2019). V první fázi experimentu byla stanovena bezpečná koncentrace CBD na základě výsledků z měření MTT, což je test sledující redukci 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na odpovídající formazan. Test byl prováděn podle M.D. Maines, L.G. Costa, D.J. Reed, et al. Current protocols in toxicology. New York: John Wiley & Sons. (1998). Výsledky testu jsou znázorněny na Obrázku 1.

K buňkám vyšetým na 96-ti jamkové desce v koncentraci 3×10^4 buněk/ml a 100 μ l/jamku, které byly ponechány 24 h adherovat a po následné 24 h inkubaci s CBD v koncentračním rozmezí 25 až 0,78 μ mol/l se přidalo 100 μ l MTT (0,5 mg/mL v kultivačním médiu bez séra) směs na dobu 2 h. Po uplynutí inkubační doby a odsátí MTT směsi byl přidáno 100 μ l DMSO (dimethylsulfoxidu) s NH₃ (1%, v/v). Absorbance byla změřena při 540 nm.

Dle hodnot MTT byly zvoleny dvě subtoxické koncentrace CBD (0,25 a 0,5 μ mol/l), které byly použity pro stanovení/ověření jeho protizánětlivého účinku. Zánět na HGF byl indukován lipopolysacharidem (LPS) *P. gingivalis* podle How K.Y., Song K.P., Chan K.G., Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line.

Front Microbiol 2016;7:53. HGF byly vysety na 6 ti jamkové desky nechány narůst pro dosažení konfluence. Buňky byly opláchnuty 1 ml PBS a poté byl přidán LPS (1 μ g/ml, 2 ml/jamku) v kultivačním médiu bez séra, který byl aplikován na 24 hod. Část buněk byla ponechána bez předchozí aplikace LPS. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno CBD do kultivačního média bez séra v koncentracích 0,25 a 0,5 μ mol/l (2 ml/jamku) na 6 a 24 hodin a to jak na buňky kultivované s LPS tak na buňky bez předchozí aplikace LPS (tj. bez indukovaného zánětu). V námi zvolených časových intervalech bylo kultivační médium odsáto a zamraženo na -80 °C pro další analýzu. V kultivačním médiu byla stanovena hladina prozánětlivých interleukinů IL-6, IL-8 (Human ELISA Development Kit, k.č. 900-K16 a 900-K18, PeproTech, Baria, Česká republika) a matrixové metaloproteinázy (MMP-2) (Duo Set ELISA Development System, k.č. DY902, R&D, Bio-Techne, UK) metodou ELISA. Zvolené parametry hrají hlavní úlohu při patologických procesech a plní významnou roli při onemocněních parodontu (Noh K.M., Jung M., Kim S.H., Lee S.R., Park K.H., Kim D.H., Kim H.H., Park Y.G. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. EXP Ther Med 2013; 6(3):847–851). První ze stanovovaných cytokinů IL-6, hraje úlohu při zánětlivé odpovědi. V případě přetrvávajícího zánětu dochází k zvýšení hladiny MMP-2, což výrazně přispívá k destrukci tkáně. Mediátor zánětu IL-8 působí také jako chemoatraktant. V experimentu po indukci zánětu LPS a následné aplikaci kanabidiolu byl zjištěn pokles hladiny IL-6 (obrázek 2) a IL-8 (obrázek 3). U stanovované hladiny MMP-2 nedocházelo k výraznějším změnám (obrázek 4). Závěrem lze říci, že naše experimenty

potvrdily protizánětlivý účinek obou dávek kanabidiolu, a to především/prokazatelně v delší časové perspektivě 24-h inkubace.

Příklad 3. Testování antimikrobiálních účinků kanabidiolu.

5

K testování byly vybrány kmeny *Streptococcus mutans* CCM 7409 a *Porphyromonas gingivalis* CCM 3985. Oba z České sbírky mikroorganismů (Brno). Ke kultivaci *S. mutans* bylo použito médium BHI+kh – Mozko-srdcová infuze (Oxoid, UK) obohacená s vitamínem K (0,001 mg/mL) a heminem (5 mg/mL) a pro *P. gingivalis* médium WCHA – Wilkins-Chalgren agar (HiMedia, India), se 7 % ovčích erytrocytů a vitamínem K (0,001 mg/mL).

10

Citlivost vybraných mikrobů k testovaným substancím byla ověřena mikrodiluční metodou dle Clinical and Laboratory Standards Institute (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 9th ed. CLSI standard M11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018). Pro lepší růst *P. gingivalis* bylo Brucella growth medium nahrazeno BHI+kh (Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliott AG, Zhang B, Ramu S, Amado M et al. The antimicrobial potential of cannabidiol. Commun Biol 2021;4(1):1–18).

15

Z testovaných látek byly ředěním v DMSO připraveny základní pracovní roztoky. Tyto pracovní roztoky jednotlivých látek pak byly dále ředěny médiem BHI+kh [Mozko-srdcová infuze (Oxoid, UK) obohacená vitamínem K (0,001 mg/mL) a heminem (5 mg/mL)] tak, aby podíl DMSO byl minimálně 1:100 a neinhiboval tak růst mikrobů. Sériovým ředěním, ředící faktor 1:2, pak byly připraveny požadované koncentrace jednotlivých substancí. 135 µL každého ředění bylo napipetováno do jamek 96 jamkové mikrotitrační desťičky z tvrzeného polystyrenu s kulatým dnem (Gamma České Budějovice, a.s.).

