

OCENA DZIAŁANIA IN VITRO DOKSYCYKLINY UWALNIANEJ Z BIORESORBOWALNEGO POLIMEROWEGO NOŚNIKA NA SZCZEP DESULFOVIBRIO DESULFURICANS

ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK^{1*}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{2,3},
MARZENA JAWORSKA-KIK¹, MAŁGORZATA PASTUSIAK²

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ,

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC

² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,

UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE

³ AKADEMIA JANA DŁUGOSZA,

WYDZIAŁ MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZY,

UL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-218 CZĘSTOCHOWA

* E-MAIL: AKOPYTYNSKA_KASPERCZYK@GO2.PL

Streszczenie

Systemy miejscowego uwalniania leku stanowią obiecującą drogę leczenia chorób przyzębia współtowarzyszącą mechanoterapii. Uzasadnieniem dla ich zastosowania jest fakt, że osiągają one dno kieszonki dziąsłowej, które jest niedostępne dla narzędzi stomatologicznych. Przyszłość tychże systemów bardzo silnie związana jest z polimerowymi nośnikami leku. Celem prezentowanych badań było oszacowanie działania jakościowego wcześniej opracowanych systemów miejscowego uwalniania doksycykliny, opartego na polimerowym nośniku leku (bioresorbowalne kopolimery o wysokiej elastyczności: ϵ -kapolaktonu z trimetylowęglanem oraz kopolimer glikolidu z ϵ -kapolaktonem) na potencjalnie patogenny dla przyzębia szczep *Desulfovibrio desulfuricans*. Wykorzystana w badaniach doksycyklina została wybrana ze względu na swoje dodatkowe szczególne właściwości, które nie związane są z jej wpływem na bakterie, a bardzo pomocne w terapii chorób przyzębia. Wykonano badanie oceny wrażliwości szczepu i wyznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC) dla doksycykliny. Ocenę skuteczności systemu *in vitro* przeprowadzono poprzez wystawienie szczepu *Desulfovibrio desulfuricans* na działanie doksycykliny uwalnianej z polimerowych nośników w kolejnych dobach badania. Każdego dnia badania dokonywano odczytu wzrostu kolonii bakteryjnych na płytkach z podłożem. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono szczególną przydatność systemu zawierającego 5% leku, formowanego z udziałem kopolimeru o składzie 80% mol. kaproilu i 20% mol. jednostek węglanowych. System ten zapewnia pełną skuteczność w walce z tą modelową dla chorób przyzębia bakterią w okresie 8 dni od wprowadzenia.

Słowa kluczowe: periodontitis, miejscowe uwalnianie leku, doksycyklina, *Desulfovibrio desulfuricans*

[*Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 19-23*]

IN VITRO EVALUATION OF DOXYCYCLINE RELEASED FROM BIODEGRADABLE POLYMERIC CARRIER ON DESULFOVIBRIO DESULFURICANS STRAIN

ANNA KOPYTYŃSKA-KASPERCZYK^{1*}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{2,3},
MARZENA JAWORSKA-KIK¹, MAŁGORZATA PASTUSIAK²

¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCE,
M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

³ THE FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES,
JAN DŁUGOSZ UNIVERSITY,
ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-218 CZĘSTOCHOWA, POLAND

* E-MAIL: AKOPYTYNSKA_KASPERCZYK@GO2.PL

Abstract

Local drug delivery systems are promising route of drug administration in periodontal treatment, parallel to scaling and root planning (SRP). The concept of this form of treatment is justified by the fact that it reaches the area unavailable for dental instruments. The future of these systems is tightly connected with polymeric drug carriers. The aim of this study was evaluation of polymeric local doxycycline delivery system (designed and described earlier) and its antimicrobial effect on *Desulfovibrio desulfuricans*, potentially pathogenic to periodontal tissue. Doxycycline used in the study was chosen for its additional special non-antibiotic properties that may be very helpful in periodontal treatment. The presented and tested polymeric drug carriers were flexible bioresorbable copolymers of ϵ -CL/TMC and ϵ -CL/GL. Bacteria susceptibility to doxycycline has been estimated and doxycycline Minimal Inhibitory Concentration (MIC) has been fixed. The antimicrobial effect of examined systems has been tested by *D. desulfuricans* exposure to doxycycline released daily from copolymers. Bacterial colony growth on agar plates was examined each day of the study. On the basis of these investigations, 20%TMC/80% ϵ -CL copolymer has been reported to be the most suitable for the designed local drug device. It showed doxycycline release able to inhibit bacterial growth during 8 days of the experiment.

