

IMMOBILIZACJA GENTAMYCYNY NA NOŚNIKACH HYDROKSYAPATYTOWYCH W CELU NADANIA IM WŁASNOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH

BELCARZ A.*, ZALEWSKA J.*, GINALSKA G.*, ŚLÓSARCYK A.**

*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-950 LUBLIN, POLSKA

**KATEDRA TECHNOLOGII I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),34-36]

Porowaty hydroksyapatyt (HA) stanowi doskonały syntetyczny substytut kości używany w chirurgii kości i powiększeniach twarzoczaszki (Cottrell & Wolford, 1998) ze względu na swoją biokompatybilność i osteoprzewodność. Według Holmesa, w okresie 5-16 miesięcy po operacji około 50% implantu zostaje zastąpionych przez tkanki kostne lub miękkie (Holmes et al., 1988). Aktualne statystyki podają, że odpowiednio w 2% lub 4% przypadków operacji biodra lub kolana wywołują się infekcje, ale liczby te zwiększają się do 50% w przypadkach użycia zewnętrznych stabilizatorów złamań (Stigter et al., 2002). Przyczyną tych zjawisk jest słaba dostępność zainfekowanych obszarów kości przez systemowo dostarczane antybiotyki. Pożądaną alternatywą tej terapii jest zatem antybiotykowa terapia miejscowa, pozwalająca na lokalne kontrolowane dostarczanie antybiotyku do zakażonego miejsca. W tym celu antybiotyki wprowadzane są zazwyczaj do cementu hydroksyapatytowego poprzez fizyczną inkorporację do nośnika (Stigter et al., 2002; Buranapanitkit et al., 2004; Joosten et al., 2004, 2005; Baro et al., 2002).

Głównym celem pracy było antybakteryjne zabezpieczenie HA poprzez jego fizyczno-chemiczne wiązanie z gentamycyną.

Procedura immobilizacji antybiotyku została przeprowadzona według zgłoszenia patentowego (Ginalska, 2003). Aktywną HA γ -aminopropyltrietyloksyilanem przeprowadzono według procedury Weethala (1976), a keratynę przyłączyła kowalencyjnie do silanizowanych HA według procedury własnej. Stężenie gentamycyny określano metodą spektrofotometryczną według metody Frutos Cabanillas (2000). Cechy nośników hydroksyapatytowych (uzyskanych z Katedry Technologii i Ceramiki, AGH w Krakowie) podano w TABELI I. Wynika z niej, że im niższa temperatura ich syntezy, tym mniejsza jest gęstość nośników, a większa ich porowatość i ilości keratyny związanej na powierzchni.

Wyniki immobilizacji gentamycyny na HA prezentuje TA-

GENTAMICIN IMMOBILIZATION ON HYDROXYAPATITE CARRIERS FOR INCREASING THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES

BELCARZ A.*, ZALEWSKA J.*, GINALSKA G.*, ŚLÓSARCYK A.**

*CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 20-950 LUBLIN, POLAND

**CHAIR OF TECHNOLOGY AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30-059 KRAKÓW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),34-36]

Porous hydroxyapatite (HA) is an excellent synthetic bone substitute used in orthognathic surgery and craniofacial augmentation (Cottrell & Wolford, 1998) for its biocompatibility and osteoconductivity. According to Holmes, within a postoperative period of 5 - 16 months about 50% of a whole implant is usually replaced by bone or soft tissues (Holmes et al., 1988). Recent statistics estimate the current incidence of infections to be around 2% and 4% in total hip and knee arthroplasties, respectively, but these figures can increase to 50% when external fracture fixators are used in trauma surgery (Stigter et al., 2002). The reason lies in a poor accessibility of the bone-infected site by systematically delivered antibiotic. The local therapy is therefore a desired alternative, allowing for a control delivery of antibiotics to infected sites. For this purpose, antibiotics are usually introduced to hydroxyapatite cement via their physical incorporation to the carrier (Stigter et al., 2002; Buranapanitkit et al., 2004; Joosten et al., 2004, 2005; Baro et al., 2002).

Main aim of the research was the obtaining of antibacterial protection of HA via its physico-chemical binding with gentamicin.

Immobilization procedure was performed according to our Patent pending (Ginalska, 2003). HA was activated by γ -aminopropyltriethoxysilane according to Weethal's method (1967), keratin was covalently immobilized to silanized HA according to our own procedure. Gentamicin concentration was estimated spectrophotometrically after Frutos Cabanillas (2000). Properties of hydroxyapatite carriers (obtained from Chair of Technology and Ceramics, AGH, Kraków) are presented in TABLE I. The data lead to the conclusion that the lower is HA synthesis temperature, the lower is HA density but the higher carrier porosity and amount of keratin immobilized on its surface.