20

25

Z čerstvých kultur testovaných kmenů na Wilkins-Chalgren agaru (WCHA; HiMedia, India), se 7 % ovčích erytrocytů a vitamínem K, byly připraveny suspenze v BHI+kh o optické denzitě odpovídající 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice (po odečtení optické denzity média). Suspenze byly následně ředěny v poměru 1:15 (výsledná koncentrace inokula 5×10^6 CFU/mL). Jednotlivé jamky s 135 µL naředěnými substancemi i kontrolními jamkami byly inokulovány 15 µL připraveného inokula.

30

Inokulované mikrotitrační destičky byly inkubovány v Anaerobic Work Station (Ruskinn Technology, UK) s anaerobní atmosférou (80 % N₂, 10 % CO₂ and 10 % H₂) při teplotě 37 °C. Inkubace trvala v případě *P. gingivalis* 60 hod., v případě *S. mutans* 24 hod.

35

Sterilita média byla kontrolována přenesením 150 µL BHI+kh do tří jamek mikrotitrační destičky. Tři jamky na každé destičce obsahující pouze s 135 µL BHI+kh a 15 µL připraveného inokula sloužily jako kontrola růstu testovaného mikroba.

40

Po odečtu MIC byl obsah jamek s nejvyšší koncentrací příslušné substance a s viditelným mikrobiálním růstem vyočkován na WCHA. Stejně bylo vyočkován samotné inokulum. Po 48 hod. (*S. mutans*) či 14 dnech (*P. gingivalis*) inkubace v anaerobní atmosféře byla hodnocena čistota narostlé mikrobiální kultury. V případě kontaminace byl výsledek považovaný za nevalidní.

45

V jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky byl sledován růst mikroba, který se projevil zákalem média nebo jako sediment na dně jamky mikrotitrační destičky. Při inhibici růstu mikroba zůstalo médium čiré, bez viditelné sedimentace nebo zákalu. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena jako nejnižší koncentrace příslušné substance, při které nebyl pozorovaný růst mikroba. Stanovení MIC kanabidiolu bylo u obou testovaných mikrobů provedeno ve třech nezávislých experimentech, v každém se třemi opakováními.

50

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1.

55

Tabulka 1: Hodnoty minimální inhibiční koncentrace CBD pro *P. gingivalis* a *S. mutans*.

	<i>P. gingivalis</i>		<i>S. mutans</i>	
	MIC medián [μg/mL]	MIC rozsah [μg/mL]	MIC medián [μg/mL]	MIC rozsah [μg/mL]
CBD	1.5	1-2	16	16

- 5 **Příklad 4.** Výsledky z randomizované, dvojité zaslepené klinické zkoušky kontrolované placebem „Pilotní studie vlivu kanabidiolu na *parodontitis chronica*“ schválené Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého (2020).

Studie byla provedena se vzorky zubních gelů následujícího složení:

- 10 Zubní gel s účinnou látkou CBD a skvalanem:

Složka	% hmotn.
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Skvalan	4,00
Kanabidiol	1,00
Methylparaben sodný	0,15
Čištěná voda	84,35

Postup přípravy zubního gelu:

- 15 1. Ve vodě se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.
2. Do suspenze z bodu 1. se přidá glycerin a methylparaben sodný, směs se promíchá.
3. Triethylaminem se adjustuje pH směsi získané v bodě 2. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.
4. Ve skvalanu se rozpustí CBD záhřevem na max. 60 °C.
20 5. Rozpuštěné CBD ve skvalanu se nalije do gelu (viz bod 3.) a směs se promíchá.
6. Pro dokonalou dispergaci CBD v gelu lze doporučit homogenizaci při otáčkách min 3000 minutu – cca 15 sekund.

Placebo směs

25

Složka	% hmotn.
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Skvalan	4,00
Methylparaben sodný	0,15
Čištěná voda	85,35

Postup přípravy zubního gelu:

1. Ve vodě se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.
2. Do suspenze z bodu 1. se přidá glycerin a methylparaben sodný, směs se promíchá.
- 5 3. Triethylaminem se adjustuje pH směsi získané v bodě 2. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.
4. Skvalan se nalije do gelu a směs se promíchá.