Keywords: periodontitis, local drug delivery, doxycycline, *Desulfovibrio desulfuricans*

[*Engineering of Biomaterials 124 (2014) 19-23*]

Introduction

The first to introduce the idea of local drug delivery in periodontal treatment was Goodson in 1979. The concept of this form of treatment is the fact that it reaches area unavailable for dental tools used in scaling and root planning (SRP) and the bottom of periodontal pocket. This route of administration enables drug to remain directly where it was applied until it gains the antimicrobial effect. Periodontal pocket provides reservoir bathed by gingival crevicular fluid (GCF) and is easily accessible for insertion of drug delivery device [1].

Jako pierwszy koncepcję miejscowego podawania leku w leczeniu przyzębia zaproponował w 1979 r. Goodson i wsp., a u podstaw takiej metody leżał fakt, że w ten sposób możliwe byłoby osiągnięcie dna kieszonki dziąsłowej (nieodstępnej instrumentom stosowanym przy konwencjonalnym leczeniu poprzez mechaniczne usuwanie złogów nadi- i poddziąsłowych) przez lek, który mógłby pozostawać bezpośrednio w miejscu swojego działania aż do czasu uzyskania efektu przeciwbakteryjnego. Kieszonka dziąsłowa stanowi naturalny rezerwuuar opłukiwany przez płyn dziąsłowy i jest także miejscem łatwo dostępnym dla umieszczenia w niej systemu uwalniającego lek [1].

Systemy miejscowego uwalniania leku można podzielić ze względu na mechanizm kontrolowanego uwalniania leku. Wyróżniamy: systemy rozpuszczalnych matryc oparte na makromolekularnej przepuszczalności matrycy dla małych molekuł po spęcznieniu w uwodnionym medium, systemy-rezerwuary uwalniające lek poprzez dyfuzję przez polimerową błonę, systemy kontrolowane chemicznie, gdzie szybkość uwalniania leku jest kontrolowana prędkością i rozległością degradacji wiązań chemicznych i erozji matrycy polimerowej. We wszystkich tych systemach bazowy polimer może być pochodzenia naturalnego (np. kolagen czy inne białka), półsyntetycznego (pochodne celulozy) lub syntetycznego. Spośród tych ostatnich, największą popularnością cieszą się polimery degradowalne [1].

Rozważano zastosowanie naturalnych polimerów jako biodegradowalnych nośników. Jednakże, większość z nich ma wady wynikające z ich struktury, takie jak ograniczony okres półtrwania, złożoność budowy oraz immunogeniczność z powodu obecności samych polimerów lub produktów ich rozpadu. Dotychczas opracowano i przebadano in vitro lub/i in vivo wiele systemów opartych na polimerowych nośnikach leku. Niestety, większość prac dostarcza niewiele informacji na temat wpływu tychże systemów na progresję choroby. Ponadto, niewiele jest danych na temat zmian w mikroflorze kieszonki dziąsłowej, dlatego trudno jest ustalić odpowiednie schematy leczenia. Większość tych systemów jest nieresorbowalna. Te systemy, które nie są biodegradowalne, należy usunąć po całkowitym uwolnieniu leku z matrycy. Usuwanie nośnika leku może spowodować podrażnienie tkanek i stan zapalny w miejscu leczonym. Dlatego przewaga leży po stronie biodegradowalnych systemów kontrolowanego uwalniania leku, które można umieścić na długi okres w kieszonce dziąsłowej. Dodatkowym atutem takiego rozwiązania jest brak konieczności ponownej wizyty pacjenta w gabinecie lekarskim związanej z koniecznością usunięcia nośnika z kieszonki dziąsłowej [1].

