

# MIKROGRANULE HYDROKSY- APATYTOWE POKRYWANE POLI(D,L-LAKTYDEM) JAKO IMPLANT KOSTNY I NOŚNIK ANTYBIOTYKU

AGNIESZKA JELONEK<sup>1\*</sup>, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA<sup>1</sup>,  
PAWEŁ MYCIŃSKI<sup>2</sup>, JOANNA ZARZECKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ZAKŁAD KRYSZTAŁOCHEMII I KRYSZTAŁOFIZYKI,  
WYDZIAŁ CHEMII UNIwersYTETU JagIELLOŃSKIEGO,  
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW

<sup>2</sup> ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ Z ENDODONCJĄ,  
INSTYTUT STOMATOLOGII,  
UNIwersYTET JagIELLOŃSKI-COLLEGIUM MEDICUM,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

\* E-MAIL: JELONEK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

## Streszczenie

*Wciąż nie udało się otrzymać implantu kostnego, który charakteryzowałby się wysoką biozgodnością i bioaktywnością, osteokonduktywnością, odpowiednimi właściwościami mechanicznymi oraz dobrą poręcznością chirurgiczną. Dodatkową zaletą tego typu materiału powinna być możliwość dostarczenia antybiotyku w wybrane miejsce ludzkiego organizmu w celu zapobiegania rozwojowi potencjalnych infekcji związanych z jego wszczepianiem.*

*Opracowano nowy kompozytowy nośnik leku, składający się z porowatych granul hydroksyapatytowych pokrywanych poli(D,L-laktydem) z klindamycyną, mający znaleźć zastosowanie jako implant kostny w chirurgii szczękowo-twarzowej. Właściwości materiałów wykorzystanych do produkcji implantu zostały zbadane z użyciem metod XRD, FTIR, BET oraz DSC. Rozmiar i morfologię granul (250-1000 μm) określono za pomocą mikroskopii SEM. Technika ta posłużyła także do określenia rozmiaru (10-40 μm) oraz rozmieszczenia porów. Udział objętościowy porów został oszacowany za pomocą metody hydrostatycznej. Przygotowano cztery grupy granul z różną zawartością klindamycyny. Zbadano właściwości uwalniania (trwającego 15-22 dni) leku z warstwy polimerowej. Od pierwszej godziny, aż do końca eksperymentu, obserwowano aktywność bakteriobójczą uwolnionej klindamycyny. W przypadku dwóch grup granul przez pierwszych pięć dni szczep bakteryjny gronkowca złocistego wykazywał wrażliwość lub średnią wrażliwość na uwolniony lek. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dowodzą, że opisywany kompozyt może znaleźć zastosowanie jako potencjalny implant kostny i nośnik leków. Prowadzone są dalsze badania nad zaprezentowanym materiałem.*

**Słowa kluczowe:** granule hydroksyapatytowe, poli-laktyd, kompozyt, kontrolowane uwalnianie leku, implant kostny

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 19-29]

# HYDROXYAPATITE MICROSPHERES COATED WITH POLY(D,L-LACTIDE) AS BONE FILLER AND ANTIBIOTIC DELIVERY SYSTEM

AGNIESZKA JELONEK<sup>1\*</sup>, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA<sup>1</sup>,  
PAWEŁ MYCIŃSKI<sup>2</sup>, JOANNA ZARZECKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF CRYSTAL CHEMISTRY AND CRYSTAL PHYSICS,  
FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,  
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY AND ENDODONTICS,  
INSTITUTE OF DENTISTRY,  
JAGIELLONIAN UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW, POLAND

\* E-MAIL: JELONEK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

## Abstract

*The problem of developing the bone implant, characterized by high biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity, suitable mechanical properties and good surgical handiness, is still not solved. Additional advantage of such material should be the capability of delivering an antibiotic to a chosen part of the human body in order to prevent occurrence of post-operative infections.*

*A novel drug delivery system, composed of porous hydroxyapatite granules with poly(D,L-lactide) coating incorporating clindamycin, was engineered for use as a bone filler in oral and maxillofacial surgery. The properties of the materials, used to obtain the implant, were examined by the use of XRD, FTIR, BET and DSC methods. The size (250-1000 μm) and morphology of granules were determined with SEM. This technique was also applied to investigate the size (10-40 μm) and distribution of pores. The solvent accessible pore volume was evaluated by the hydrostatic method. Four groups of granules with different concentrations of clindamycin were prepared. The properties of drug release (lasting 15 to 22 days) from the polylactide layer were studied. The antimicrobial activity of the released clindamycin was observed from the first hour till the end of the experiment. The Staphylococcus aureus strain was susceptible or intermediately susceptible to the released drug during first 5 days for two studied groups. These experimental results indicate that the studied composite material may be used as a potential bone implant and drug carrier. The described system is still under investigation.*

**Keywords:** hydroxyapatite granules, polylactide, composite, controlled drug release, bone implant

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 19-29]

Kość jest naturalnym kompozytem składającym się z organicznej matrycy, którą stanowi kolagen oraz z nieorganicznej fazy ceramicznej - hydroksyapatytu. Dodatkowo kość zawiera wodę oraz niewielką ilość innych substancji organicznych, takich jak białka, polisacharydy i lipidy. Dzięki swojej budowie, kość charakteryzuje się dużą elastycznością oraz dobrymi właściwościami mechanicznymi [1,2]. Dlatego najodpowiedniejszym implantem kostnym do zastosowań w chirurgii twarzoczaszki wydaje się być materiał kompozytowy, który łączy w sobie twardość i sztywność ceramiki z elastycznością i wytrzymałością polimeru.

Hydroksyapatyt jest materiałem ceramicznym, którego skład jest zbliżony do składu mineralnej fazy kości. Cechy takie jak: biogodność, bioaktywność, osteokonduktywność i odporność w środowisku biologicznym czynią go dobrym materiałem zastępczym dla kości. Niska wytrzymałość mechaniczna ogranicza jednak jego zastosowanie do miejsc w organizmie nie przenoszących dużych obciążeń mechanicznych. Hydroksyapatyt może być stosowany w ortopedii w postaci proszku, granul, bloków oraz pokryć [3,4]. Jedną z najważniejszych cech implantów ceramicznych jest ich porowatość. Dzięki fizycznemu „zakotwiczeniu” kości w porach materiału, tworzy się silne wiązanie między implantem a tkanką kostną. Wrastanie tkanki kostnej w materiał (osteointegracja) jest możliwe, gdy pory mają odpowiednie rozmiary i morfologię oraz są ze sobą połączone. Biologiczne połączenie występuje w przypadku porów o rozmiarach 100-200  $\mu\text{m}$ . Wówczas obserwuje się wrastanie w implant tkanki kostnej wraz z naczyniami krwionośnymi. Istnieją również doniesienia, według których optymalny rozmiar porów to 250-300  $\mu\text{m}$  [5]. Aby osteointegracja miała miejsce, średnica połączeń między porami powinna wynosić co najmniej 20  $\mu\text{m}$ , zaś średnica mikroporów - 50  $\mu\text{m}$  [4]. Adsorpcja białek oraz różnicowanie komórek kostnych w implancie następuje nawet w przypadku porów o mniejszych rozmiarach [2].

Polilaktyd należy do biodegradowalnych poli( $\alpha$ -hydrokseystrów) [6]. Występuje w formie dwóch izomerów optycznych: D- i L-laktydu oraz jako ich racemiczna mieszanina - D,L-laktyd. Polilaktyd charakteryzuje się stosunkowo dobrą biogodnością i wytrzymałością mechaniczną, które sprawiają, że materiał ten wykorzystywany jest w medycynie jako tworzywo do produkcji nici chirurgicznych, membran oraz nośników leków [7]. Biogodność polilaktydu zależy od masy cząsteczkowej, udziału stereoizomerów D i L, formy implantu oraz techniki jego wytwarzania [8]. W środowisku ludzkiego organizmu polilaktyd ulega degradacji hydrolytycznej. Polimer rozkłada się na oligomery, a następnie na monomery kwasu mlekowego, które następnie są wykorzystywane w cyklu Krebsa [8-10].