Results of gentamicin immobilization on HA are presented in TABLE II. Temperature of HA synthesis exerts a significant effect on amount of the antibiotic retained on the car-

Nośnik Carrier	Temp. syntezy Synthesis temp. °C	Porowatość otwarta Open porosity (%)	Gęstość pozorna Apparent density (g/cm ³)	Porowatość całkowita Total porosity (%)	Średni rozmiar porów Average pore diameter (µm)	Ilość keratyny mg/g HA Amount of keratin mg/g of HA
I	800	67,0	1,017	72,6	0,09	16,29
II	900	66,5	1,040	71,5	0,18	8,304
III	1000	59,8	1,265	62,9	0,25	7,356
IV	1050	44,6	1,676	-	-	3,444
V	1100	36,9	1,987	-	-	2,976
VI	1150	29,6	2,192	32,8	0,43	2,094

TABELA I. Częściowa charakterystyka nośników hydroksyapatytowych (HA).

TABLE I. Partial characteristics of hydroxyapatite carriers (HA).

rier - the higher it is the less gentamicin binds to hydroxyapatite. The highest amounts of antibiotics retained (by physical adsorption, ionic interactions and covalent bonds) on

Nośnik Carrier	Silanizowany Silanized			Pokrywany keratyną Keratin-sealed			Nie modyfikowany (kontrola) Non-modified (control)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	2,364	1,828	1,828	2,500	1,326	1,187	1,628	0,727	0,558
II	1,478	1,026	1,026	2,458	1,639	1,577	1,136	0,404	0,392
III	1,342	1,035	0,997	1,608	0,951	0,811	1,028	0,445	0,411
IV	1,152	0,985	0,952	1,444	1,155	0,958	0,558	0,388	0,355
V	1,384	1,040	0,915	1,532	0,920	0,645	0,348	0	0
VI	0,928	0,570	0,501	0,232	0	0	0,226	0	0

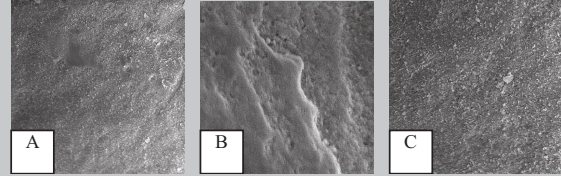
TABELA II. Ilość gentamycyny unieruchomionej na modyfikowanych i kontrolnych nośnikach HA (mg/g nośnika). A-całkowita; B-związana jonowo i kowalencyjnie; C-związana kowalencyjnie.
TABLE II. Gentamicin amount immobilized on modified and control HA carriers (mg/g carrier). A-total; B-ionically and covalently bound; C-covalently bound.

BELA II. Temperatura syntezy hydroksyapatytów wywiera wyraźny wpływ na ilość zatrzymanego na nośniku antybiotyku - im jest większa, tym mniej gentamycyny wiąże się do HA. Największe całkowite ilości antybiotyku zatrzymanego (przez adsorpcję fizyczną, wiązania jonowe i kowalencyjne) na nośniku - do 2,5 mg/g HA - stwierdzono dla nośników pokrywanych keratyną w porównaniu z silanizowanymi czy kontrolnymi (z wyjątkiem HA VI). Ilości gentamycyny związanej kowalencyjnie są generalnie porównywalne dla HA silanizowanych i białkowanych i sięgają nawet do 1,8 mg/g HA. Ilość jonowych połączeń antybiotyk-HA jest znaczna dla nośników keratynowanych, a praktycznie brak ich w przypadku HA silanizowanych.

Powyższe obserwacje potwierdzone zostały przez wyniki zahamowania wzrostu *E. coli* (ATCC 25922) przez hydroksyapatyty zawierające gentamycynę całkowitą lub też związaną jonowo i kowalencyjnie (Tabela III). Wielkość zoni inhibicji wzrostu *E. coli* jest tym większa, im niższa jest temperatura syntezy HA. Zauważalny jest pozytywny wpływ obecności keratyny na ilość wiązań jonowych pomiędzy antybiotykiem a zmodyfikowanym nośnikiem - nawet dla nośnika spiekane w temp. 1150°C ich obecność wywołuje znacznie większą inhibicję wzrostu *E. coli* niż nośniki silanizowane lub nieaktywowane (kontrolne).