Do tej pory opracowano rozmaite postaci systemów miejscowego uwalniania leku do leczenia chorób przyzębia. Wśród nich najczęściej spotykane to: włókna, filmy, systemy do iniekcji, mikrocząstki, żele, paski, kompaktki, nanocząstki [1].

Jednym z antybiotyków stosowanych w leczeniu chorób przyzębia jest doksycyklina (RYS. 1). Doksycyklina należy do grupy tetracyklin. Tetracykliny to antybiotyki o właściwościach bakteriostatycznych, charakteryzujące się szerokim zakresem działania zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne. Charakteryzują się one długim okresem półtrwania [2]. Poza oddziaływaniem na bakterie, tetracykliny posiadają także szereg właściwości niezwiązanych z tymi przeciwbakteryjnymi.

Tetracykliny mogą działać jak jonofory i w ten sposób wspomagać transport kationów metali przez bariery syntetyczne, ale także błony naturalne. Kolejną ich właściwością jest hamowanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, co pośrednio obniża produkcję kolagenazy.

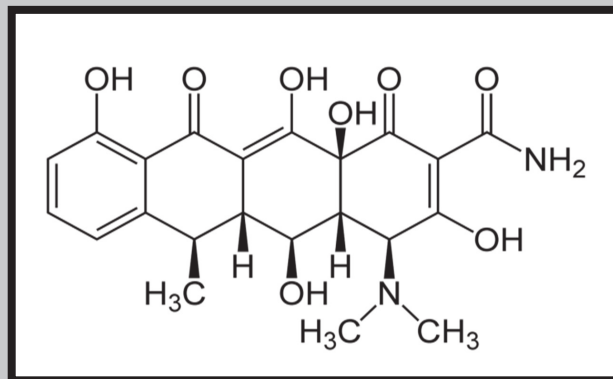
Intra pocket local delivery devices may be divided into two broad groups on the basis of their degradability: non degradable devices (first generation) and degradable devices (second generation). When considering drug release mechanism, it is possible to distinguish: systems based on soluble matrix, where matrix is permeable for micromolecules when swelling in hydrated medium; systems-reservoirs releasing drug by diffusion through polymeric membrane; chemically controlled systems, where release rate depends on velocity and range of chemical bonds cleavage and polymer matrix degradation. For all of these systems, basic polymer may be of natural origin (such as collagen or other proteins), semi-synthetic (cellulose derivatives) or synthetic (preferably degradable) [1].

Natural polymers have been considered as biodegradable drug carriers. Nevertheless, most of them show disadvantages related to their structure: limited half-life, complexity of their composition and immunogenicity owing to polymer itself or products of its degradation. So far many polymer-based local delivery devices have been evaluated in vitro or/and in vivo. Unfortunately, little information about their influence on disease's progression is available. In addition, it seems difficult to establish treatment patterns due to few clinical data referring to changes in periodontal pocket microflora. Most of the devices are non resorbable. Non degradable devices must be removed after the total drug releasing. Removal of the device may lead to tissue irritation and inflammation in treated area. Therefore degradable matrices are much more useful. They may be inserted safely into periodontal pocket for longer period of time. Another advantage of such carrier is the fact that it does not require the patient to pay another visit to the dental office [1].

Various forms of local drug delivery systems have been examined. The most common are: fibers, films, injectable systems, microparticles, gels, strips, compacts and nanoparticles systems [1].

One of the antimicrobial agents used in periodontal treatment is doxycycline (FIG. 1). Doxycycline is a member of tetracycline group. Tetracyclines are antimicrobial agents with broad spectrum, both Gram-positive and Gram-negative bacteria. This group of antibiotics has a long half-life. Apart from antimicrobial effect, tetracyclines have also nonantibiotic properties [2].

Tetracyclines may work as ionophores and support metal cations transport through synthetic and natural membranes. Its another advantage is inhibition of MMPs what decreases collagenase production. Tetracyclines are also reported to inhibit angiogenesis [3] and to have antiapoptotic properties [4]. It is also very important for periodontal treatment purposes (especially periodontitis treatment) that tetracyclines have beneficial effect on bone metabolism – because they reduce osteoblasts' function [3].



RYS. 1. Wzór chemiczny doksycykliny.
FIG. 1. Doxycycline structure.