Nábor pacientů a provedení studie: Po náboru pacientů (muži a ženy ve věku 35-65 let) následovalo několik návštěv. **1)** Při první návštěvě (0 den) byl pacientům, kteří splňují kritéria pro přijetí do studie, zhotoven set i.o. fotografií, proveden mikrobiologický odběr z parodontálního chobotu, odstraněn zubní kamen a plak a proveden výplach H₂O₂. Dále byl proveden odběr vzorku gingivy k histopatologickému vyšetření a proběhla hygienická instruktáž. **2)** Při druhé návštěvě (7. den) byla u pacienta proveden kontrola dodržování správné ústní hygieny, pořízen set i.o. fotografií a byl aplikován CBD gel (nebo identické placebo bez CBD) do chobotů a na gingivu (5 min. působení). Proběhlo předání zubních gelů obsahujících CBD nebo placebo přípravků. Pacient jimi substituoval svoji běžnou zubní hygienu po dobu studie. **3)** Při třetí návštěvě (37. den) byl pořízen set i.o. fotografií. V případě ukončení terapie byl proveden odběr vzorků gingivy k histopatologickému vyšetření. Byl proveden mikrobiologický odběr z parodontálního chobotu. **4)** Během poslední návštěvy byl pořízen set i.o. fotografií, byl proveden mikrobiologický odběr z parodontálního chobotu a odběr vzorku gingivy k histopatologickému vyšetření. Celková doba trvání studie byla stanovena na 67 dní.

25 **Vstupní kritéria:** **1)** diagnóza *parodontitis chronica*, **2)** věk 35-65 let, **3)** počet vlastních zubů 16 a více, **4)** podepsaný informovaný souhlas, **5)** bez fyzického nebo mentálního hendikepu.

30 **Vylučovací kritéria:** **1)** chronická onemocnění (diabetes mellitus, onkologické onemocnění), **2)** zvýšená krvácivost (medikace - antikoagulancia, antiagregancia, hemoragické diatézy), **3)** těhotné a kojící ženy, kuřáci, uživatel konopí či konopných produktů, **4)** ATB v posledních 3 měsících, **5)** paralelní účast na jiné klinické zkoušce, **6)** pacient se snímatelnou náhradou.

35 **Použité metody, vyšetřovací postupy a způsob zpracování výsledků:** V klinické studii byl hodnocen parodontální index dle Russella, index plaku (Silness a Loe), gingivální index (Loe a Silness, 1963), index krvácivosti gingivy (Ainamo a Bay, 1975), modifikovaný gingivální index (Lobene et al., 1986). Dále byl proveden mikrobiologický odběr z parodontálního chobotu pro vyšetření dle metodiky VariOr-Dento. Asi u 20 % subjektů byl standardně proveden odběr vzorku gingivy k histopatologickému vyšetření. Z neinvazivních vyšetření byl pořízen set i.o. fotografií.

40 Z výsledku vyplývá, že užívání CBD přípravku vedlo k významnému zlepšení parodontálních indexů (pacient **B**) ve srovnání s pacientem, který užíval přípravek (placebo) (pacient **A**), viz tabulka 2. Taktéž došlo u pacienta **B** k redukci počtu patogenních bakterií v dutině ústní; srovnaj tabulky 3 a 4.

45 **Tabulka 2:** Hodnoty parodontálních indexů u pacienta **A** užívající přípravek (placebo) a pacienta **B** užívajícího přípravek s obsahem CBD.

Pacient A	1. návštěva	5. návštěva	Hodnocení
Plakový index	1,24	1,04	Beze změny
Modifikovaný gingivální index	0,68	0,92	Beze změny
Index gingiválního krvácení	0,52	0,48	Beze změny
Gingivální index	1,32	1,40	Beze změny
Periodontální index	2,64	2,96	Beze změny

Pacient B	1. návštěva	5. návštěva	Hodnocení
Plakový index	0,72	0,83	Beze změny
Modifikovaný gingivální index	1,16	0,62	Změna ze střední formy zánětu na mírnou
Index gingiválního krvácení	0,60	0,33	Snížení krvácivosti o cca 50%
Gingivální index	1,48	1,04	Změna ze střední formy zánětu na mírnou
Periodontální index	5,92	5,83	Beze změny

Tabulka 3: Příklad osídlení parodontálních chobotů u pacienta A užívající přípravek (placebo) v odběru 1. (start studie) a 5. (ukončení studie) návštěvy. Bez zjevného zlepšení z hlediska osídlení patogenními bakteriemi.

1. návštěva:

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	+++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	+++
	<i>Treponema denticola</i>	Td	+++
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	--
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	+
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	+++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	+++
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	--
Rezistence k β -laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		Vysoké	

5. návštěva:

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	+++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	+++
	<i>Treponema denticola</i>	Td	++
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	--
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	+
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	+
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	+
Rezistence k β -laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		Vysoké	

Tabulka 4: Příklad osídlení parodontálních chobotů u pacienta B užívající přípravek (s obsahem CBD) v odběru 1. (start studie) a 5. (ukončení studie) návštěvy. S významnou redukcí počtu patogenních bakterií.

