

RÓŻNE PROFILE UWALNIANIA ANTRACYKLIN JAKO WYNIK ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZY LEKIEM I BIODEGRADOWALNĄ POLIMEROWĄ MATRYCĄ

K. STOKŁOSA*, J. KASPERCZYK***, P. DOBRZYŃSKI**,
B. KACZMARCZYK**

*ŚLAŚKA AKADEMIA MEDYCZNA,
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1, 41-200
SOSNOWIEC, POLSKA.

**POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM CHEMII POLIMERÓW,
CURIE-SKŁODOWSKIE 34, 41- 800 ZABRZE, POLSKA.

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań uwalniania doksorubicyny i idarubicyny w fazie *in vitro* z biore-sorbowalnej matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i L,L-laktydu (PGLA) do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (aCFS). Określono mikrostrukturę łańcucha polimerowego korzystając z magnetycznego rezonansu jądrowego (¹³C-NMR). Badano profile uwalniania doksorubicyny i idarubicyny z matryc zawierających kopolimery glikolidu i L,L-laktydu oraz glikolidu i ε-kaprolaktonu do aCFS w oparciu o spektroskopię UV-VIS. W przypadku matryc wykonanych z kopolimeru glikolidu z L,L-laktydem stwierdzono różnice w profilach uwalniania doksorubicyny i idarubicyny. Z matrycy zawierającej doksorubicynę lek uwalnia się bardzo wolno w pierwszych dniach eksperymentu z powolnym narastaniem do 90 dnia. Od tego dnia obserwowana jest zwiększona degradacja matrycy. Z matrycy zawierającej idarubicynę, 80% leku uwalnia się równomiernie przez 40 dni. Przeprowadzono analizę strukturalną powyższych matryc w oparciu o spektroskopię w podczerwieni (IR). Widma IR potwierdziły obecność oddziaływań strukturalnych tj. międzycząsteczkowe wiązania wodorowe między grupą hydroksylową w cząsteczce doksorubicyny a grupą karbonylową łańcucha polilaktydu. Takie oddziaływanie są niemożliwe w przypadku idarubicyny, ponieważ w jej strukturze zamiast grupy hydroksylowej występuje grupa metylowa.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 58-60,(2006),203-206]

Wstęp

Bioresorbowalne kopolimery glikolidu i laktydu, laktydu i ε-kaprolaktonu oraz glikolidu i ε-kaprolaktonu są powszechnie stosowane jako nici chirurgiczne, implanty kostne, a także gąbki. Wspomniane kopolimery były syntezowane z zastosowaniem inicjatora cynowego, który wykazuje właściwości neurotoksyczne. Zastosowane w badaniach uwalniania antracyklin kopolimery otrzymane były w obecności inicjatora cyrkonowego, którego niską toksyczność potwierdziły badania PLGA na liniach komórkowych [1]. Antracykliny wykorzystuje się w leczeniu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, chłoniaków złośliwych, raka: skóry, sutka, płuc, narządów moczowo-płciowych, żołądka i wątroby oraz mięsako-raków kości. W celu uniknięcia niepożądanych skutków stosowania antracyklin, tj. kardiotoxyczność można zastosować matrycę z biodegradowalnego polimeru z

VARIOUS RELEASE PROFILES OF ANTHRACYCLINES AS A RESULT OF INTERACTIONS BETWEEN DRUG AND BIODEGRADABLE POLYMER MATRIX

203

K. STOKŁOSA*, J. KASPERCZYK***, P. DOBRZYŃSKI**,
B. KACZMARCZYK**

*SLESIAN UNIVERSITY OF MEDICINE,
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
1 NARCYZÓW ST., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND.

**POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY,
34 CURIE-SKŁODOWSKIEJ ST., 41-800 ZABRZE, POLAND.

Abstract

In this study presents the results of *in vitro* release of doxorubicin and idarubicin from bioresorbable matrix containing copolymer glycolide and L,L-lactide (PGLA) to artificial cerebrospinal fluid (aCFS). Microstructure of polymer chain was determined by ¹³C-NMR measurements. Profiles of doxorubicin and idarubicin release from matrices containing copolymers of glycolide and L,L-lactide, glycolide and ε-caprolactone to aCFS were studied by UV-VIS spectroscopy. In case of matrices performed from copolymer glycolide and L,L-lactide differences in doxorubicin and idarubicin release profiles were found. From matrix containing doxorubicin drug is released very slowly at first days of experiment with slowly accretion until ninetieth day. Until this day increase of matrix degradation is observed. From matrix containing idarubicin, 80% of drug is released evenly through 40 days. Structural analysis of above matrices was made by IR spectroscopy. IR spectra presence of structural interactions such as intermolecular hydrogen bonds between hydroxyl group in doxorubicin molecule and carbonyl group of polylactide were confirmed. In case of idarubicin such interactions are impossible because in idarubicin structure instead of hydroxyl group is presence methyl group.

[*Engineering of Biomaterials*, 58-60,(2006),203-206]

Introduction

Bioresorbable copolymers of glycolide and lactide, lactide and ε-caprolactone, glycolide and ε-caprolactone are commonly used as surgical sutures, bone implants and also scaffolds. Mentioned copolymers were synthesized with application of tin initiator, which neurotoxic properties were exhibited. Applied copolymers in release researches of anthracyclines were synthesized in presence of zirconium initiator, which low toxicity of PLGA at line cultures were confirmed [1]. Anthracyclines are used in treatment of proliferative diseases of haemopoietic system, malicious lymphoma, cancers of: skin, breast, lung, genitourinary system, stomach, liver and rhabdomyosarcoma. In order to avoid side effects of anthracyclines treatment such as cardiotoxicity matrix from biodegradable polymer with chemotherapeutic drug could be applied directly to cancer tissue [2]. Commercial matrix containing copolymer of 1,3-bis(p-phenoxy-carboxy)propan and sebacic acid with carmustine is called Gliadel and is used in brain gliomas treatment [3]. The aim of this study was the analysis of structure influence

cytostatykiem podanego bezpośrednio do zmienionej nowotworowo tkanki [2]. Komercyjnie dostępna matryca, zawierająca kopolimer 1,3-bis(p-fenoksykarboksy)propanu i kwasu sebacynowego z karmustyną jest znana pod nazwą Gliadel i stosowana jest w leczeniu nowotworów mózgu [3].

Celem badań była analiza wpływu struktury antracyklin na profil uwalniania z matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu do aCFS, co jest szczególnie istotne w ewentualnym zastosowaniu tychże nośników z lekiem do leczenia glejaków mózgu.

Materialy

Kopolimeryzację glikolidu z laktydem (Purac, Holandia) prowadzono w masie w temperaturze 110°C z wykorzystaniem inicjatora acetyloacetonianu cyrkonu (IV) $Zr(acac)_4$, przy stosunku molowym inicjator/komonometry wynoszącym 1/1000. Otrzymany kopolimer w celu usunięcia śladów nie przereagowanych komonomerów rozpuszczono w chloroformie i wytrącono w alkoholu metylowym, a następnie wysuszone pod próżnią do stałej masy [4].

Metody

Właściwości materiałów

Skład chemiczny badanego kopolimeru został potwierdzony przy pomocy 1H -NMR a mikrostruktura łańcucha polimerowego określona za pomocą ^{13}C -NMR (spektrometr firmy Varian Unity Inova, 300 MHz). Masy cząsteczkowe Mn i Mw kopolimeru wyznaczono stosując metodę chromatografii żelowej GPC (chromatograf Spectra Physics SP8800).

Badania uwalniania idarubicyny i doksorubicyny z matrycy polimerowej do aCSF

Z otrzymanej folii wycięto krążki o średnicy 1.2 cm i umieszczono w ampulkach. W każdej z ampulek znajdowało się 30 mg matrycy polimerowej z lekiem i 2 ml aCFS. Ekstrakty pobierano co 4 dni. Przez około 100 dni badano uwalnianie idarubicyny i doksorubicyny z matrycy polimerowej poprzez inkubację w cieplarni Memmert Precision Inkubator INE 400 w 37°C.