Pomimo postępu w medycynie oraz wysokiego poziomu sterylności na salach operacyjnych, nadal istnieje ryzyko wystąpienia infekcji pooperacyjnych. Typowym zakażeniem kostnym pojawiającym się po implantacji jest zapalenie kości i szpiku (łac. Osteomyelitis). Najczęściej zapalenie to wywołane jest przez mikroorganizmy, takie jak gronkowce (w tym gronkowiec złocisty – *Staphylococcus aureus*), pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) oraz rzadziej pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) [11]. W celu zapobiegania rozwojowi infekcji zalecana jest pooperacyjna terapia antybiotykowa. Jednym z antybiotyków, szeroko stosowanych w profilaktyce i leczeniu infekcji kostnych i zębowych, jest klindamycyna. Lek ten posiada szerokie spektrum aktywności antibakteryjnej in vitro i osiąga wysoki poziom w ślinie, płynie dziąsłowym oraz w kościach [12]. W celu dostarczenia substancji antibakteryjnej do źródła zakażenia oraz aby uniknąć wystąpienia potencjalnych skutków ubocznych ogólnej terapii antybiotykowej, projektuje się nośniki leków.

Bone may be considered as a natural composite. The bone matrix consists of the organic polymer phase – collagen and the inorganic ceramic phase – hydroxyapatite. Additionally, bone contains water and small amounts of other organic substances such as proteins, polysaccharides and lipids. Because of its structure, bone is characterized by high flexibility and good mechanical properties [1,2]. Therefore, the most suitable bone implant for maxillofacial surgery should be a composite material, which combines the ceramic hardness and stiffness with the polymer elasticity and toughness.

Hydroxyapatite is a ceramic material, the composition of which is similar to that of the mineral phase of bone. Its biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity and stability in biological environment make hydroxyapatite a good bone substitute. However, the relatively low mechanical strength of hydroxyapatite limits its application to the tissues, which are exposed to low mechanical stress. Hydroxyapatite may be applied in orthopaedics as powder, granules, blocks and coatings [3,4]. One of the most important features of ceramic implants is porosity. Due to physical interlock, the pores could provide strong bonding of bone to the material. Bone tissue ingrowth into the implant (osteointegration) is possible if pores have proper dimensions, morphology and if they are interconnected. The optimal pore size for biological connection is 100-200  $\mu\text{m}$ . In this case bone ingrowth and vascularisation are observed. According to some researchers, the most favourable pores' diameter is 250-300  $\mu\text{m}$  [5]. The minimal suitable size of the interconnections providing osteointegration is above 20  $\mu\text{m}$ , while the macropores' diameter should reach at least 50  $\mu\text{m}$  [4]. Protein adsorption and adhesion of osteogenic cells occur even for smaller pores [2].

Poly lactide is a biodegradable poly( $\alpha$ -hydroxyester) [6], which occurs in three forms: the stereoisomers L- and D-lactide and a racemic mixture - D,L-lactide. The characteristic features of poly lactide are: relatively good biocompatibility and mechanical strength, which allow for its application in medicine as the material for sutures, implants, membranes and drug carriers [7]. The biocompatibility of poly lactide depends on the molecular weight, stereocopolymer composition, implant design and processing techniques [8]. In the human body environment the hydrolytic degradation of poly lactide takes place. The polymer decomposes to oligomers and further to lactic acid monomers, which participate in the Krebs cycle [8-10].

In spite of the progress in medicine and the high level of sterility in the operating rooms, a risk of post-operative infection still exists. A typical bone tissue infection after implantation is osteomyelitis. The most commonly osteomyelitis is caused by microorganisms such as staphylococci (including *Staphylococcus aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* and more rarely, *Escherichia coli* [11]. To prevent the development of infection, a carefully chosen antibiotic post-operative therapy is recommended. One of the antibiotics widely used in medicine for prophylaxis and for the treatment of bone and dental infections is clindamycin. This drug has a broad-spectrum of the antimicrobial activity in vitro and achieves high level in saliva, gingival crevicular fluid and bone [12]. To deliver an antimicrobial agent to the source of the infection and to avoid any potential adverse side effects of systemic antibiotic treatment, drug carriers are designed.

W artykule zaprezentowano nowy hydroksyapatytowo-poli(D,L-laktydowy) kompozytowy implant kostny, który pełni również rolę nośnika leków. Przedstawiony materiał zaprojektowany został w taki sposób, aby łączyć w sobie zalety wchodzących w jego skład materiałów, jednocześnie eliminując wady dotychczasowych tego typu implantów prezentowanych w publikacjach lub dostępnych na rynku. W celu uzyskania możliwie najlepszej poręczności chirurgicznej kompozyt ma formę granul o zróżnicowanym rozmiarze (250-1000  $\mu\text{m}$ ), dzięki czemu może dokładnie wypełnić ubytki kostne nawet o najbardziej skomplikowanych kształtach (zróżnicowana wielkość granul polepsza ich upakowanie w ubytku). Hydroksyapatytowe granule, dzięki swojej porowatości, stanowią rusztowanie dla wrastającej w nie kości. Specjalnie dobrany biodegradowalny polimer pokrywający granule (poli(D,L-laktyd)) poprawia wytrzymałość mechaniczną implantu oraz pełni funkcję matrycy dla antybiotyku. Zastosowanym lekiem bakteriobójczym jest klindamycyna, która charakteryzuje się szerokim spektrum działania i stosowana jest do leczenia zakażeń, między innymi tkanek miękkich, kości oraz zakażeń wywołanych przez bakterie beztlenowe w stomatologii. Dodatkową zaletą naszego materiału jest stosunkowo niski koszt jego otrzymania. Dokonano zgłoszenia prezentowanego wynalazku w Urzędzie Patentowym RP (nr P.403470).

## Materiały i metody

### Synteza hydroksyapatytu

Syntetyczny proszek hydroksyapatytowy (HAp) został otrzymany z  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  cz.d.a. (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) oraz 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  cz.d.a. (Lach-Ner, s.r.o. Republika Czeska) za pomocą mokrej metody strąceniowej [13], temperatura reakcji wynosiła około 40°C. Otrzymany produkt wysuszono w temperaturze 80°C i zmielono w młynku. Proszek został następnie poddany procesom kalcynacji w 800°C lub spiekania w 1200°C, z których każdy trwał trzy godziny. Skład chemiczny końcowych produktów potwierdzono metodą dyfraktometrii proszkowej oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR.

### Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD) i spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

Pomiar dyfraktometryczny (XRD) dla kalcynowanego i spiekane go proszku hydroksyapatytowego został przeprowadzony z użyciem dyfraktometru X'PERT PRO. Analizę fazową wykonano wykorzystując promieniowanie  $\text{CuK}_\alpha$ ; zakres pomiaru wynosił  $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$ .

Kalcynowany i spiekany proszek hydroksyapatytowy został zmielony i zmieszany z KBr. Mieszaninę proszków sprasowano w celu przygotowania pastylek. Próbkę poddano analizie spektrofotometrycznej FTIR (Bruker, Equinox 55).

### Powierzchnia właściwa proszku HAP

Powierzchnia właściwa proszków hydroksyapatytowych została oznaczona metodą BET (metoda Brunauer–Emmett–Teller) z wykorzystaniem sorptomietru ASAP 2010 V4.02; adsorbowanym gazem był azot.

### Otrzymywanie kompozytu ceramiczno-polimerowego

Poli(D,L-laktyd), w skrócie: PDLLA, został otrzymany w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. Masa molowa ( $M_w$ ) PDLLA wynosiła 80,85 kDa, natomiast dyspersja mas ( $M_w/M_n$ ) 1,85. Jako rozpuszczalnik polimeru zastosowano aceton cz.d.a (CHEMPUR, Polska).