Ponadto ta grupa antybiotyków ma zdolność hamowania angiogenezy [3]. Ostatnie badania wskazują także na antyapoptotyczne własności tetracyklin [4]. Kolejną, niezwykle ważną dla leczenia chorób przyzębia cechą tetracyklin jest pozytywny ich wpływ na metabolizm kości (redukcja funkcji osteoklastów) [3].

Desulfovibrio desulfuricans należy do grupy bakterii redukujących siarczany (BRS). Willis i wsp. Stwierdzili obecność BRS w jamie ustnej człowieka [5]. Van der Hoeven i wsp. przebadali grupę 43 osób i u 25 z nich odnotowali istnienie w jamie ustnej bakterii z rodzaju *Desulfovibrio* oraz *Desulfovibrio* [6]. Wielce prawdopodobne jest więc to, że BRS są przyczyną etiologiczną chorób przyzębia, w tym paradontoz [7,8]. Z tego powodu mogą służyć, jako modelowe organizmy patogenne do badań skuteczności leczenia chorób przyzębia w warunkach *in vitro*.

Materiały i metody

Formowanie polimerowych systemów uwalniania doksycykliny

Do realizacji założeń systemu uwalniania doksycykliny, który w postaci odpowiednio dopasowywanych pierścieni ma być wprowadzany poprzez przeciąganie przez koronę zęba do kieszeni zębowych, poszukiwaliśmy biokompatybilne i biodegradowalne kopolimery spełniające wymagane w wypadku takiego zastosowania warunki, to jest stosunkowo dobrą wytrzymałość mechaniczną i wysoką elastyczność. Jedynie takie własności matrycy pozwalają na dość łatwy montaż systemu, a zarazem nie obniżają komfortu pacjenta. Materiały polimerowe, które wybrano na nośniki doksycykliny spełniające wcześniej założone warunki, to kopolimery glikolidu (GL), ϵ -kapolaktonu (ϵ -CL) oraz węglanu trimetylenu (TMC) o różnych udziałach jednostek monomerycznych: 10% GL / 90% ϵ -CL, 50% TMC / 50% ϵ -CL, 20% TMC / 80% ϵ -CL. Sposób syntezy kopolimerów, metodę formowania tych matryc, jak i kinetykę uwalniania z nich doksycykliny w warunkach *in vitro* przedstawiono w naszej wcześniejszej publikacji [9]. Spośród przebadanych materiałów najlepszym profilem uwalniania, zbliżonym do liniowego, charakteryzował się materiał o składzie 20% TMC / 80% ϵ -CL z zawartością 5% wag. leku.

Badania skuteczności bakteriostatycznej wykonanych systemów

W pierwszym etapie badań, celem poznania zachowania badanego szczepu *Desulfovibrio desulfuricans* na doksycyklinę, wykonano badanie wrażliwości metodą seryjnych rozcieńczeń (0,03-64 μ g/ml) w podłożu płynnym (pożywka Postgate'a). Szczep *Desulfovibrio desulfuricans*, przeznaczony do badań hodowano na pożywce pirogronianowej Postgate'a [10] z obniżoną zawartością $MgCl_2$ do 25 mg/L. W celu realizacji badań wykonano serię rozcieńczeń (0,03-64 μ g/ml) antybiotyku w płynnym podłożu (płynną pożywką rozcieńczano znane stężenie antybiotyku), a następnie każdą z tak otrzymanych próbek zaszczerpiono znaną liczbą komórek bakteryjnych. Inokulum (0,5 w skali Mc Farland) wraz z rozcieńczeniami antybiotyku wysiewano na szklane płytki z agarem. Po 48 godzinym okresie inkubacji w komorze MACS MG 500 (Anaerobic Workstation dW Scientific, West Yorkshire, Anglia) w atmosferze zawierającej 80% N_2 , 10% H_2 i 10% CO_2 w temperaturze 37°C, dokonywano odczytu wzrostu (lub jego braku) szczepu na płytkach z podłożem. Najniższe stężenie doksycykliny, dla którego nie zaobserwowano wzrostu, zostało odnotowane jako MIC – najniższe stężenie hamujące wzrost równe około 0,12 μ g/ml.

