

GENTAMYCYN Z NOWEGO KOPOLIMERU BLOKOWEGO – BADANIA IV VITRO

PIOTR PROWANS

KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I CHIRURGII RĘKI PAM W SZCZECINIE

Słowa kluczowe: kopolimer, wszczepy, uwalnianie leków.

[*Inżynieria Biomateriałów 34, (2004), 38-41*]

Wstęp

Jednym z problemów związanych z wszczepianiem biomateriałów do tkanek człowieka jest ich zakażenie. Jako zabezpieczenie przed tym groźnym powikłaniem proponuje się między innymi połączenie tworzywa z antybiotykiem, który uwalniając się do tkanek istotnie zmniejsza ryzyko kolonizacji drobnoustrojami. Do profilaktyki wykorzystuje się antybiotyki o szerokim spektrum działania zabezpieczające przed możliwie dużą ilością drobnoustrojów [1]. W naszym doświadczeniu wykorzystano gentamycynę z uwagi na dobrze poznane właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne, a także dostępny na rynku reagent do oznaczania stężenia gentamycyny w płynach. Celem pracy było oznaczenie krzywej uwalniania gentamycyny z nowego kopolimeru blokowego w środowisku zasadowym obojętnym i kwaśnym.

Materiał i metoda

Próbki multiblokowego poli(alifatyczno/aromatycznego-estru) (PED) [2] zawierającego 26% wag. tereftalanu butylenu oraz 74% wag. dimeryzowanego kwasu tłuszczowego w postaci pałeczek długości 10 mm i średnicy 2,5 mm umieszczano na 24 godziny w wodnym roztworze gentamycyny o stężeniu 40 mg w 1ml i temperaturze 37°C. Następnie próbki umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 5ml wodnego roztworu 0.9% NaCl buforowanego do pH 6,4, 7,4 i 9 o temperaturze 37°C. Probówki umieszczano w termostatowanej łaźni wodnej; cplan water bath shaker typ 357. Z poszczególnych próbek pobierano po 100 mikro-l. płynu po 15 min, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 720 oraz po 24 h i 48 h. Doświadczenie powtórzono 3 razy.

Wyniki

RYSUNKI 1-3 przedstawiają krzywe uwalniania w zależności od wartości pH. Z wykonanych pomiarów wynika, że już po 15 minutach dochodziło do szybkiego wzrostu stężenia gentamycyny. Następnie w kolejnych minutach obserwowano niewielki spadek a następnie wzrost stężenia, który osiągał wartość maksymalną między 1 a 2 godziną doświadczenia. Niewielki spadek stężenia gentamycyny w środowisku zasadowym i obojętnym obserwowano po 24 godzinach, a następnie powrót do wcześniejszego stężenia w 48 godzinie doświadczenia. W środowisku kwaśnym niewielki spadek stężenia gentamycyny obserwowano po 12 godzinach a następnie powolny wzrost do wartości znaczącej.

RELEASE OF GENTAMYCIN FROM NEW COPOLYMER – *IN VITRO* STUDY

PIOTR PROWANS

CLINIC OF GENERAL AND HAND SURGERY POMERANIA
MEDICAL UNIVERSITY IN SZCZECIN

Key words: copolymer, implant, drug release.

[*Engineering of Biomaterials, 34, (2004), 38-41*]

Introduction

Infection is one of the problems in implantation of biomaterials to the human tissues. As a protection to this dangerous complication, the idea of connection of the material with antibiotic, which diffuses to surrounding tissues is applied to decrease the risk of microorganisms' colonization. A broad-spectrum of antibiotics is used in prophylaxis to protect possibly large number of bacteria [1]. In our research we used gentamycin due to well-known pharmacokinetic and physicochemical properties and also easy accessible on market reagent for titration of gentamycin in body liquids. The aim of the work was to evaluate the curve of gentamycin release from new block-copolymer in different pH.