In this study the new hydroxyapatite-poly(D,L-lactide) composite bone implant, which is also a drug carrier, is presented. The composite was designed to combine the advantages of ceramic and polymer materials, and also to eliminate disadvantages of other implants described in publications or available on the market. In order to achieve the best surgical handiness, the composite has a form of spheres with different sizes (250-1000  $\mu\text{m}$ ). This allows our material to fill bone defects, especially with complex shapes because the diversity of granules' sizes improves their packing in the bone cavities. Moreover, thanks to the porosity of the hydroxyapatite spheres, they could be a scaffold for a new-formed bone. Specially chosen biodegradable polymer (poly(D,L-lactide)) covering the granules enhances mechanical strength of the implant and serves as an antibiotic matrix. The drug applied in our composite is clindamycin, which is characterized by a broad spectrum of activity and is used to treat infections of soft tissues, bones and infections with anaerobic bacteria in dentistry. Additional advantage of our material is relatively low cost of its production. The composite presented in this work is under patent application process (application number in Polish Patent Office: P.403470).

## Materials and Methods

### Synthesis of hydroxyapatite

Hydroxyapatite (HAp) powder was prepared from analytical grades of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) and 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Lach-Ner, s.r.o. Czech Republic) using modified wet precipitation method [13]; the reaction temperature was about 40°C. The obtained product was dried at temperature 80°C for 24 h and then crushed using a pestle and a mortar. The powder was calcined at 800°C and sintered at 1200°C, both for 3 hours. The composition of the final products was confirmed by the X-ray diffraction analysis and FTIR spectroscopy.

### X-ray diffraction and IR spectroscopy

The X-ray diffraction analysis (XRD) of the calcined and sintered hydroxyapatite powder was carried out by using an X'PERT PRO diffractometer. Phase analysis of the powder was performed using  $\text{CuK}_\alpha$  radiation, within the range of  $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$ .

The calcined and sintered hydroxyapatite powder was ground and dispersed in KBr powder to form pellets. Samples were analysed using a FTIR spectrophotometer (Bruker, Equinox 55).

### Surface area of HAP

The BET surface area of hydroxyapatite powders was determined by applying the standard Brunauer–Emmett–Teller method to the nitrogen adsorption isotherms obtained using a Micromeritics ASAP 2010 V4.02 instrument.

### Preparation of ceramic-polymer composite

Poly(D,L-lactide) - PDLLA - was purchased from Center of Polymer and Carbon Materials of the Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland. The PDLLA has a molecular weight ( $M_w$ ) of 80.85 kDa, the value of its polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) is 1.85. Acetone p.a. (CHEMPUR, Poland) was used as a polymer solvent.

Temperatura zeszklenia ( $T_g$ ) poli(D,L-laktydu) została określona za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC821e Mettler Toledo). Próbkę o masie 8,5 mg umieszczono w aluminiowym naczyniu pomiarowym i ogrzewano do temperatury 200°C. Celem badania było uzupełnienie informacji na temat PDLLA, aby sprawdzić czy pokryte polimerem granule mogą zostać podgrzane do temperatury wrzenia acetonu (56°C), bez wystąpienia niebezpieczeństwa zniszczenia warstwy polimerowej.

Fazę ceramiczną kompozytu stanowiły porowate hydroksyapatytowe granule o sferycznym kształcie. Hydroksyapatyt został zmielony w młynku kulowym i przesiany w celu uzyskania cząstek o średnicy mniejszej niż 100 µm. Porowate granule zostały otrzymane metodą opisaną w literaturze [14]. Porogen stanowiła wieprzowa żelatyna spożywcza typu A (Dr. Oetker Polska Sp. z o.o.), natomiast fazą rozpraszającą olej rzepakowy (Kujawski, ZT „Kruszwica” S.A.).

1 g proszku hydroksyapatytowego dodano do 10% wodnego roztworu żelatyny (0,35 g żelatyny na 3,5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej) i ogrzano do 36°C. Olej roślinny schłodzono do temperatury 11°C i mieszano na mieszadle magnetycznym o obrotach 400 rpm. Następnie rozpoczęto wkraplanie zawiesiny proszku ceramicznego w żelatynie do mieszającego się oleju. W celu uzyskania granul o zróżnicowanych rozmiarach zmieniano prędkość mieszania w zakresie 400 to 600 rpm. Kiedy cała zawiesina została wdroplona, prędkość mieszania zwiększono do 800 rpm (na 3 minuty) w celu wzmocnienia granul. Otrzymane granule przemyto acetonem i etanolem pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wysuszono. Aby wypalić żelatynę i uzyskać porowatą strukturę, wygrzewano granule w piecu w temperaturze 600°C przez 30 minut. Uformowany gotowy produkt ceramiczny poddano spiekaniu w temperaturze 1200°C przez 3 h.

W celu wzmocnienia kruchego porowatego materiału pokryto go specjalnie zaprojektowaną warstwą poli(D,L-laktydu). Ceramiczne granule dodano do roztworu PDLLA (15% w/v w acetonie) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 5 minut. Prędkość mieszania (400 - 800 rpm) dostosowano do warunków zewnętrznych, takich jak temperatura w laboratorium. Czynnikiem ten mógł mieć wpływ na proces pokrywania granul, ponieważ wyższa temperatura otoczenia przyspiesza parowanie rozpuszczalnika, co z kolei zwiększa gęstość roztworu polimeru. Opisana sytuacja wymaga zwiększenia prędkości mieszania granul. Lepkość roztworu była regulowana poprzez odpowiednie zwiększanie prędkości mieszania. Masa pokrycia polimerowego stanowiła około 41% masy granul. Po mieszanii granule poddano suszeniu na podłożu polistyrenowym, w atmosferze powietrza przez 24 godziny. Następnie wysuszony kompozytowy materiał został oddzielony od podłoża. W celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika (acetonu), granule wygrzewano w temperaturze 56°C (temperatura wrzenia acetonu) przez godzinę.

Ceramiczne granule pokryto polimerem z antybiotykiem wykorzystując nową metodę opracowaną w naszym laboratorium. Warstwa polimerowa została przygotowana w sposób analogiczny jak opisano powyżej, z modyfikacją polegającą na dodaniu chlorowodorku klindamycyny (podarowanego przez firmę MIP Pharma GmbH) do roztworu PDLLA (15% w/v w acetonie). Przygotowano cztery grupy granul:

- grupa C1: 0,002 g klindamycyny na 1 cm<sup>3</sup> granul
- grupa C2: 0,004 g klindamycyny na 1 cm<sup>3</sup> granul
- grupa C3: 0,006 g klindamycyny na 1 cm<sup>3</sup> granul
- grupa C4: 0,008 g klindamycyny na 1 cm<sup>3</sup> granul

Wszystkie grupy granul suszono na podłożu polistyrenowym w atmosferze powietrza przez 24 godziny i wygrzewano w temperaturze 56°C (temperatura wrzenia acetonu) przez godzinę.

The glass transition temperature ( $T_g$ ) of poly(D, L-lactide) was determined using differential scanning calorimetry (DSC821e Mettler Toledo). A specimen of about 8.5 mg was placed in an aluminium pan and heated to 200°C. The aim of this examination was to complement the data of PDLLA in order to check if the coated granules could be heated at the boiling temperature of acetone (56°C) without the risk of the destruction of the polymer covering.

The ceramic phase consists of porous hydroxyapatite spherical granules. The calcined HAp powder was ball-milled and sieved to achieve particles of the diameter lower than 100 µm. Porous granules were obtained using the modified technique described earlier [14]. Edible pigskin gelatin type A (Dr. Oetker Polska Sp. z o.o.) was used as a porogen and vegetable oil (rape oil, Kujawski ZT “Kruszwica” S.A.) was applied as a dispersive medium.

1 g of hydroxyapatite powder was added to 10% aqueous solution of gelatin (0.35 g gelatin to 3.5 cm<sup>3</sup> of distilled water) and heated to 36°C. Vegetable oil was cooled to 11°C and stirred on a magnetic stirrer at 400 rpm. Then the ceramic-gelatin suspension was added dropwise to the oil. In order to obtain fine granules with different size the velocity of mixing was varied from 400 to 600 rpm. When the whole volume of the suspension was added, the rotation was increased to 800 rpm (for 3 minutes) to harden the granules. The spheres obtained in this stage were washed with acetone and ethanol under reduced pressure and dried. The dry granules were heated at 600°C for 30 minutes to burn out gelatin (in order to obtain open pores) and sintered at 1200°C for 3 h.