Desulfovibrio desulfuricans is a member of sulfate reducing bacteria (BRS). Willis et al. have confirmed *D. desulfuricans* presence in human oral cavity [5]. Van der Hoeven et al. have examined a group of patients, 25 out of 43 examined have been reported to have in oral cavity microflora *Desulfovibrio* and *Desulfovibrio spp.* [6]. It is greatly probable that BRS play a major role in periodontal diseases and *periodontitis* etiology [7,8]. This is why the *D. desulfuricans* strain may be a model pathogenic strain to estimate antimicrobial effect on periodontal pathogens *in vitro*.

Materials and methods

Formation of polymeric devices for doxycycline release

For implementation of designed drug release system we assume that flexible ring-like matrices will be stretched onto tooth root's surface and placed into periodontal pocket. Therefore we have searched for biocompatible and biodegradable copolymers with properties adequate for periodontal purposes, i.e. with relatively good mechanical strength and high flexibility. Only these properties of polymeric matrix will assure the comfort to the patient. Polymer materials taken into consideration, owing to their required properties that matched assumptions, were copolymers of glycolide (GL), ϵ -caprolactone (ϵ -CL) and trimethylene carbonate (TMC) with various molar ratio of monomers: 10% GL / 90% ϵ -CL, 50%TMC / 50% ϵ -CL, 20%TMC / 80% ϵ -CL.

The copolymers synthesis, the way of matrices formation and kinetics of the drug release *in vitro* have been described earlier in our paper [9]. Among all of examined materials, the one with the most suitable doxycycline release profile (closest to linear) was the matrix formed with 20%TMC / 80% ϵ -CL copolymer and 5% wt. of doxycycline.

Study on antimicrobial effect of designed systems

The first step of the study was *Desulfovibrio desulfuricans* susceptibility to doxycycline testing. The chosen method was broth dilution test. This method involves preparing a set of doxycycline dilution in a liquid growth-medium dispensed in tubes. The following step was to inoculate the medium. The used medium was previously described by J.R. Postgate [10] with $MgCl_2$ concentration of 25 mg/L. The doxycycline concentrations in medium ranged between 0.03 and 64 μ g/ml. The inoculum (0.5 according to Mc Farland standard) with different doxycycline concentrations was gained. Agar plates were immediately inoculated by loop starting with the lowest doxycycline concentration by spreading 10 μ l of the inoculation-suspension. Plates were incubated for 48 hours in anaerobic conditions with MACS MG 500 (Anaerobic Workstation dW Scientific, West Yorkshire, England) at 37°C and following anaerobic conditions: 80% N_2 , 10% H_2 and 10% CO_2 . After 48 hours of incubation, the agar plates have been examined. The minimum inhibitory concentration (MIC) was recorded as the lowest concentration without visible bacteria growth.

The antimicrobial effectiveness of the system has been tested in the same conditions. Ring-like samples (weight about 0.03 g) of polymeric matrices (drug carriers) were immersed in inoculum. Bacterial strain suspended in liquid growth-medium was exposed to daily dose of doxycycline released from different matrices. After 24 hours of incubation in anaerobic conditions, polymer matrices were removed and placed in "fresh" portion inoculum. The "old" inoculum with the released doxycycline was plated on agar and incubated for 48 hours in anaerobic conditions. After 48 hours of incubation the plates were observed, and visible growth or lack of growth on plates were reported for each copolymer.