Pomiar absorbancji ekstraktów uwolnionej doksorubicyny i idarubicyny z matrycy polimerowej określony metodą spektroskopii UV-VIS

Analizowano stężenie uwolnionej idarubicyny [$\mu g/ml$] i doksorubicyny [$\mu g/ml$] z matrycy polimerowej przez pomiar absorbancji ekstraktów z cytostatykami w zakresie promieniowania widzialnego. Absorbancje mierzone były na spektrofotometrze V-570 UV-VIS-NIR firmy JASCO. Równanie krzywej wzorcowej pozwoliło określić ilość uwolnionej idarubicyny [μg] i doksorubicyny [μg].

Wyniki

Właściwości matryc

Analiza widm 1H -NMR określiła skład kopolimeru glikolidu i *L,L*-laktydu: 85% jednostek laktydylowych i 15% jednostek glikolidylowych, a widma ^{13}C -NMR potwierdziły mikrostrukturę łańcucha polimerowego. Metoda chromatografii żelowej wykazała, że liczbowo średnia masa cząsteczkowa kopolimeru wynosiła 119 kDa.

Analiza oddziaływań strukturalnych

RYS.2. przedstawia widmo w podczerwieni matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu i 10% wag. idarubicyny. RYS.3 przedstawia widmo IR matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu i 10% wag.

of anthracyclines on release profile from matrix containing copolymer glycolide and *L,L*-lactide to aCFS, which is very important in prospective application this carriers with drug in brain gliomas treatment.

Materials

Copolymerization of glycolide and *L,L*-lactide (Purac, Netherlands) was performed in bulk with $Zr(acac)_4$ /molar ratio of 1/1000 at 110°C. The obtained copolymer was dissolved in chloroform in order to remove unreacted monomers and precipitated into methyl alcohol and then dried in a vacuum until constant weight [4].

Methods

Properties of materials

The copolymer composition was confirmed by 1H -NMR measurements and microstructure of polymer chain was determined by ^{13}C -NMR measurements (Varian Unity Inova 300 MHz spectrometer). The molecular masses Mn and Mw of copolymers were determined by gel permeation chromatography (Spectra Physics SP8800 chromatograph).

Investigations of idarubicin and doxorubicin release from polymer matrix to aCFS

From performed matrix discs with 1.2 cm diameter were cut out and put into ampoules. In each ampoules 30 mg of matrix with drug and 2 ml of aCFS were found. Extracts were sampling per four days. During incubation in Memmert Precision Inkubator INE 400 at 37°C release of idarubicin and doxorubicin from polymer matrix were examined for about 100 days.

Absorbance measurement of released doxorubicin and idarubicin extracts from polymer matrix determined by UV-VIS spectroscopy

Concentrations of released idarubicin and doxorubicin were analyzed by absorbance measurements of drug in visible range. Absorbance were measured by JASCO V-570 UV-VIS-NIR spectrometer. Equation of standard curve allowed to stand for determination of release amount of doxorubicin [μg] and idarubicin [μg].



RYS.1. Bioresorbowalne matryce poliestrowe zawierające antracykliny: doksorubicynę (po lewej) i idarubicynę (po prawej).

FIG.1. Bioresorbable polyester matrix containing anthracyclines: doxorubicin (left) and idarubicin (right).