Kolejne doświadczenia wykonywano z użyciem nośnika HA I, dla którego uzyskano najlepsze wyniki immobilizacji gentamycyny. Zdjęcia SEM hydroksyapatytu I (800°C) wykazały, że modyfikacja nośnika silanem nie zmienia jego struktury powierzchniowej w porównaniu z kontrolą (RYS.1). Natomiast na nośniku modyfikowanym keratyną zauważa się obecność włókien keratyny pokrywających nośnik. Nośnik HA I przechowywano przez 4 miesiące w temperaturze pokojowej w celu sprawdzenia długotrwałej aktywności antybakteryjnej tak modyfikowanych hydroksyapatytów. Stwierdzono, że HA I zachował swoje antybakteryjne właściwości wobec *E. coli*, co widać najlepiej dla próbek zawierających gentamycynę związaną poprzez wszystkie trzy typy oddziaływań. Działanie gentamycyny związanej jonowo jest najsilniejsze w przypadku HA keratynowanego, zaś wpływ inhibujący antybiotyku związanej kowalencyjnie w warunkach testowych obserwowany jest w bezpośrednim kontakcie HA z bakteriami (RYS.2).

Reasumując: wykazano, że immobilizacja gentamycyny na nośnikach hydroksyapatytowych wiąże się z występowaniem trzech typów oddziaływań: bierniej adsorpcji, sił jonowych i wiązań kowalencyjnych. Ilość gentamycyny związanej przez HA jest tym większa, im niższa jest temperatura jego syntezy. Ilość antybiotyku związanej z HA jonowo jest wyraźnie największa w przypadku modyfikacji nośnika keratyną. Modyfikowane hydroksyapatyty nie tracą swych antybakteryjnych właściwości po 4 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.



RYS.1. Zdjęcia SEM (x2000) nośników HA I (800°C) silanizowanych (A) lub pokrywanych keratyną (B) ze związaną gentamycyną. HA nieaktywowany stanowi kontrolę (C).

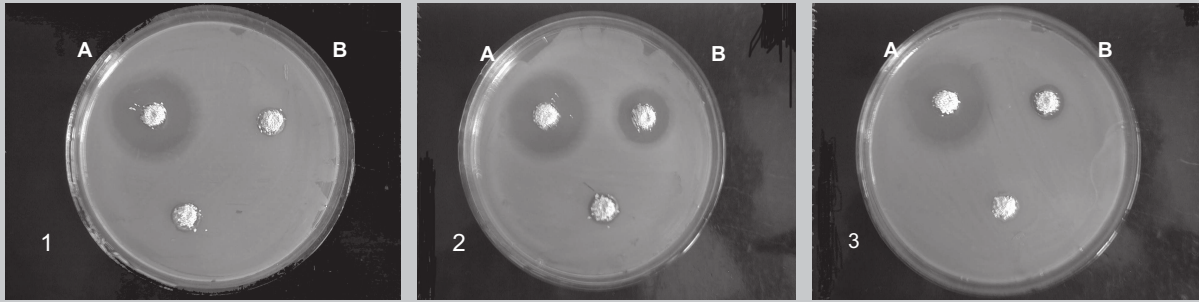
FIG. 1. SEM photographs (x 2000) of HA carriers silanized (A) or keratin-sealed (B) with immobilized gentamicin. Non-activated HA I (800°C) (C) serves as control.

carrier - up to 2.5 mg/g HA - were found for keratin-sealed carriers when compared with silanized or control ones (except of HA VI). Amounts of gentamicin covalently bound are generally comparable for HA silanized and protein-coated; they reach up to 1.8 mg/g HA. Amount of ionic antibiotic-HA interactions is significant for keratin-sealed carriers, but practically undetectable in case of silanized HA. The above observations were confirmed by results of inhibition of *E. coli* (ATCC 25922) growth by HA with total gentamicin or HA with ionically and covalently bound antibiotic (Table III). The dimensions of *E. coli* growth inhibition zones are the bigger, the lower is HA synthesis temperature. Positive effect of keratin presence on amount of ionic interactions between the antibiotic and modified carrier is noticeable. Even for HA VI, synthesized at 1150°C, their presence results in much more significant inhibition of *E. coli* growth than for silanized or non-activated (control) carrier. Further experiments were performed on HA I because the best results of gentamicin immobilization were obtained for this carrier. SEM micrographs of HA I (800°C) showed that modification of hydroxyapatite by γ -aminopropyltriethoxysilane does not change its surface structure when