1. návštěva:

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	+++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	++
	<i>Treponema denticola</i>	Td	+
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	--
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	--
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	++
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	+++
Rezistence k β -laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěšného aparátu		Vysoké	

5. návštěva:

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	--
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	--
	<i>Treponema denticola</i>	Td	--
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	--
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	++
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	++
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	++
Rezistence k β -laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěšného aparátu		Střední	

Legenda:

- (--)
 - (+)
 - (++)
 - (+++)
- nedetekován, odpovídá počtu bakterií $<10^3$
slabě pozitivní, odpovídá počtu bakterií $10^3 - 10^4$
středně pozitivní, odpovídá počtu bakterií $10^4 - 10^5$
silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií $>10^5$

5

Příklad 5. Vstup CBD do gingiválních fibroblastů

Gingivální fibroblasty (izolované ze tří různých pacientů) byly vysety na 6-jamkové desce (plocha jamky 9,6 cm²) a nechány narůst do druhého dne (konfluence). Na buňky byl aplikován CBD v koncentraci 0,5 μ M po dobu 6 a 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby bylo 250 μ l média smícháno s 250 μ l methanolu s 1% HCl a buňky byly opláchnuty 2 \times PBS (1 ml), seškrábány ze 4 jamek do PBS (fosfátový pufr, 1 ml), centrifugovány 5 minut při 3000 ot/min. Po centrifugaci bylo odstraněno PBS a přidáno 0,5 ml methanolu s 1% (hm./hm.) HCl a buňky byly sonikovány (cyklus 0,5, amplituda 50, 10 krát). Poté byly vzorky centrifugovány 2 min při 8 000 ot/min. a supernatant byl přepipetován do čisté zkumavky a podroben UHPLC/MS analýze.

15

UHPLC/MS analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu ACQUITY I Class (Waters, Milford, MA, USA). Jedná se o modulární systém tvořený chromatografickou pumpou (Binary Solvent Manager), autosamplerem (Sample Manager) a termostatem kolony (Column Manager). Jako analytická kolona byla použita Kinetex Polar C18 (100 × 2,1 mm i.d., 2,6 µm; Phenomenex, CA, USA). Systém pracoval s gradientovou elucí mobilní fáze (MFA 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě, MFB 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu) při průtoku 0,6 ml/min a teplotě 25°C. Gradientová eluce měla následující parametry: 0 až 11 min 50 až 70% MFB, 11 až 12,5 min 70 až 100% MFB, 12,5 až 13 min 100 až 50% MFB, 13 až 16 min 50% MFB. Objem nástřiku byl 2 µl.

Pro metabolickou studii byl použit hmotnostní spektrometr Synapt G2-S s vysokým rozlišením (Waters Corp., Manchester, UK), který byl připojen k systému UPLC přes rozhraní elektrosprejové ionizace (ESI). Iontový zdroj pracoval v režimu pozitivní ionizace s kapilárním napětím 3,0 kV a vzorkovacím kuželem (sample cone) 30 V. Teplota zdroje a teplota desolvatačního plynu byly nastaveny na 120 °C a 320 °C. Průtok desolvatačního plynu byl 900 l/hod. Rozsah sběru dat byl 50 až 1200 Da s dobou skenování 0,2 s v režimu MS^E (funkce skenování umožňující současné získávání hmotnostních spekter s nízkou kolizní energií (2 eV) a vysokou kolizní energií (15-30 eV) v rámci jednoho experimentu). Přístroj byl kalibrován pomocí aduktů mravenčanu sodného v acetonitrilu s korekcí pro měření přesné hmoty s využitím externího standardu (roztok leucinenkefalin, 20 µg/l ve směsi voda: acetonitril: kyselina mravenčí (100: 100: 0,2, v/v/v), průtok 5 µl/min). Jako ovládací software pro sběr a vyhodnocení dat byl použit MassLynx V4.1 (Waters) a následné zpracování dat bylo provedeno pomocí MetaboLynx XS Application Manager (Waters).

Z výsledků vyplývá, že CBD je poměrně rychle vstřebáváno gingiválními fibroblasty, což je potvrzeno také tím, že nebylo detegováno v kultivačním médiu, ale pouze ve vyšetřovaných gingiválních fibroblastech (obrázek 5). Po 24 h kultivaci nebyly identifikovány žádné metabolity CBD, což je v souladu s tím, že gingiva není tkáň s biotransformačním potenciálem. To, že CBD není metabolizováno gingiválními fibroblasty, také přispívá k prodloužení jeho protizánětlivému účinku.

30 **Příklad 6.** Permeace zubních gelů s CBD na modelu syntetické kůže Strat-M[®]

Studie byla provedena se vzorky zubních gelů následujících složení.

Zubní gel s účinnou látkou CBD a skvalanem:

35

Složka	% hmotn.
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Skvalan	4,00
Kanabidiol	1,00
Methylparaben sodný	0,15
Čištěná voda	84,35

Postup přípravy zubního gelu:

1. Ve vodě se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.
2. Do suspenze z bodu 1. se přidá glycerin a methylparaben sodný, směs se promíchá.
3. Trietylamínem se adjustuje pH směsi získané v bodě 2. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.
4. Ve skvalanu se rozpustí CBD záhřevem na max. 60 °C.
5. Rozpuštěné CBD ve skvalanu se nalije do gelu (viz bod 3.) a směs se promíchá.