Badanie oceny skuteczności przeciwbakteryjnej systemu uwalniającego doksycyklinę przeprowadzano w tych samych warunkach. Próbkę badanych systemów polimerowych (różnych nośników leku), o kształcie pierścieni wyciętych z folii o masie ok. 0,03 g umieszczano w inokulum. Bakterie zawieszone w płynnej pożywkę wraz z wprowadzonym badanym systemem uwalniającym lek, umieszczano na okres jednej doby w komorze beztlenowej. Po 24 godzinach działania antybiotyku uwalniającego się w tym czasie z matrycy do pożywki (równego uwolnionej dobowej dawce), oddzielano próbkę od próbki polimerowej, a inokulum wysiewano na płytkę z podłożem stałym. Po następnych 48 godzinach inkubacji w warunkach beztlenowych, dokonywano oceny ilości tworzących się kolonii bakterii lub stwierdzano ich brak. Próbkę kontrolną stanowiły matryce polimerowe nie zawierające leku, które analogicznie umieszczane były w zawieszynie bakterii, a po okresie 24 godzin, wysiewane na podłoże i poddawane inkubacji w warunkach beztlenowych. Czynności powtarzano dla tej samej próbki przez kolejne doby. W ten sposób notując wpływ działania bakteriobójczego uwalniającej się dawki antybiotyku w drugiej i kolejnych dobach badania.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badania skuteczności bakteriostatycznej (wyrażone brakiem wzrostu bakterii) dla poszczególnych polimerowych nośników doksycykliny przedstawione zostały w TABELI 1.

Wszystkie matryce w trakcie pierwszych czterech dni uwalniały doksycyklinę w ilości powyżej wcześniej wyliczonej wartości MIC, co powodowało silne hamowanie wzrostu *Desulfovibrio desulfuricans* na zastosowanym podłożu. Począwszy od piątej doby zaobserwowano powolny wzrost bakterii, które przypisane były matrycom o składzie 10% GL / 90% ϵ -CL oraz 50% TMC / 50% ϵ -CL. Zaobserwowane zjawisko było związane z spadkiem dobowej ilości uwalnianego antybiotyku w tych próbach. Spadek ten nie był jednak na tyle dramatyczny, aby nie zanotować wpływu układu na namnażanie się badanych mikroorganizmów.

Dla matrycy wykonanej z kopolimeru 10% GL / 90% ϵ -CL odnotowano wzrost jedynie kilkudziesięciu kolonii, natomiast dla drugiej z nich formowanej z kopolimeru 50% TMC / 50% ϵ -CL już na poziomie kilkuset (RYS. 2). W kolejnych dniach badania proporcje te odwróciły się na korzyść matrycy 50% TMC / 50% ϵ -CL. Matryca 20% TMC / 80% ϵ -CL uwolniła ilości doksycykliny hamujące wzrost *D. desulfuricans* do 8 doby włącznie. W kolejnych dobach badania liczba kolonii na płytkach oscylowała wokół kilkudziesięciu, wyjątek stanowiła 11 doba badania, kiedy to odnotowano wzrost na poziomie kilkuset kolonii, aby w kolejnej dobie powrócić do poziomu trzydziestu.

The obtained results were analyzed. The control group of samples was inoculum with polymeric matrices without the drug. All of the study steps and conditions were the same for examined and control groups. The examined samples were exposed to daily dosage of doxycycline released from different polymeric matrices so as to evaluate the antimicrobial effect of polymeric materials. Every day of the study was reported separately.