Nośnik Carrier	Silanizowany Silanized		Pokrywany keratyną Keratin-sealed		Nie modyfikowany (kontrola) Non-modified (control)	
	A	B	A	B	A	B
I	33,5	19	34	22,5	32	24,5
II	31	14	31	21	32	20
III	29	11	28	18	29	14
IV	25,5	12,5	30	19,5	25	0
V	27	16	27	20,5	27	0
VI	28,5	10	26	17	26	0

TABELA III. Strefy zahamowania wzrostu (w mm) *E. coli* na płytkach z podłożem Mueller-Hinton jako efekt działania gentamycyny unieruchomionej na nośnikach HA (50 mg). Nośniki zawierały gentamycynę całkowitą (A) i związaną jonowo i kowalencyjnie (B).

TABLE III. Zones of *E. coli* growth (mm) on Mueller-Hinton agar plates as a function of gentamicin immobilized on HA carriers (50 mg) activity. The carriers contained the total gentamicin (A) and the ionically and covalently bound (B).



RYS. 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* na płytkach z podłożem Mueller-Hinton jako efekt działania gentamycyny unieruchomionej na nośniku HA I (50 mg) po 4 miesiącach przechowywania w R/T. Nośniki zawierały gentamycyną całkowitą (A), związaną jonowo i kowalencyjnie (B) oraz związaną kowalencyjnie (C). 1-HA silanizowany, 2-HA pokrywany keratyną, 3-HA nieaktywowany (kontrolny).

FIG. 2. Zones of *E. coli* growth inhibition on Mueller-Hinton agar plates as a function of gentamicin immobilized on HA I carrier (50 mg) activity after 4 months of storage at R/T. The carriers contained the total gentamicin (A), ionically and covalently bound gentamicin (B) and covalently bound gentamicin (C). 1-HA silanized, 2-HA keratin-sealed, 3-HA non-activated (control).

compared with control HA (FIG.1). However, the presence of protein fibers is well visible on surface of keratin-sealed hydroxyapatite.

The HA I carrier was stored for 4 months at room temperature in order to test the long-lasting antibacterial activity of such modified hydroxyapatite. It was found that HA I remained active against *E. coli* after this period; the most significant antibacterial activity of this carrier is observed for samples containing gentamicin bound via all three types of interactions. Activity of ionically bound gentamicin was the highest for keratin-sealed HA. In the experiment conditions, the inhibiting effect of covalently bound antibiotic was observed upon direct contact with bacterial cells (FIG.2).

To sum up: It was shown that gentamicin binds on hydroxyapatite carriers due to appearance of three types of interactions: passive adsorption, ionic interactions and covalent bonds. Amount of gentamicin bound to HA is the higher, the lower is temperature of HA synthesis. Amount of antibiotic ionically bound to HA is the highest in case of keratin-sealed carrier. The modified hydroxyapatites retain their antibacterial activities after 4 months of storage at room temperature.

Piśmiennictwo

- [1] Baro M., Sanchez E., Delgado A., Perera A., Evora C. In vitro and in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J. Contr. Release* 83 (2002), 353-364.
- [2] Buranapanitkit B., Srinilta V., Ingving N., Oungbho K., Geater A., Ovatlarnporn C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin. Orthopaedics Rel. Res.* 424 (2004), 244-252.
- [3] Cottrell D. A. & Wolford L. W. Long-term evaluation of the use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56 (1998), 935-942.
- [4] Frutos Cabanillas P., Diez Pena E., Barrales-Rienda J. M., Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int. J. Pharm.* 209 (2000), 15-26.
- [5] Ginalska G., Uryniak A., Łoborzewski J., Osińska M. A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934 (2003).

References

- [6] Holmes R. E., Wardrop R. W., Wolford L. M. Hydroxyapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery: Histologic and histometric findings. *J. Oral Maxillofac Surg.* 46 (1988), 661-671.
- [7] Joosten U., Joist A., Frebel T., Brandt B., Diederichs S., von Eiff C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: Studies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 25 (2004), 4287-4295.
- [8] Joosten U., Joist A., Gosheger G., Liljenqvist U., Brandt B., von Eiff C. Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 26 (2005), 5251-5258.
- [9] Stigter M., de Groot K., Laroye P. Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials* 23 (2002), 4143-4153.
- [10] Weethal H. Covalent coupling methods for inorganic support material. *Methods Enzymol.* 44 (1967), 134-148.