6. Pro dokonalou dispergaci CBD v gelu se směs homogenizuje při otáčkách 3000 ot/min cca 15 sekund.

Zubní gel s účinnou látkou CBD a slunečnicovým olejem:

5

Složka	% hmotn.
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Slunečnicový olej	4,00
Kanabidiol	1,00
Methylparaben sodný	0,15
Čištěná voda	84,35

Postup přípravy zubního gelu:

1. Ve vodě se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.
- 10 2. Do suspenze z bodu 1. se přidá glycerin a methylparaben sodný, směs se promíchá.
3. Triethylaminem se adjustuje pH směsi získané v bodě 2. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.
4. Ve slunečnicovém oleji se rozpustí CBD zahřevem na max. 60 °C.
5. Rozpuštěný CBD v oleji se nalije do gelu (viz bod 3.) a směs se promíchá.
- 15 6. Pro dokonalou dispergaci CBD v gelu se směs homogenizuje při otáčkách 3000 ot/min cca 15 sekund.

Zubní gel s účinnou látkou CBD:

Složka	% hmotn.
Carbopol Ultrez 10 NF polymer	0,50
Glycerin	10,00
Kanabidiol	1,00
Methylparaben sodný	0,15
Čištěná voda	88,35

20

Postup přípravy zubního gelu:

1. Ve vodě se smočí Carbopol Ultrez 10 NF polymer, vznikne lehce bílá suspenze.
2. Do suspenze z bodu 1. se přidá glycerin a methylparaben sodný, směs se promíchá.
- 25 3. Triethylaminem se adjustuje pH směsi získané v bodě 2. na hodnotu pH = 6,0, vytvoří se transparentní gel.
4. CBD se nasype do gelu (viz bod 3.) a směs se promíchá.
6. Pro dokonalou dispergaci CBD v gelu se směs homogenizuje při otáčkách 3000 ot/min cca 15 sekund.

30

Experimenty byly prováděny ve vertikálních Franzových celách o objemu 50 ml a difuzní ploše 2,5 cm². Na horní plochu bylo naneseno 5 g vzorku. Experimenty byly prováděny ve třech opakováních při 37 °C a 400 ot/min. po dobu 24 h. Receptorovým médiem byl fosfátový pufr o pH 7,4 s 5 % BSA (hovězí sérový albumin) napodobující fyziologické podmínky. Pro experimenty byl použit transdermální difuzní testovací model Strat-M[®] [T. Uchida, W. Kadhum, S. Kanai, T. Oshizaka, H. Todo, K. Sugibayashi Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane Strat-M[®]. Eur. J. Pharm. Sci. 2015; 67:113-118.]. Po 24 h byl

35

z receptorového prostoru odebrán 1 ml vzorku a analyzován pomocí UHPLC/MS dle podmínek specifikovaných v příkladu 5.

- 5 Z výsledků vyplývá, že CBD nejlépe difunduje přes model syntetické kůže z formulace obsahující jako rozpouštědlo skvalan. Slunečnicový olej jako solubilizační medium byl o více než 90 % horší, nejhůře pak dopadla formulace bez obsahu lipofilní složky.