For the reinforcement of the brittle porous HAp granules, a poly(D,L-lactide) specially designed covering was prepared. To this aim, the ceramic spheres were added to PDLLA solution (15% w/v in acetone) and mixed using a magnetic stirrer for 5 minutes with the rotation velocity (400-800 rpm) adjusted to the ambient conditions, such as the temperature in the laboratory. This factor may have an influence on the process of the coating, since the higher temperature accelerates the evaporation of the solvent, which in turn increases the density of the polymer solution. The solution viscosity was maintained by adequate increase of the mixing velocity. The polymer covering weight was about 41% of that of the granules. After mixing, the granules were dried on polystyrene plates in air atmosphere for 24 h. Dry composite material was separated from the plates. In order to remove the residues of the solvent (acetone), the granules were heated at the temperature 56°C (boiling temperature of the acetone) for 1 hour.

The ceramic granules, with the antibiotic incorporated into the polymer matrix, were obtained in a new way. Poly(D,L-lactide) layer was prepared as mentioned above, but with a modification consisting in addition of the clindamycin hydrochloride (kindly provided by MIP Pharma GmbH) to the PDLLA (15% w/v in acetone) solution. The portions of clindamycin introduced to the polymer solutions were:

- group C1: 0.002 g clindamycin for 1 cm<sup>3</sup> of granules
- group C2: 0.004 g clindamycin for 1 cm<sup>3</sup> of granules
- group C3: 0.006 g clindamycin for 1 cm<sup>3</sup> of granules
- group C4: 0.008 g clindamycin for 1 cm<sup>3</sup> of granules

All groups of granules were dried on polystyrene plates in air atmosphere for 24 hours and heated at the temperature 56°C (boiling temperature of the acetone) for one hour.

### Skaningowa mikroskopia elektronowa

Analiza mikrostrukturalna granul została przeprowadzona metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (Hitachi S-4700 z systemem EDS Noran Vantage, Japan). Przed pomiarem próbki zostały pokryte warstwą przewodzącą: granule ceramiczne bez pokrycia polimerowego napyłono węglem, zaś kompozytowe granule napyłono złotem. Mikrografie otrzymano przy napięciu przyspieszającym 10 kV i prądzie emisyjnym 9500 nA dla pokrytych oraz 11500 nA dla niepokrytych granul.

### Badanie udziału objętościowego porów

Udział objętościowy porów w granulach określono za pomocą metody opisanej wcześniej [15]. Suche granule zważono i umieszczono w wodzie destylowanej pod zmniejszonym ciśnieniem na 10 minut (aby woda mogła penetrować nawet głębokie otwarte pory). Następnie umieszczono je w wodzie destylowanej na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przed ponownym ważeniem granule zostały wyjęte z wody i lekko przetrzarte bibułą filtracyjną. Pomiar masy wykonano dla trzech różnych próbek o tej samej objętości.

Objętość porów (objętość wody zatrzymanej w porach) obliczono ze WZORU 1:

$$V_p = \frac{W_w - W_e}{W_e \cdot d} \quad (1)$$

gdzie  $W_w$  to masa granul wypełnionych wodą,  $W_e$  to masa pustych granul, a  $d$  to gęstość wody ( $d = 1,0 \text{ g/cm}^3$ ).

### Oznaczanie wrażliwości bakterii na klindamycynę

Aktywność biologiczna klindamycyny została zbadana za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej [16]. Szczepem wzorcowym był bakteryjny szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Granule z poli(D,L-laktydowym) pokryciem i różną zawartością klindamycyny (grupy C1, C2, C3 i C4) umieszczono w buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4 i temperaturze  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Stosunek objętościowy granul do PBS wynosił  $0,5 \text{ cm}^3$  do  $4,5 \text{ cm}^3$ . W celu określenia aktywności biologicznej uwolnionej klindamycyny z matrycy polimerowej do PBS,  $1 \text{ cm}^3$  buforu pobierano i zastępowano świeżym roztworem PBS po 1, 3, 6 i 24 godzinach. Następne próbki były pobierane po kolejnych 24 godzinach aż do 28-go dnia inkubacji. Czysty bufor fosforanowy, bez zanurzonych w nim granul, inkubowany w warunkach eksperymentu, pełnił rolę kontroli negatywnej. Kontrolę absolutną stanowiły roztwory  $0,01 \text{ cm}^3$  erytromycyny i  $0,01 \text{ cm}^3$  chloramfenikolu nałożone na płytki ze szczepem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Sporządzono płytki agarowe z dodatkiem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:  $1,5 \text{ cm}^3$  zawiesiny z jednej kolonii bakteryjnej (o gęstości 0,5 w skali McFarlanda), dodano do  $250 \text{ cm}^3$  agaru odżywczego Müller-Hinton podgrzanego do temperatury  $50^\circ\text{C}$  i po wymieszaniu nałożono do sterylnych szalek Petriego (o średnicy 90 mm) i pozostawiono w temperaturze pokojowej do zastygnięcia. Na każdej szalce lekko zanurzono w agarze po trzy sterylne cylinderki ze stali nierdzewnej. W każdym cylinderku umieszczono próbkę o objętości  $0,1 \text{ cm}^3$ . Gdy przygotowano wszystkie próbki, szalki przetrzymywano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano przez 18 godzin w  $37^\circ\text{C}$ . Po tym czasie zmierzono średnice stref zahamowania i wykonano zdjęcia szalek (Image Station In-Vivo-F, Kodak).

### Scanning Electron Microscopy

The microstructural characterization of the granules was carried out by using Scanning Electron Microscopy (Hitachi S-4700 with EDS system Noran Vantage, Japan). Before this investigation, the spheres were covered with conductive coatings: the granules without polymer layer were coated with carbon while the composite granules were covered with gold. The SEM micrographs were observed at 10kV with emission current 9500 nA for covered and 11500 nA for uncovered granules, respectively.

### Determination of pore volume fracture

The pore volume fraction of the granules was determined using a modified method described earlier [15]. Dry granules were weighted and placed in distilled water for 10 minutes under reduced pressure (in order to allow water to penetrate even the deep open pores). Then they were immersed in distilled water for 24 h at room temperature. Before reweighting, spheres were removed from the solvent and dried on filter paper. The test was performed in triplicate.

Pore volume (accessible volume of water) was estimated from the FORMULA 1:

$$V_p = \frac{W_w - W_e}{W_e \cdot d} \quad (1)$$

where  $W_w$  is the weight of water-filled granules,  $W_e$  is the weight of the empty granules and  $d$  is the water density ( $d = 1.0 \text{ g/cm}^3$ ).

### Clindamycin susceptibility testing

The biological activity of clindamycin was determined with disc diffusion method [16]. Bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used in this study.

Granules covered with the poly(D,L-lactide) containing different amounts of clindamycin (groups: C1, C2, C3 and C4) were immersed in Phosphate Buffered Saline (PBS) of pH = 7.4 at  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . The volumetric ratio of the granules to PBS was  $0.5 \text{ cm}^3$  to  $4.5 \text{ cm}^3$ . To determine the biological activity of clindamycin released from polymer matrix into PBS,  $1 \text{ cm}^3$  of PBS was collected and replaced by fresh PBS after 1, 3, 6 and 24 h. Next, the samples were taken every 24 h up to the 28<sup>th</sup> day of the incubation. The negative control was carried out with PBS only, without immersed granules, stored under experimental conditions. The absolute check was  $0.01 \text{ cm}^3$  of erythromycin and  $0.01 \text{ cm}^3$  of chloramphenicol applied on the plates inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. All tests were performed in triplicate.