Results

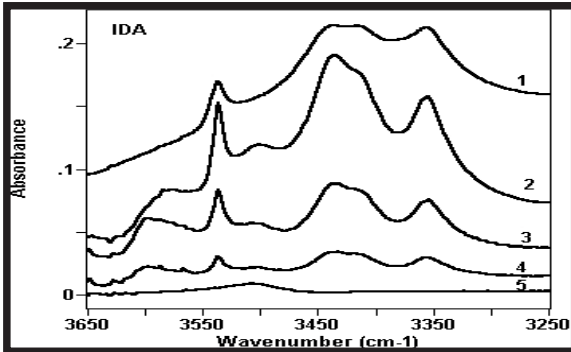
Properties of matrices

Composition of poly(glycolide-co-*L,L*-lactide) was determined by analysis of 1H -NMR spectra: 15% glycolidyl units

doksorubicyny. Pasma absorpcyjne charakterystyczne dla matrycy z doksorubicyną ulegają przesunięciu w stosunku do pasm występujących w widmie IR czystego leku. Dowodzi to, że w tym przypadku mają miejsce oddziaływania grupy hydroksylowej doksorubicyny z grupą karbonylową polilaktydu, w przeciwieństwie do matrycy z idarubicyną, dla której nie obserwuje się żadnych przesunięć.

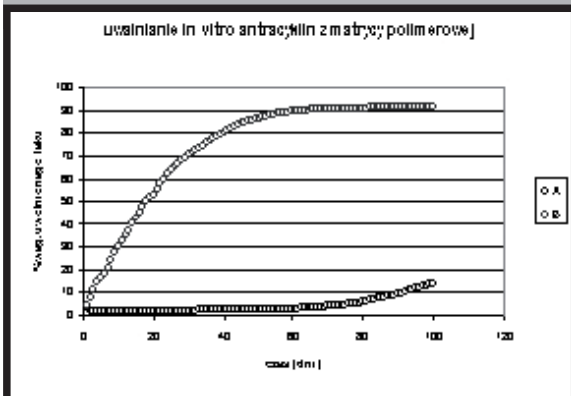
Uwalnianie *in vitro* antracyklin do aCFS

RYS.4 przedstawia kumulacyjne profile uwalniania doksorubicyny i idarubicyny do aCFS z matrycy zawierającej



RYS.2. Widma IR matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu z idarubicyną

FIG.2. IR spectra of matrix containing copolymer of glycolide and *L,L*-lactide with idarubicin
FTIR spectra of IDA: 1- IDA as KBr pellet, 2 – mixture of PGLA and IDA solution in CH_2Cl_2 , 3 - mixture of PGLA and IDA solution in CH_2Cl_2 (10 times soluble), 4 - mixture of PGLA and IDA (film after evaporating of CH_2Cl_2), 5 - PGLA (film after evaporating of CH_2Cl_2).



RYS.4. Wykresy kumulacyjne uwalniania *in vitro* antracyklin do płynu mózgowo-rdzeniowego z matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu: A – matryca zawierająca 10% wag. doksorubicyny, B – matryca zawierająca 10% wag. idarubicyny

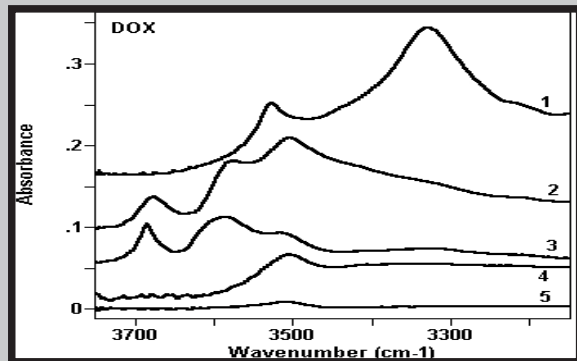
FIG.4. *In vitro* cumulative release of anthracyclines to artificial cerebrospinal fluid from matrix containing copolymer of glycolide and *L,L*-lactide: A – matrix containing 10% w/w of doxorubicin, B – matrix containing 10% w/w of idarubicin

kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu i 10% wag. leku przez około 100 dni. Widoczny jest wpływ oddziaływań grupy hydroksylowej doksorubicyny na ilość uwolnionego leku w porównaniu do profilu uwalniania idarubicyny z matrycy zawierającej

and 85% lactyl units and microstructure of polymer chain was confirmed by ^{13}C -NMR. Gel permeation chromatography showed number average molecular mass, M_n of copolymer was 119 kDa.