Průmyslová využitelnost

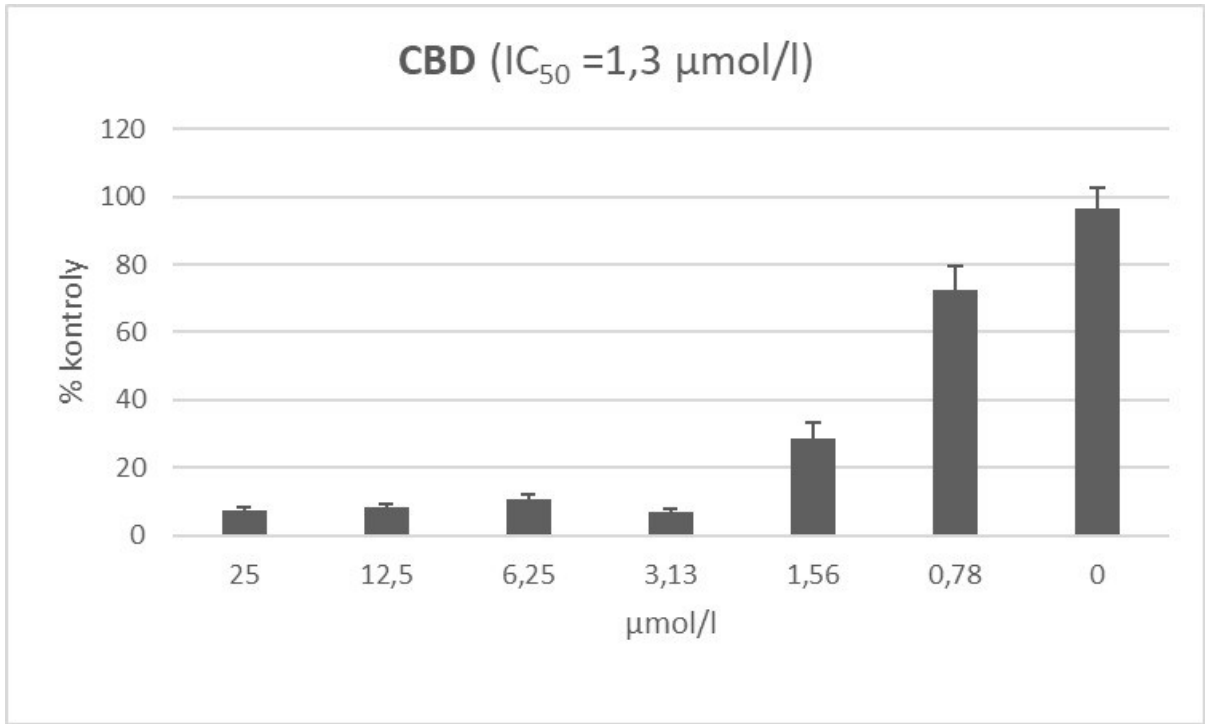
10

Přípravek podle technického řešení lze v různých formách použít jako účinný prostředek ústní hygieny spojený s pravidelnou péčí o chrup zajišťující ochranu před akutním zánětem gingivy vyvolaným zvýšenou formou tvorby biofilmu.

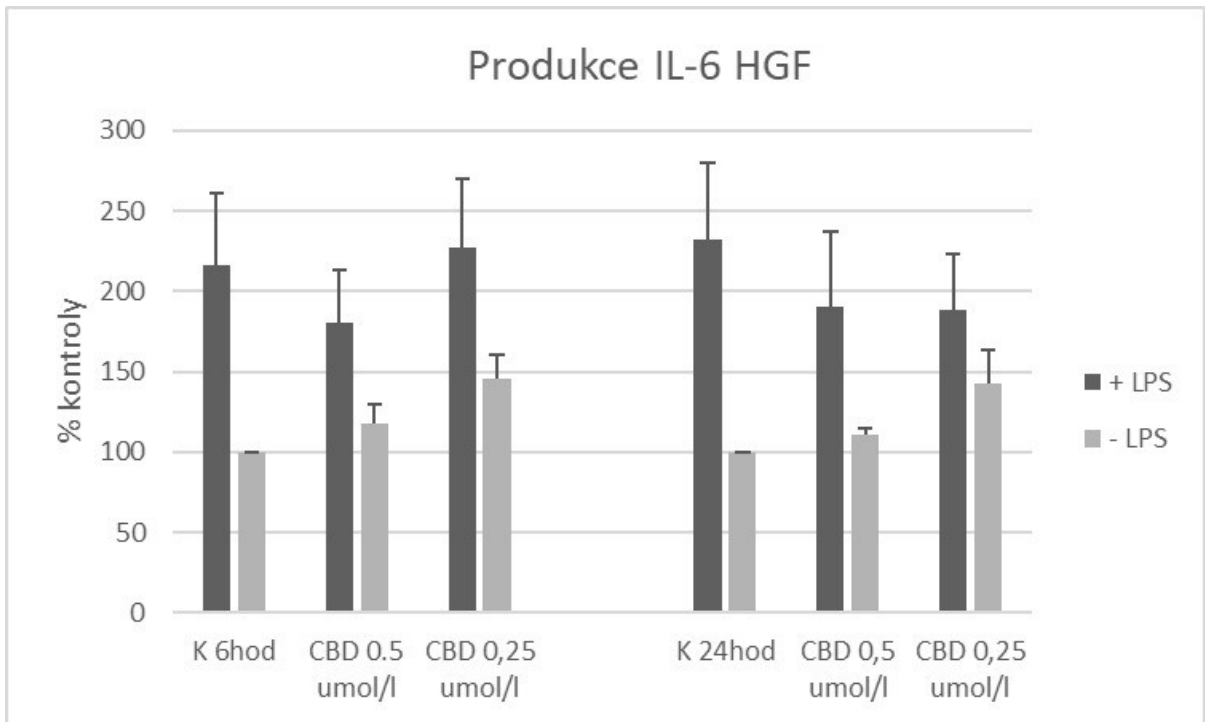
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Léčivý přípravek pro dentální použití, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinnou složku kanabidiol a rozpouštědlo skvalan, přičemž přípravek je ve formě zubního gelu.
- 5 2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že poměr skvalanu ke kanabidiolu je v rozmezí 2:1 až 20:1.
3. Přípravek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že obsahuje 0,1 až 5 % hmotn. kanabidiolu, výhodněji 0,5 až 2 % hmotn. kanabidiolu, a popřípadě do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu.
- 10 4. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že přípravek dále obsahuje účinnou složku kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl.
- 5 5. Přípravek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že kanabidiol a kyselina hyaluronová nebo její farmaceuticky přijatelná sůl jsou přítomny v poměru 20:1 až 1:1, výhodněji 20:1 až 5:1, ještě výhodněji 15:1 až 8:1.
- 15 6. Přípravek podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová nebo její farmaceuticky přijatelná sůl má s výhodou nízkou až střední molekulovou hmotnost v rozmezí 200 až 1800 kDa.
- 20 7. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu pomocnou látku vybranou ze skupiny gelující látky, rozpouštědla, vodu, stabilizátory a ochucovadla.
8. Přípravek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že obsahuje 0,1 až 5 % hmotn. kanabidiolu, 0,01 až 2 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, 1 až 10 % hmotn. skvalanu, 5 až 40 % hmotnostních gelujících látek, popřípadě do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu, a vodu v množství do 100 % hmotn.
- 25 9. Přípravek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že obsahuje 0,5 až 2 % hmotn. kanabidiolu, 0,05 až 1 % hmotn. kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, 3 až 8 % hmotn. skvalanu, 5 až 20 % hmotnostních gelujících látek, popřípadě do 0,3 % hmotn. chlorhexidin glukonátu nebo diglukonátu, a vodu v množství do 100 % hmotn.
- 30 10. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9 pro použití pro léčbu a/nebo prevenci chronického zánětu gingivy a/nebo parodontitidy.