Agar plates with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain were prepared as follows:  $1.5 \text{ cm}^3$  of bacteria suspension from one colony (0.5 McFarland standard) was added to  $250 \text{ cm}^3$  of Müller-Hinton agar heated to  $50^\circ\text{C}$ . After stirring, the mixture was poured into the sterile Petri dishes (90 mm diameter) and left at room temperature to congealing. On every plate three sterile stainless steel cylinders were inserted into the agar. Samples of  $0.1 \text{ cm}^3$  were deposited into each cylinder. When all samples were prepared, the plates were stored at room temperature for 30 minutes and then incubated for 18 h at  $37^\circ\text{C}$ . After 18 h of incubation, the diameters of the inhibition zones were measured and the photos of the plates were taken (Image Station In-Vivo-F, Kodak).

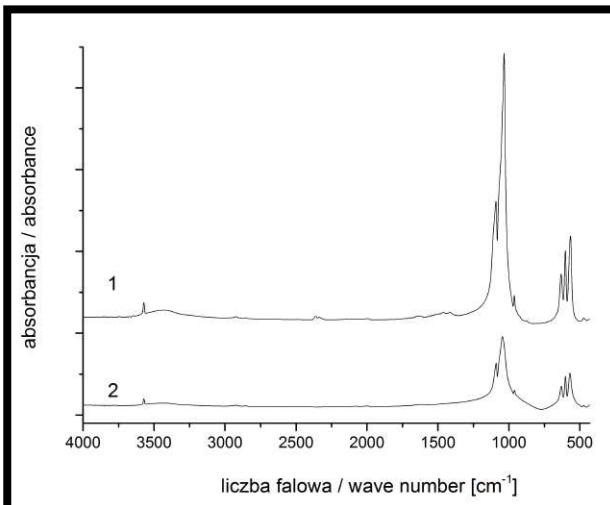
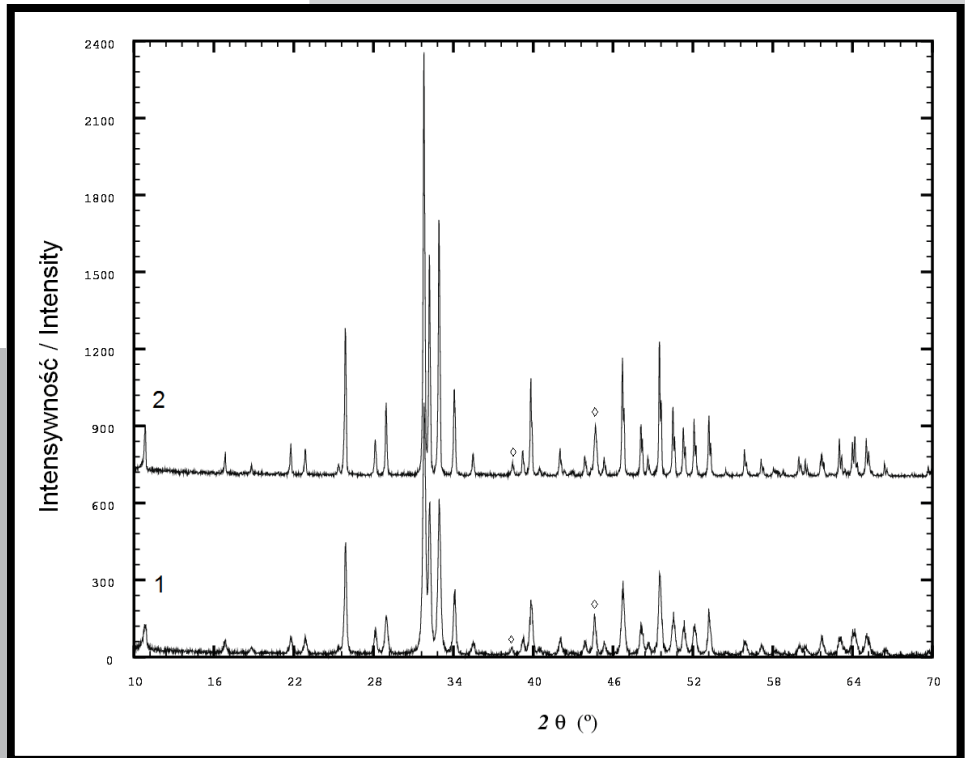
### Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD) i spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

RYS. 1 przedstawia dyfraktogramy proszków otrzymanych podczas syntezy i obróbki cieplnej. Analiza metodą rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej wykazała, że zarówno kalcynowany jak i spiekany proszek to czysto fazowo syntetyczny hydroksyapatyt. Identyfikacja faz polegała na porównaniu położenia maksimum dyfrakcyjnych uzyskanych podczas badania XRD z danymi zdeponowanymi w International Centre for Diffraction Data (ICDD). Najlepszą zgodność z dyfraktogramem badanej próbki wykazała karta o numerze 04-011-9308 dla HAp o strukturze heksagonalnej. Na dyfraktogramie widoczne są dwie dodatkowe linie dyfrakcyjne, pochodzące od uchwytu próbki wykonanego ze stopu Fe-Ni.

Analiza widma FTIR (RYS. 2) potwierdziła wysoką czystość fazową proszków. W widmie dla grupy  $\text{PO}_4^{3-}$  występują cztery rodzaje drgań:  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  i  $\nu_4$ . Wszystkie są widoczne na otrzymanym widmie FTIR proszków hydroksyapatytowych. Na widmie znajdują się również piki pochodzące od drgań charakterystycznych dla grupy  $\text{OH}^-$  (TABELA 1) [17,18].

RYS. 1. Dyfraktogramy: (1) kalcynowanego i (2) spiekane hydroksyapatytu. Zaznaczono również dwie linie dyfrakcyjne, należące do uchwytu Fe-Ni.

FIG. 1. X-ray diffraction patterns of calcined (1) and sintered (2) hydroxyapatite powder. The diffraction lines from Fe-Ni sample holder were marked.



RYS. 2. Widmo FTIR kalcynowanego (1) i spiekane (2) proszku hydroksyapatytowego.  
FIG. 2. FTIR spectra of calcined (1) and sintered (2) hydroxyapatite powder.

## Results and Discussions

### X-ray diffraction and IR spectroscopy

The XRD patterns are shown in FIG. 1. X-ray diffraction analysis proved that the calcined and sintered powder is the synthetic hydroxyapatite without any impurity. The identification of the phases was carried out by comparing the experimental XRD patterns to standards compiled by the International Centre for Diffraction Data (ICDD) using the card with reference code: 04-011-9308 for the hexagonal HAp structure. Two diffraction lines, which do not belong to hydroxyapatite, are those of Fe-Ni sample holder.

The interpretation of FTIR spectra (FIG. 2) confirmed high purity of the powders. In the vibration spectra of  $\text{PO}_4^{3-}$  the four bands:  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  and  $\nu_4$  are present. All of them are observed on FTIR spectra of the hydroxyapatite powders obtained by us. There are also the sharp peaks from  $\text{OH}^-$  vibrations (TABLE 1) [17,18].

TABELA 1. Pasma FTIR dla grup występujących w badanych proszkach hydroksyapatytowych.  
TABLE 1. FTIR bands of hydroxyapatite powders.

grupa group	pasmo band	proszek kalcynowany calcined powder	proszek spiekany sintered powder
$\text{PO}_4^{3-}$	$\nu_1$	962 $\text{cm}^{-1}$	
	$\nu_2$	473 $\text{cm}^{-1}$	
	$\nu_3$	1033 $\text{cm}^{-1}$	1044 $\text{cm}^{-1}$
		1091 $\text{cm}^{-1}$	
$\nu_4$	566 $\text{cm}^{-1}$	571 $\text{cm}^{-1}$	
	602 $\text{cm}^{-1}$	601 $\text{cm}^{-1}$	
$\text{OH}^-$	632 $\text{cm}^{-1}$		
	3572 $\text{cm}^{-1}$		

### Powierzchnia właściwa proszku HAP

Powierzchnia właściwa otrzymanych hydroksyapatytów wyznaczona metodą BET wynosiła 23 m<sup>2</sup>/g dla proszku kalcynowanego i 2 m<sup>2</sup>/g dla proszku spiekane. Różnica w wartościach powierzchni właściwej dla kalcynowanego i spiekane proszku hydroksyapatytowego jest wynikiem obróbki cieplnej materiału. Proces spiekane wpływa na wzrost ziaren, co z kolei skutkuje zmniejszeniem powierzchni właściwej. Obie otrzymane wartości zbliżone są wielkością do wartości powierzchni właściwej dla syntetycznego hydroksyapatytu opisywanych w literaturze [19].