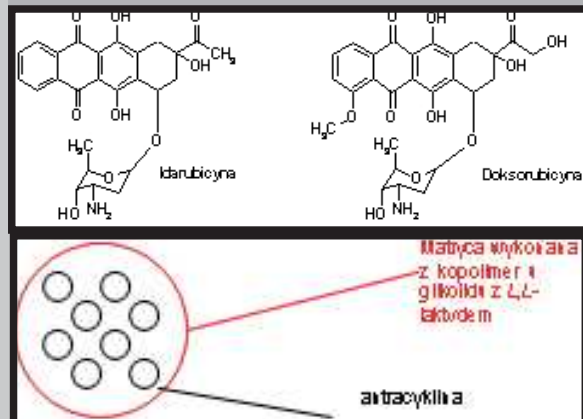
Analysis of structural interactions

FIG.2. presents IR spectrum of matrix containing copolymer glycolide and *L,L*-lactide and 10% w/w of idarubicin. FIG.3 presents IR spectrum of matrix containing copolymer glycolide and *L,L*-lactide and 10% w/w of doxorubicin. Absorption bands characteristic for matrix with doxorubicin



RYS.3. Widma IR matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktydu z doksorubicyną.

FIG.3. IR spectra of matrix containing copolymer of glycolide and *L,L*-lactide with doxorubicin.
FTIR spectra of DOX: 1- DOX as KBr pellet, 2 – mixture of PGLA and DOX solution in CH_2Cl_2 , 3 - mixture of PGLA and DOX solution in CH_2Cl_2 (10 times soluble), 4 - mixture of PGLA and DOX (film after evaporating of CH_2Cl_2), 5 - PGLA film after evaporating of CH_2Cl_2 .



RYS.5. Wzory strukturalne antracyklin, oraz schemat matrycy z lekiem.

FIG.5. Structures of anthracyclines and scheme of matrix with drug.

were shifted in comparison to bands presence in FTIR spectrum of pure drug. It proves that the interactions between hydroxyl group in doxorubicin and carbonyl group of polylactide chain take place in opposite to idarubicin for which spectrum no changes are notice.

In vitro release of anthracyclines to aCFS

FIG.4 presents cumulative profiles of doxorubicin and idarubicin to aCFS from matrix containing copolymer glycolide and *L,L*-lactide with 10% w/w of drug observed for

kopolimer glikolidu i *L,L*-laktidu. Z matrycy zawierającej dokсорubicynę lek uwalnia się bardzo wolno w pierwszych dniach eksperymentu z powolnym narastaniem do 90 dnia. Od tego dnia obserwowana jest zwiększona degradacja matrycy. Z matrycy zawierającej idarubicynę, 80% leku uwalnia się równomiernie w ciągu 40 dni. Po tym czasie ze względu na wyczerpanie się większej ilości leku znajdującego się w matrycy, jego szybkość uwalniania maleje.

Wnioski

Stwierdzono istotną różnicę w profilu uwalniania dokсорubicyny z matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktidu w stosunku do profilu idarubicyny. Widma IR potwierdziły jednoznacznie obecność międzycząsteczkowych wiązań wodorowych między grupą hydroksylową dokсорubicyny i grupą karbonylową polilaktidu. Ten rodzaj oddziaływań ma istotny wpływ na kinetykę uwalniania badanych antrycyklin.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Fundację Rozwoju Nauk Farmaceutycznych, nr grantu (3/FB/2004) oraz Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny, nr grantu (II/206/2003).