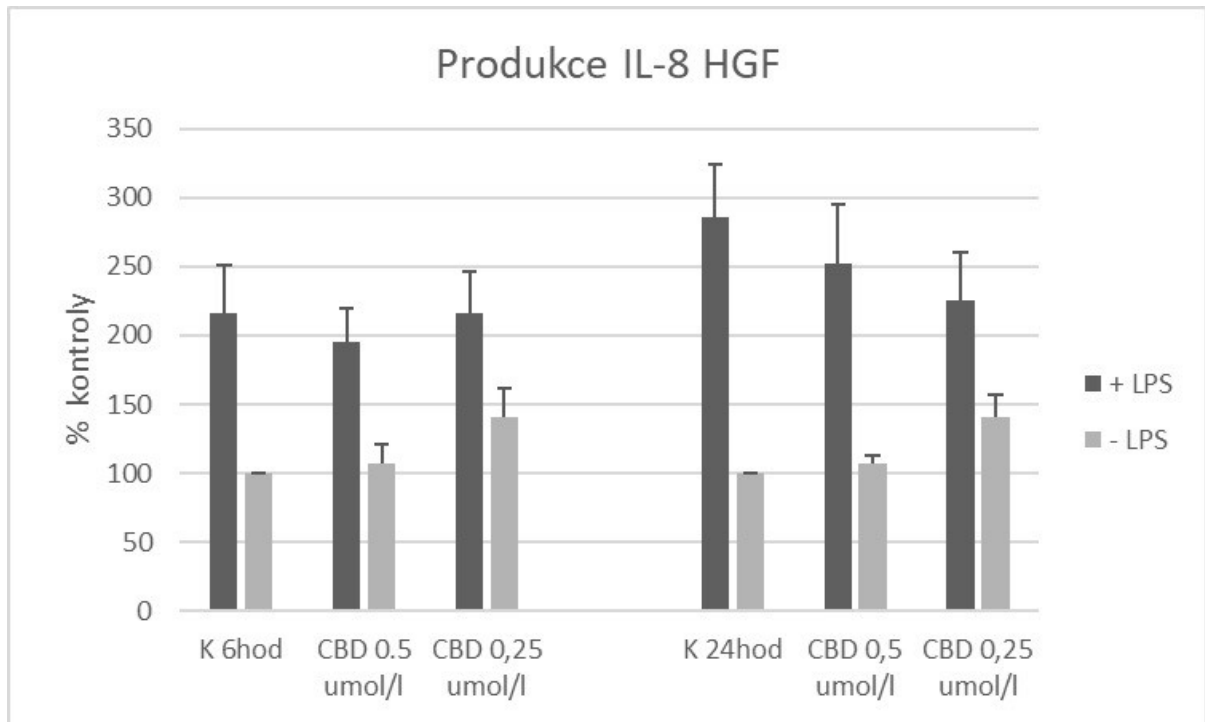
3 výkresy



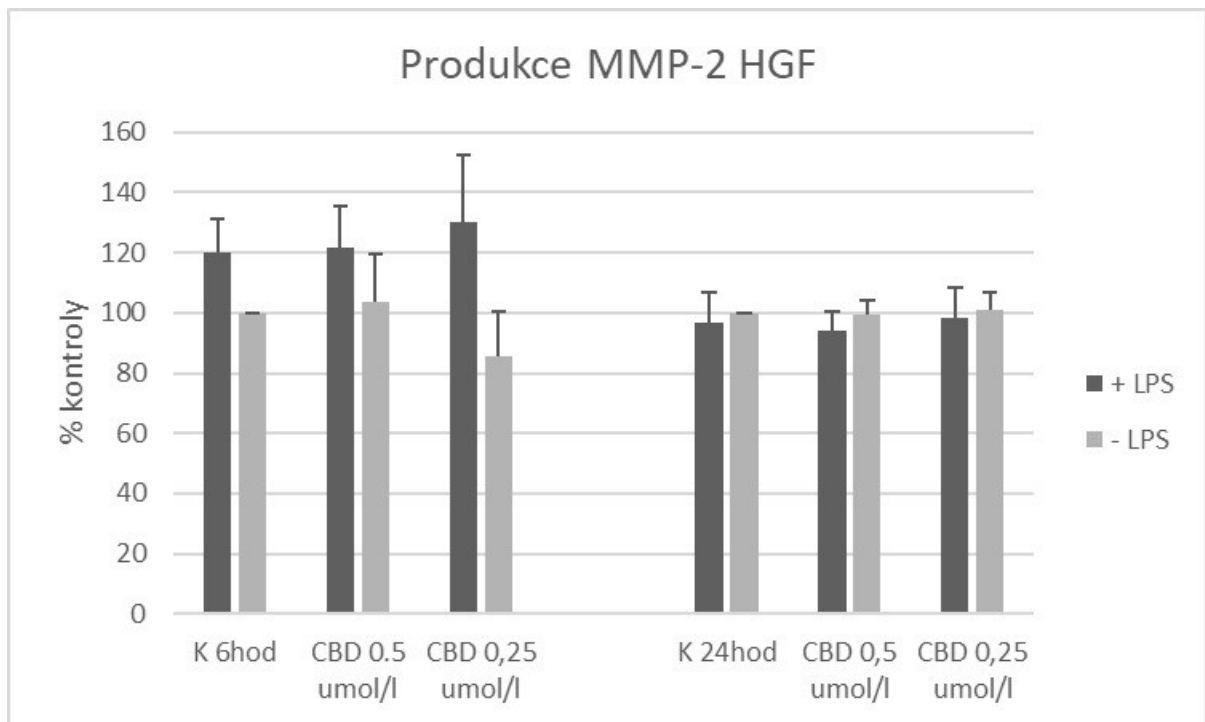
Obr. 1



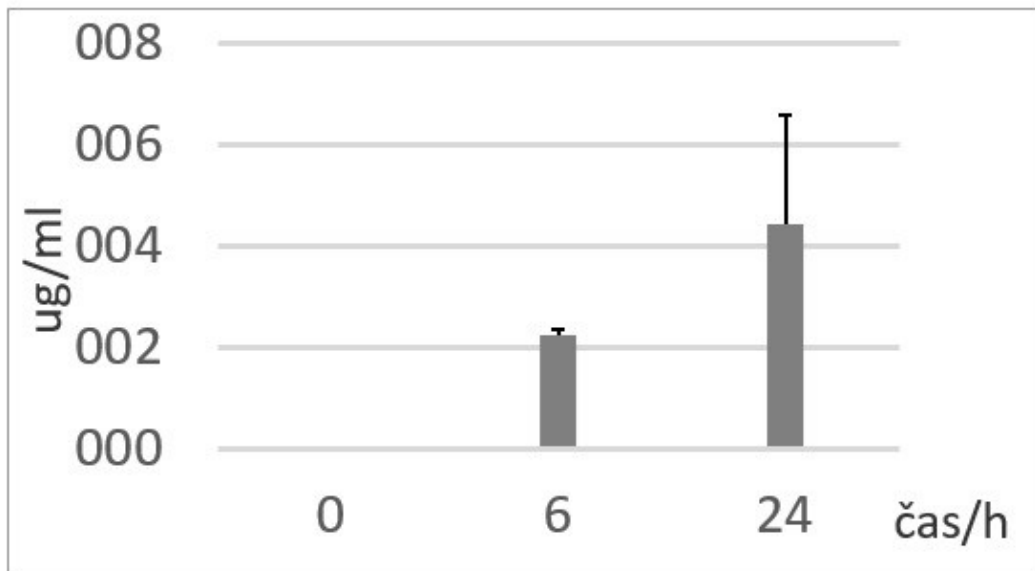