### Różnicowa kalorymetria skaningowa PDLA

Różnicowa kalorymetria skaningowa wykazała, że temperatura zeszklenia zastosowanego poli(D,L-laktydu) wynosi 58,61°C. Wartość ta okazuje się być typowa dla amorficznego PDLA (55-60°C) [20].

### Skaningowa mikroskopia elektronowa

Analiza metodą SEM potwierdziła, że granule cechują się sferycznym kształtem i średnicą w przedziale 200 do 1000 µm. Powierzchnia niepokrytych granul jest chropowata (RYS. 3) z wieloma otwartymi porami o rozmiarach 10 do 40 µm. Kompozytowe granule pokryte są polimerową warstwą dobrej jakości i wykazują gładką powierzchnię (RYS. 4). RYS. 5 przedstawia morfologię powierzchni granul przed i po pokryciu polimerem. W szczególności RYS. 5B pokazuje jak polimer wypełnia otwarte pory, formując warstwę powierzchniową, która wygładza powierzchnię granuli.

Sferyczny kształt hydroksyapatytowych granul ułatwia odpowiednie upakowanie materiału w małych i nieregularnych ubytkach kostnych. Wolne przestrzenie pomiędzy kompozytowymi granulami umożliwiają osteointegrację. Dodatkowo, komórki kostne dzięki porom otwartym o średnicy 10-40 µm powinny mieć możliwość wnikania w implant. Gładkość granul, z kolei, powinna ograniczyć występowanie stanu zapalnego i wspomóc wzrost kości [21,22].

Granule tego typu mogą znaleźć zastosowanie jako materiał do uzupełniania ubytków twarzoczaszki, do regeneracji kości wyrostka zębodołowego, do leczenia kieszonek kostnych, uzupełniania ubytków kostnych powstałych po hemisekcji, radektomii i amputacji korzenia zęba oraz po usunięciu cyst korzeniowych [5,23].

### Specific Surface Area

BET surface area of hydroxyapatite was: 23 m<sup>2</sup>/g for the calcined powder and 2 m<sup>2</sup>/g for the sintered one. The difference between values of the surface area of calcined and sintered hydroxyapatite is a result of the thermal treatment of material. The sintering process gives rise to the growth of the grains, which induces decrease of the specific surface area. Both measured values are of the same order of magnitude as those for synthetic hydroxyapatites described earlier [19].

### DSC

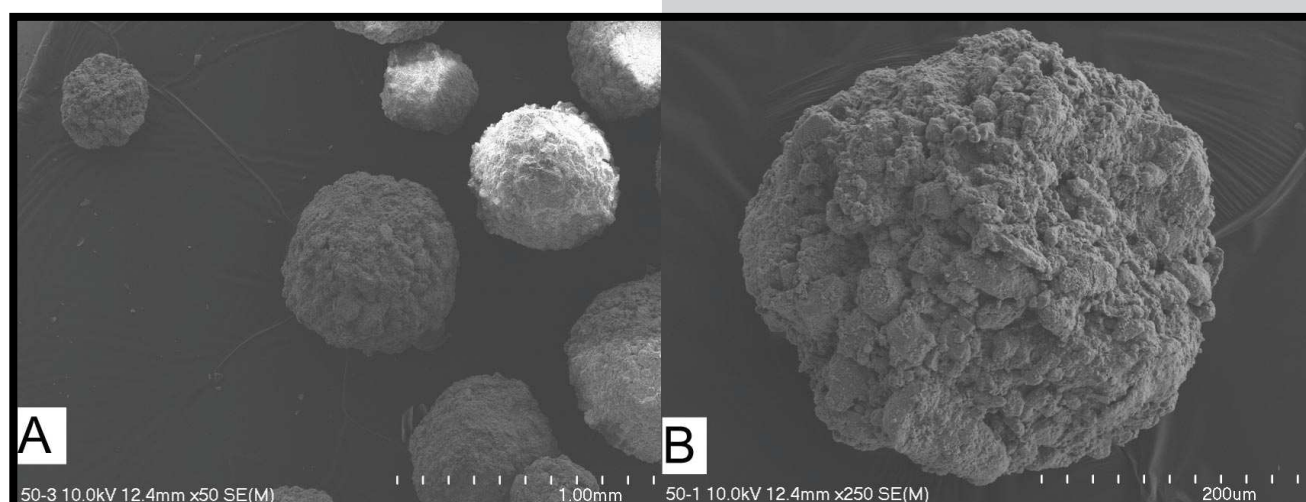
The differential scanning calorimetry has shown that the glass transition temperature of applied poly(D,L-lactide) is 58.61°C. This value is typical for amorphous PDLA (55-60°C) [20].

### Scanning electron microscopy

SEM analysis confirmed that the granules have spherical shape and the diameter range from 200 to 1000 µm. Uncovered spheres have rough surface (FIG. 3) with many open pores of different size in the range: 10 to 40 µm. Composite granules have fine polymer covering and exhibited a smooth surface (FIG. 4). The surface morphology of the granules before and after covering is shown in FIG. 5. In particular, FIG. 5B presents how the polymer fills in the open pores and forms the surface layer which smoothes the surface.

The spherical shape of the hydroxyapatite granules facilitates suitable packing of the material in small and irregular bone cavities, while the free spaces between composite spheres enable osteointegration. Additionally, the open pores with diameter 10-40 µm should allow bone cells to penetrate into the implant. The smoothness of the granules should reduce the inflammatory response and promote the bone ingrowth [21,22].

This kind of granules could find an application as the material for reconstruction of craniofacial skeletal defects, alveolar bone regeneration, in treatment of bone sockets, for filling bone defects after: hemisection, radectomy, amputation of tooth root and removal of periapical cysts [5,23].

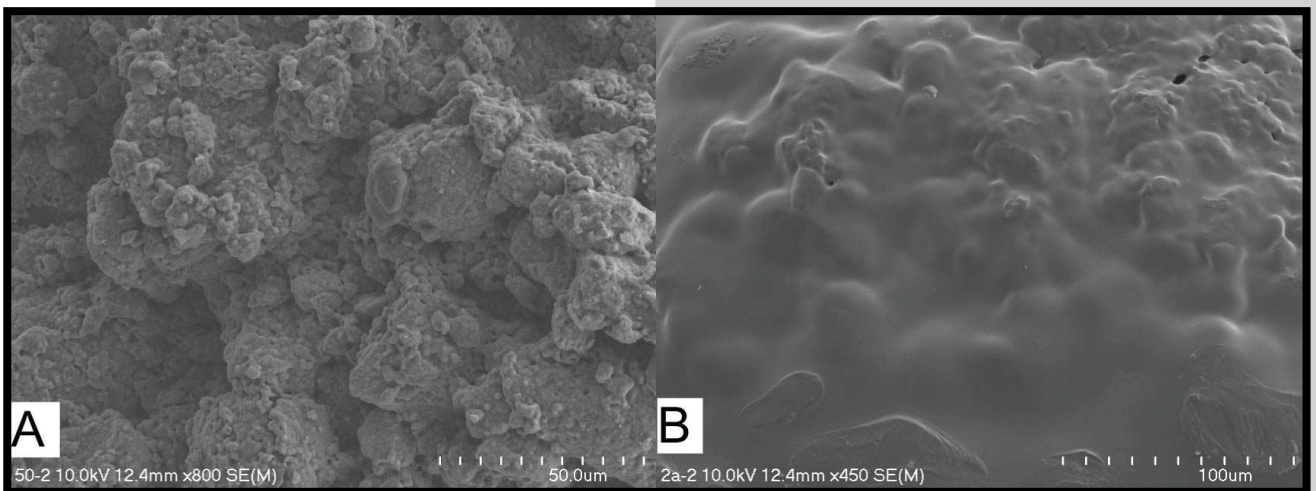


RYS. 3. SEM mikrografie granul hydroksyapatytowych: (A) granule o różnych rozmiarach, (B) porowata granula o średnicy około 400 µm.