Piśmiennictwo

- [1] A. Czajkowska, M. Bero, Dobrzyński P., J. Kasperczyk. „Badanie biogodności kopolimerów glikolidu i laktidu otrzymywanych z wykorzystaniem nowego inicjatora cyrkonowego lub cynowego w oparciu o badania in vitro”, *Inżynieria Biomateriałów*, (2001), 17
- [2] J. Kasperczyk, K. Stokłosa, K. Trzepletowska-Stępień, A. Wilczok, P. Dobrzyński, M. Bero, M. Sokół, W. Przybyszewski, M. Jurkowski: „Zastosowanie bioresorbowalnych materiałów polimerowych o modelowanej strukturze do kontrolowanego uwalniania antrycyklin w terapii glejaka mózgu”, *Chemik*, 2, (2006), 95-102

POLISILOKSANOWE POWŁOKI IMPLANTÓW MEDYCZNYCH. WPŁYW PLAZMY FLUOROWEJ NA SKŁAD CHEMICZNY I WŁAŚCIWOŚCI POLISILOKSANU

DARIUSZ SZMIGIEL*, KRZYSZTOF DOMAŃSKI*, PIOTR PROKARYN*, PIOTR GRABIEC*, ELŻBIETA PAMUŁA**, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA***, BARBARA PŁYTYCZ****

*INSTYTUT TECHNOLOGII ELEKTRONOWEJ,
AL. LOTNIKÓW 32/46, 02-668 WARSZAWA

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

***AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, WYDZIAŁ ANATOMII,
AL. JANA PAWŁA II 78, 31-571 KRAKÓW

****UNIwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii, Katedra Immunologii Ewolucyjnej, ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków
E-MAIL: DAREK@CH.PW.EDU.PL

Słowa kluczowe: elastomer, polisiloksan, powłoki implantów medycznych, trawienie plazmowe, właściwości powierzchni
[*Inżynieria Biomateriałów*, 58-60,(2006),206-209]

about 100 days. Influence of interaction of hydroxyl group of doxorubicin on amount of release drug is visible in comparison to release profile of idarubicin from matrix containing copolymer of glycolide and *L,L*-lactide. From matrix containing doxorubicin drug is released very slowly at first days of experiment with slowly accretion until ninetieth day. Until this day increase of matrix degradation is observed. From matrix containing idarubicin, 80% of drug is released evenly through 40 days. After this time because of exhaustion of major amount of drug velocity of release is decreasing.

Conclusions

Differences of doxorubicin release profiles from matrix containing glycolide and *L,L*-lactide copolymer in comparison to idarubicin release profiles were noticed. IR spectra explicitly presence of intermolecular hydrogen bonds between hydroxyl group of doxorubicin and carbonyl group of polylactide were confirmed. This kind of interactions have essential influence for kinetics of investigated anthracyclines release.

Acknowledgements

This study was supported by Foundation of Pharmaceutical Sciences Development, grant (No 3/FB/2004) and Foundation for Polish Pharmacy and Medicine Development Support, grant (No II/206/2003)

References

- [3] H. Brem, P. Gabikian. "Biodegradable polymer implants to treat brain tumors", *Journal of Controlled Release*, 74, (2001), 63-67
- [4] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero: "Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by $Zr(acac)_4$ ", *Macromolecules*, 34, (2001), 5090-5098

PLASMA TREATED POLYSILOXANE COATING FOR MEDICAL IMPLANTS

DARIUSZ SZMIGIEL*, KRZYSZTOF DOMAŃSKI*, PIOTR PROKARYN*, PIOTR GRABIEC*, ELŻBIETA PAMUŁA**, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA***, BARBARA PŁYTYCZ****

*INSTITUTE OF ELECTRON TECHNOLOGY,
AL. LOTNIKÓW 32/46, 02-668 WARSAW, POLAND

**AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

***ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, FACULTY OF ANATOMY,
AL. JANA PAWŁA II 78, 31-571 KRAKOW, POLAND

****JAGIELLONIAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF ZOOLOGY,
DEPARTMENT OF EVOLUTIONARY IMMUNOBIOLOGY
UL. INGARDENA 6, 30-060 KRAKOW, POLAND

E-MAIL: DAREK@CH.PW.EDU.PL

Key words: silicone elastomer, polysiloxane, coating for medical implants, plasma etching, surface properties

[*Engineering of Biomaterials*, 58-60,(2006),206-209]