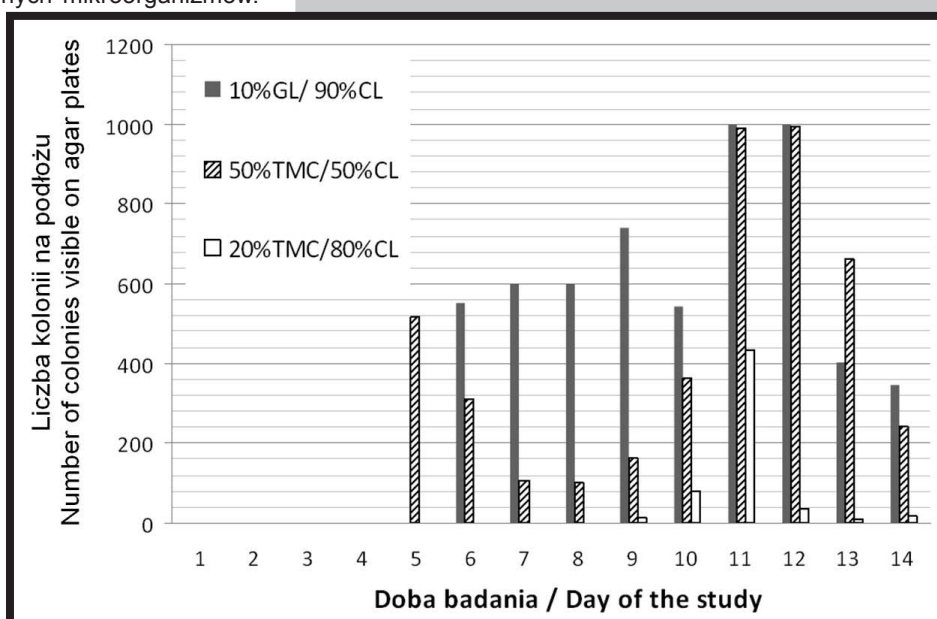
Results and Discussions

The susceptibility to doxycycline for *D. desulfuricans* was detected at a concentration of 0.12 μ g/ml. The results of bacterial growth for different kinds of copolymer carriers are shown in TABLE 1.

TABELA 1. Badania skuteczności bakteriostatycznej polimerowych nośników doksycykliny.
TABLE 1. Antimicrobial effect on *D. desulfuricans* expressed by no visible colony growth on agar plates.

Kolejne doby badania Day of the experiment	10% GL / 90% ϵ -CL	50% TMC / 50% ϵ -CL	20% TMC / 80% ϵ -CL
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	-	-	-
4.	-	-	-
5.	-/+	+	-
6.	+	+	-
7.	+	+	-
8.	+	+	-
9.	+	+	-/+
10.	+	+	+

Gdzie: (-) - brak pojawienia się widocznych kolonii, (-/+) - obecność pojedynczych kolonii, (+) - obecność dużej liczby kolonii bakterii
Where: (-) - no visible colony growth, (-/+) - single colonies growth, (+) - multiple colony growth visible



RYS. 2. Zależność liczby kolonii *D. desulfuricans* w zależności od czasu uwalniania doksycykliny i rodzaju zastosowanej matrycy polimerowej.
FIG. 2. Dependence of *D. desulfuricans* colony growth on time and different drug carriers used in the study.

Obserwowane fluktuacje spowodowane były nierównomiernym uwalnianiem antybiotyku z jednej strony, jak i wolną dyfuzją roztworu tego leku w żelowej pożywce, co było spowodowane statycznym charakterem prowadzonej hodowli.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonego badania niewątpliwie widać, że matryca polimerowa o składzie kopolimeru 20% TMC / 80% ϵ -CL jest najlepszym nośnikiem doksycykliny dla założonego systemu. Z przeprowadzonych wcześniej badań własnych [9] wynika, że system formowany z użyciem tego kopolimeru odznacza się także najkorzystniejszym profilem uwalniania leku w badanej grupie. To zjawisko jest bezpośrednią przyczyną tak dobrego zachowania biostatycznego tego badanego systemu. Okres hamowania wzrostu bakterii w środowisku płynnej pożywki Postgate'a, był jedynie nieznacznie różny od przewidywanego na podstawie wcześniej badanej kinetyki uwalniania leku, a założony na podstawie ilości leku uwolnionego w dawkach powyżej minimalnego stężenia hamującego - MIC dla doksycykliny okres, w obu badaniach wyniósł 7 dni. Znacznie większe różnice wystąpiły w wypadku badań *in vitro* dwóch pozostałych materiałów. Różnica ta wynika przede wszystkim z innej szybkości dyfuzji leku zawartego w kopolimerze do płynnej, gęstej pożywki bakteryjnej, znacznie wolniejszego w porównaniu do środowiska „sztucznej śliny”, w którym wcześniej badano przebieg uwalniania doksycykliny z badanych systemów [9]. Wytypowany w opisanych badaniach materiał na matrycę – kopolimer 20% TMC / 80% ϵ -CL z uwagi na swoją potwierdzoną w osobnych badaniach biozgodność, biodegradowalność i elastyczność, wydaje się być optymalnym nośnikiem leku dla projektowanego skutecznego systemu miejscowego uwalniania doksycykliny, który może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób przyzębia. W warunkach *in vivo* ze względu na zwiększoną szybkość dyfuzji w środowisku płynu zalegającego w kieszonkach zębowych oczekiwać należy nawet większą efektywność bakteriostatyczną tego systemu wobec bakterii, w porównaniu ze stwierdzoną w opisanych badaniach.