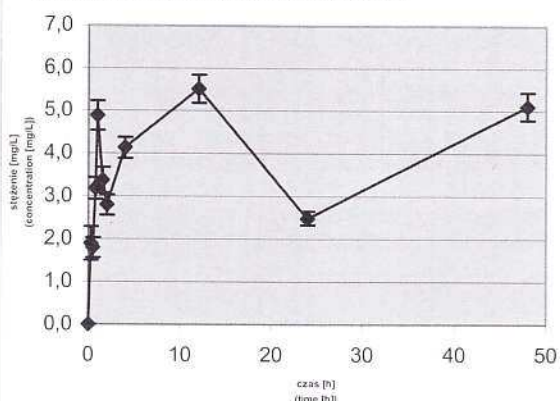
Material and method

Samples of multi-block poly(aliphatic/aromatic-ester) [2] containing 26 wt% poly(butylene terephthalate) and 74 wt% dimer fatty acid in form of rods of 10 mm in length and 2,5 mm in diameter were placed for 24 hours in an aqueous gentamycin solution of concentration of 40mg in 1ml and temperature 37°C. Then, each single rod was placed in test tube containing 5ml of aqueous 0.9% NaCl solution buffered to pH 6.4, 7.4, and 9.0 in temperature 37°C. Tubes were placed in water bath shaker type 357. 100 microliter of liquid was taken from each tube after 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 720 minutes, as well as after 24h and 48 h. Experiments were repeated 3 times.

Results

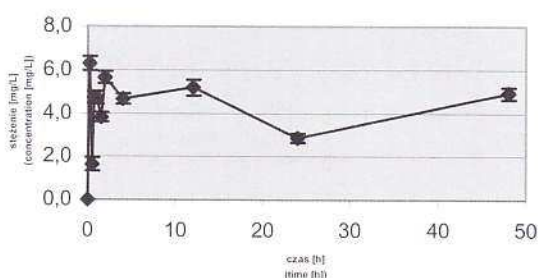
FIGURES 1-3 show gentamycin release curve in different pH. It can be seen from executed measurements, that gentamycin reaches high concentration already after 15 minutes. Then, in next several minutes small decrease was observed and then an increase of concentration, achieving maximum value between 1st and 2nd hour of experiment. Small decrease of concentration in basic and neutral environment (pH 9 and pH 7.4) was observed after 24 hours, and then it increased to earlier concentration at 48 hour. In acidic environment (pH 6.4) small decrease of concentration was observed after 12 hours and then slow rise to considerably high value than in basic and neutral environment. (FIG. 1, 2, 3).

Rys. 1 Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 9,0
(Fig. 1 Release of gentamycin from block copolymer at pH 9,0)



RYS. 1. Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 9,0.
FIG. 1. Release of gentamycin from block copolymer at pH 9.0.

Rys. 2 Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 7,4
(Fig. 2 Release of gentamycin from block copolymer at pH 7,4)



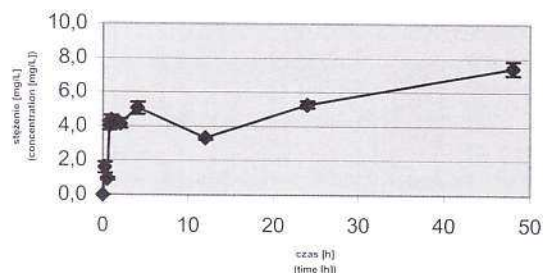
RYS. 2. Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 7,4.
FIG. 2. Release of gentamycin from block copolymer at pH 7.4.

nie przekraczających uzyskane w środowisku zasadowym i obojętnym. (RYS. 1, 2, 3).

Dyskusja

Uwalnianie antybiotyku z wszczepianych do tkanek biomateriałów uzależnione jest od wielu czynników. Struktura materiału i budowa chemiczna wpływa na rodzaj wiązań z antybiotykiem oraz na trwałość połączenia. Na szybkość uwalniania antybiotyku wpływa także pH tkanek, działanie enzymów ustrojowych, przepływ płynu tkankowego [3, 4, 5, 6]. Do celów klinicznych najbardziej przydatne jest uwalnianie antybiotyku ze stałą prędkością zapewniającą przez długi czas stężenie przewyższające minimalne stężenia hamujące (MIC) w bezpośrednim sąsiedztwie wszczepu. Zapewnia to efektywną ochronę przed zakażeniem. Gwałtowne uwalnianie powodujące zbyt wysokie stężenia antybiotyków mogą powodować uszkodzenie tkanek, hamowanie funkcji komórek odpornościowych [1]. Analizując uzyskane wyniki można wnioskować, że gentamycyna uwalnia się z kopolimeru gwałtownie w pierwszych minutach. W przy-

Rys. 3 Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 6,4
(Fig. 3 Release of gentamycin from block copolymer at pH 6,4)



RYS. 3. Uwalnianie gentamycyny z kopolimeru blokowego przy pH 6,4.
FIG. 3. Release of gentamycin from block copolymer at pH 6.4.