FIG. 3. SEM microphotographs of hydroxyapatite granules: (A) granules with different sizes, (B) porous granule with diameter about 400 µm.



RYS. 4. Hydroksyapatytowe granule pokryte poli(D,L-laktydem).  
FIG. 4. Hydroxyapatite granules with poly(D,L-lactide) covering.



RYS. 5. Morfologia powierzchni granul: niepokrytej (A) i pokrytej (B) polilaktydem.  
FIG. 5. Surface morphology of granules: uncovered (A) and covered (B) with polylactide.

#### Badanie udziału objętościowego porów

Objętość rozpuszczalnika (wody), wchłoniętego w pory hydroksyapatytowych granul wynosiła  $0,4 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Pory stanowiły około 40% objętości granul. Badanie metodą SEM wykazało, że rozmieszczenie i rozmiar porów są losowe.

#### Oznaczanie wrażliwości bakterii na klindamycynę

Na RYS. 6 pokazano strefy zahamowania wzrostu dla klindamycyny. Zaobserwowano biologiczną aktywność uwolnionego antybiotyku dla wszystkich grup granul. Grupa kontrolna (PBS bez inkubowanych w nim granul) nie wykazała efektu hamującego wzrost bakterii. Potwierdzono również wrażliwość bakterii ze szczepu wzorcowego na antybiotyki: erytromycynę i chloramfenikol (kontrola absolutna).

RYS. 7 przedstawia zależność średnicy stref zahamowania od czasu inkubacji granul. W przypadku grup C1, C3 i C4 wielkość średnic stref zahamowania wzrostu dla klindamycyny utrzymywała się w przybliżeniu na stałym poziomie od pierwszej godziny do drugiego dnia eksperymentu, zaś trzeciego dnia zaobserwowano ich spadek. Dla wszystkich grup granul stwierdzono wzrost średnicy stref zahamowania czwartego i piątego dnia inkubacji. Po piątym dniu widoczne było stopniowe zmniejszanie się stref zahamowania. W zależności od ilości klindamycyny inkorporowanej w matrycę polimerową, uwalnianie się leku trwało odpowiednio: 15, 16, 21 lub 22 dni. Po tym czasie nie obserwowano już występowania stref zahamowania wzrostu bakterii.

#### Determination of pore volume fraction

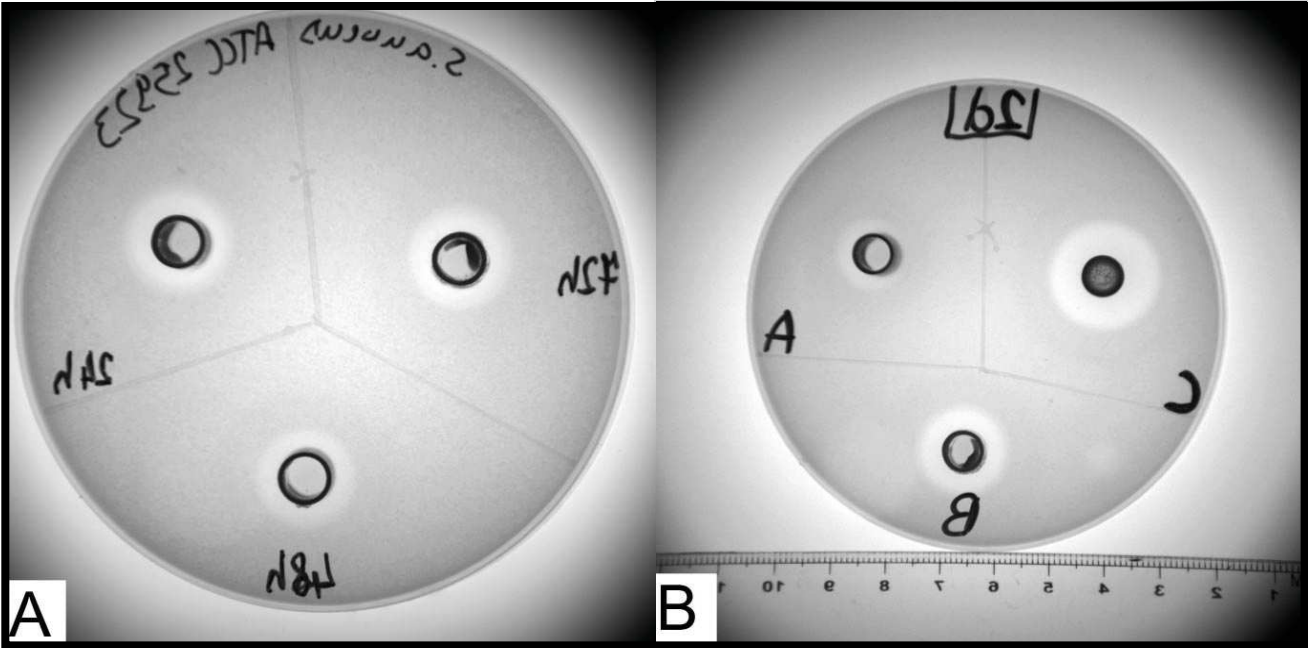
The solvent accessible pore volume in HAp granules was about  $0.4 \text{ cm}^3/\text{g}$ . The pores comprised about 40% of the granules' volume. SEM studies showed that the distribution and size of the internal pores is random.

#### Clindamycin susceptibility testing

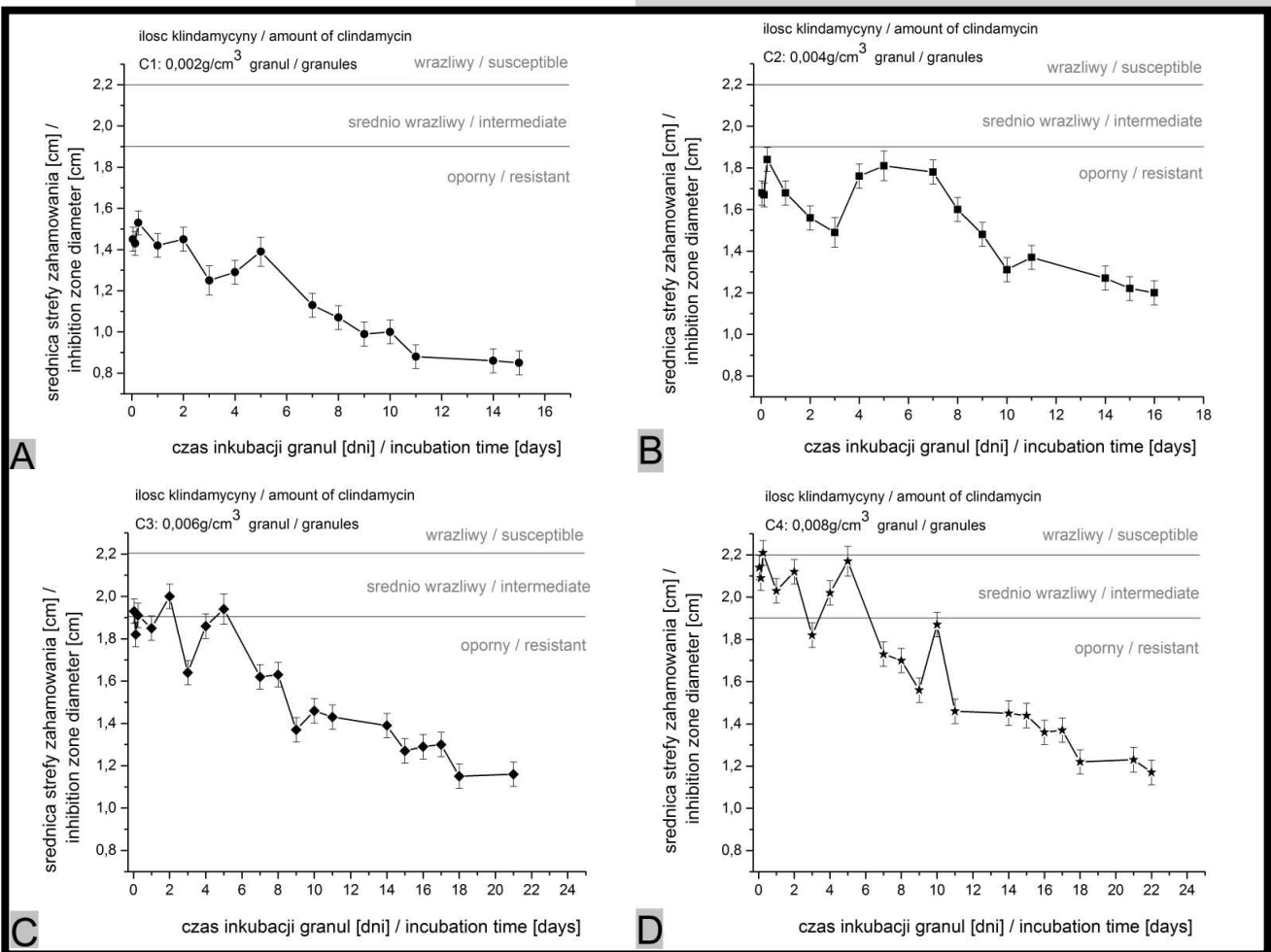
FIG. 6 shows the bacteria inhibition zones for clindamycin. Antibiotic released from all four groups of granules retained its biological activity. Control samples (PBS without immersed granules) did not reveal any inhibitory effect. It was also checked that bacterial strain was susceptible to antibiotics: erythromycin and chloramphenicol (absolute check).