Obr. 2



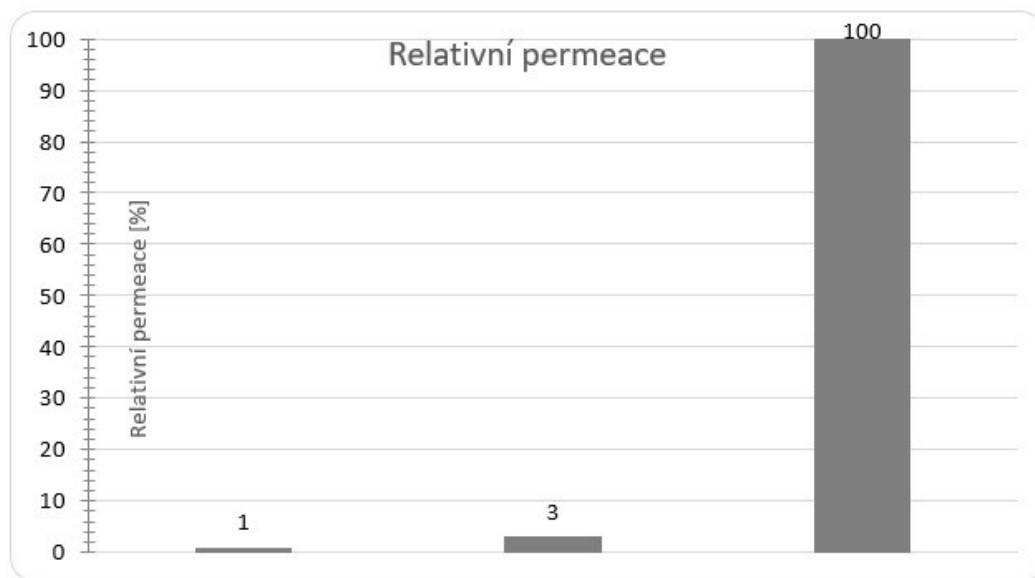
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6