Discussion

Antibiotic release from grafted implant to tissues depends from many factors. Structure and chemical composition of biomaterial influences kind of bonds with antibiotic as well as durability of connection. Various factors influences speed of antibiotic release including pH of tissues, constitutional enzymes action or local liquid perfusion [3, 4, 5, 6]. For medical purposes, the most useful is release of antibiotic with constant rate assuring stable concentration exciding minimum inhibitory concentration (MIC) for a long time in direct surrounding of implant. It assures an effective protection against infection. Rapid release giving too high concentrations of antibiotics can cause damage of tissues, inhibition of immune cells [1]. Analyzing results it is possible to conclude, that gentamycin has violently rapid release in first minutes. In case pH 7.4 and 9.0 considerable decrease of concentration was observed after 24 hours, which maintained stable in next day. It is possible that decrease of concentration was caused by aminolysis of bonds in antibiotic-polymer complex. Such effect was not observed at pH 6.4 where gentamycin concentration constantly grew up. In acidic environment we can expect an autocatalytic reactions leading to increase of -COOH groups concentration of copolymer, which react with NH_2 groups of gentamycin creating stable amide bonds. Experiment demonstrates that low pH could increase release of gentamycin in final stage. In infected tissues pH drops, therefore an increase of gentamycin release from copolymer is very attractive property. It is necessary to keep in mind, that conditions in vitro give only guidance for in vivo research. Evaluation of gentamycin release from implanted copolymer to living tissues demands completing of separate tests on animals.

Acknowledgements

This work was financed in frame of KBN project No. 4T09B 10822.

padku pH 7,4 i 9 zaobserwowano znaczny spadek stężenia po 24 godzinach, który wyrównywał się w następnej dobie. Być może spadek stężenia był spowodowany aminolizą wiązań w antybiotyku. Efektu tego nie obserwowano dla pH 6,4 a stężenie uwolnionej gentamycyny stale wzrastało. W środowisku kwaśnym możemy spodziewać się autokatalitycznego wzrostu stężenia grup -COOH kopolimeru, które dobrze reagują z grupami NH_2 gentamycyny tworząc stabilne ugrupowania amidowe. Z wykonanego doświadczenia wynika, że niskie pH może zwiększać uwalnianie gentamycyny w końcowej fazie. W tkankach objętych infekcją pH obniża się, więc zwiększenie uwalniania gentamycyny z kopolimeru jest jak najbardziej porządne. Należy pamiętać, że warunki *in vitro* dają tylko podstawy do określenia przebiegu badanych zjawisk w organizmie żywym. Ocena uwalniania gentamycyny z kopolimeru wszczepionego do tkanek wymaga przeprowadzenia oddzielnego doświadczenia na zwierzętach.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 4T09B 10822.

References

- [1] Bielawski J.: Miejscowa aplikacja antybiotyków w chirurgii urazowo-ortopedycznej. Materiały konferencji naukowo-szkoleniowej, Sosnówka Góra 12-13 kwietnia (1991), 15-102.
- [2] El Fray M., Stonecki J.: Multiblock copolymers consisting of polyester and polyaliphatic blocks, *Angew. Makromol. Chem.*, 234, (1996), 103-109.
- [3] Grzybowski J., Antos-Bielska M., Ołdak E., Trafny E.: Release of antibiotics from collagen dressing. *Polimers in Medicine*, T 28, Nr 3-4, (1997), 3-9.
- [4] Kwok C.S., Wan C., Hendricks S., Bryers J.D., Horbett T.A., Ratner D.: Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *Journal of Controlled Release*, 62, (1999), 289-299.
- [5] Radin S., Ducheyne P., Kamplain T., Tan B.H.: Silica sol-gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and *in vitro* release. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 2, (2001), 313-320.