Podziękowania

Praca realizowana w ramach Regionalnego Funduszu Stypendiów Doktoranckich 2, oraz finansowana z działalności statutowych CMPW PAN w Zabrze i SUM w Sosnowcu.

Piśmiennictwo

- [1] Kaplish V., Walia M.K., Kumar S.L.H.: Local drug delivery systems in the treatment of periodontitis; A Review. *Pharmacophore (An Int. Res. J.)* 4, 2 (2013) 39-49.
- [2] Sender-Janeczek A., Ziętek M.: Miejscowe zastosowanie antyseptyków i antybiotyków w leczeniu przewlekłego zapalenia przyzębia – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* 44, 3 (2007) 396-402.
- [3] Sapadin A.N., Fleischmajer R.: Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 54 (2006) 258-65.
- [4] Yjranheikki J., Keinanen R., Pelikka M., Hokfelt T., Koistinaho J.: Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 15769-74.
- [5] Willis C.L., Cummings J.H., Neale G., Gibson G.R.: Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral cavity. *FEMS Microbiol Lett.* 129 (1995) 267-272.

All of examined copolymers have released daily amounts of doxycycline able to inhibit *D. desulfuricans* growth for four days (above estimated MIC). Starting with day 5, colonies growth has been noticed for two copolymers: 10% GL / 90% ϵ -CL and 50% TMC / 50% ϵ -CL. This was a result of drug concentration decrease, but the observed phenomenon appeared rather limited. The agar plates referring to copolymer 10% GL / 90% ϵ -CL showed only tens of colonies grown. Plates referring to 50% TMC / 50% ϵ -CL matrices revealed growth of hundreds of colonies at the same day (FIG. 2.). In following days of the study the 50% TMC / 50% ϵ -CL matrices gained less colonies growth. Only 20% TMC / 80% ϵ -CL matrices were able to inhibit *D. desulfuricans* development within 8 days of the conducted experiment. From day 9, practically only tens of colonies were reported.

The irregularity of colonies growth observed during the experiment was a result of uneven drug release and slow drug diffusion into agar medium.

Conclusions

Based on the results of this study, it may be concluded that 20% TMC / 80% ϵ -CL copolymer is the best doxycycline carrier of the designed drug delivery system. It has also been shown in earlier own studies [9] that this copolymer had the most suitable doxycycline release profile among the group of examined materials. The period of bacterial growth inhibition was only slightly different from predicted according to drug release kinetics. For both studies, the period of doxycycline release above Minimal Inhibitory Concentration have been gained for seven days. The differences were bigger for other materials and it may be explained by the fact that drug diffusion rate differs in artificial saliva and bacteria supporting growth medium. The chosen 20% TMC / 80% ϵ -CL copolymer has been described as biocompatible, biodegradable and flexible. It seems to be the most suitable drug carrier for the effective local drug delivery of doxycycline among analyzed systems. The described drug carrier may be used for periodontal treatment purposes. It might be expected that *in vivo* antimicrobial effect of the system will be higher due to higher drug diffusion rate GCF bathing the periodontal pocket.

Acknowledgments

The study was supported by RFSD2 scholarship and performed in Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Science in Zabrze as well as Department of Biopharmacy, Medical University of Silesia in Sosnowiec.

References

- [6] Van der Hoeven J.S., Van den Kieboom C.W., Schaeken M.J., Sulfate-reducing bacteria in periodontal pocket. *Oral Microbiol. Immunol.* 10 (1995) 288-290.
- [7] Boopathy R., Roichaux M., LaFont D., Howell M.: Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. *Can. J. Microbiol.* 48 (2002) 1099-1103.
- [8] Langendijk P.S., Kulik D.M., Sandmeier H., Meyer J., Van der Hoeven S.J.: Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. Nov and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Intern. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 1035-1044.
- [9] Kopytyńska-Kasperczyk A., Dobrzyński P.: Polymeric matrices as carriers for local doxycycline delivery dedicated for periodontal purposes – preliminary report". *Engineering of Biomaterials* 109-111 (2011) 17-21.
- [10] Postgate J.R.: The sulfate-reducing bacteria. Cambridge University Press, Cambridge 1984.