The bacteria inhibition zone diameters as a function of the immersion time are shown in FIG. 7. For the granules from C1, C3 and C4 groups from the first hour to the second day of the experiment the inhibition zone diameters were stable. On the third day the decrease of the diameters was observed. It is characteristic that for all groups of granules on the fourth and fifth day the increase of the inhibition zone diameter is noticeable. After that time the gradual decrease of the inhibition zones occurred. According to the amount of clindamycin incorporated in the polymer layer the releasing of the antibiotic lasted for: 15, 16, 21 and 22 days, respectively. After that time no inhibition zones were observed.





**RYS. 6.** Przykładowe strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół cylinderków: (A) po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji granul grupy C2, (B) po 24 godzinach inkubacji granul grup C1, C3 i C4.  
**FIG. 6.** Example of the bacteria inhibition zones around the wells: (A) after 24 h, 48 h and 72 h of the immersion of granules from group C2, (B) after 24 h of the immersion of granules from groups C1, C3 and C4.



**RYS. 7.** Średnica stref zahamowania wzrostu bakterii w funkcji czasu uwalniania się klindamycyny: grupa granul C1 (A), grupa granul C2 (B), grupa granul C3 (C) oraz grupa granul C4 (D).  
**FIG. 7.** Bacteria inhibition zone diameter as a function of release time: group C1 of the granules (A), group C2 of the granules (B) group C3 of the granules (C) and group C4 of the granules (D).

Zgodnie z normami EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) szczep bakteryjny *Staphylococcus aureus* uznawany jest za wrażliwy wobec klindamycyny, jeżeli średnica strefy zahamowania wzrostu jest większa niż 22 mm. W przypadku gdy średnica strefy zahamowania jest mniejsza niż 19 mm szczep uznawany jest za oporny w stosunku do klindamycyny. Natomiast kiedy średnica mieści się w przedziale 19-22 mm szczep określany jest jako średnio wrażliwy [24]. Jak pokazano na RYS. 7 badanie aktywności biologicznej antybiotyku wykazało, że jedynie w pierwszym dniu eksperymentu, dla granul grupy C4, ilość uwolnionej klindamycyny była odpowiednio wysoka i bakterie oznaczały się wrażliwością na ten antybiotyk. Przez pierwszych pięć dni, z wyjątkiem trzeciego dnia, bakterie wykazywały średnią wrażliwość na klindamycynę uwolnioną z otoczki polimerowej granul należących do grup C3 i C4. W pozostałych przypadkach średnica stref była mniejsza niż 19 mm, co oznacza, że ilość uwolnionej klindamycyny była zbyt mała i bakterie wykazywały oporność na antybiotyk.

Wyniki badań aktywności klindamycyny wykazały, że ilość inkorporowanego do granul leku była zbyt niska aby zapobiec rozwojowi bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* i w związku z tym niezbędne są dalsze badania, które pozwolą na uzyskanie kompozytowego nośnika leków o odpowiedniej dawce klindamycyny.

## Wnioski

Opracowana nową metodę otrzymywania nośnika klindamycyny w postaci porowatych hydroksyapatytowych granul pokrywanych poli(D,L-laktydem).

Matryca polimerowa zapewnia odpowiednie warunki do uwalniania się klindamycyny. Metoda dyfuzyjno-krażkowa pokazała, że uwalnianie antybiotyku utrzymywało się na stosunkowo stabilnym i wysokim poziomie przez pierwszych pięć dni (z wyjątkiem dnia trzeciego) dla wszystkich granul. Po tym czasie obserwowano stopniowy spadek uwalniania antybiotyku. Niestety, jedynie w pierwszym dniu eksperymentu klindamycyna (o stężeniu 0,008 g/cm<sup>3</sup> granul) miała hamujący wpływ na rozwój bakterii. Oznacza to, że stężenie klindamycyny w warstwie polimerowej było zbyt małe. Trwają prace nad ustaleniem odpowiedniej dawki leku bakteriobójczego. Nasze wstępne badania dowiodły, że inkorporowanie większej ilości klindamycyny do opisanego układu jest technologicznie możliwe.

Biorąc pod uwagę opinie stomatologów, doniesienia literaturowe oraz parametry materiałów implantologicznych dostępnych na rynku spodziewamy się, że połączenie porowatego hydroksyapatytowego rdzenia w postaci mikrogranul z degradowalnym poli(D,L-laktydowym) pokryciem, które pełni również rolę matrycy dla klindamycyny, może stanowić potencjalny implant kostny o charakterze nośnika leków. Zaproponowany materiał powinien znaleźć zastosowanie w chirurgii szczękowo-twarzowej.

In compliance with EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), the *Staphylococcus aureus* strain may be recognized as susceptible to clindamycin if the inhibition zone diameter is greater than or equal to 22 mm. The inhibition zone diameter lower than 19 mm means that the strain is resistant to clindamycin. The values of inhibition zone between 19 and 22 mm indicate an intermediately resistant strain [24]. As shown in FIG. 7, the bacterial inhibition assay revealed that only on the first day of the experiment in the group C4 of the granules the released amount of clindamycin was sufficient and the bacterial strain was susceptible to the antibiotic. For the first five days, except the third day, the bacterial strain susceptibility to clindamycin, released from granules of group C3 and C4, was intermediate. In other cases the diameter of inhibition zones was below 19 mm, which means that the amount of released antibiotic was too low and bacteria were resistant.

The results of the clindamycin susceptibility study suggest that the amount of the drug incorporated into the granules was too low to prevent growth of *Staphylococcus aureus*. Further investigations are necessary to obtain a composite drug carrier with suitable amount of clindamycin.

## Conclusions

A method for the preparation of a new clindamycin carrier, in the form of porous hydroxyapatite granules covered with poly(D,L-lactide), has been efficiently developed.

The polylactide matrix provides appropriate conditions for the release of clindamycin. The disc diffusion method shows that the antibiotic release was maintained at a relatively high and stable level for the first five days (except the third day) for all the granules. After that time the gradual decreasing of the antibiotic release was observed. Unfortunately, only on the first day of the experiment clindamycin (in concentration of 0.008 g/cm<sup>3</sup> of granules) had the inhibitory effect on bacteria. This indicates that the clindamycin concentration in the polymer layer was too low, therefore suitable dose of the antimicrobial agent is still to be adjusted. Our current studies prove that incorporation of higher amount of clindamycin into the system described above is technologically achievable.

Taking into account the opinion of the dentists, the literature reports and the parameters of the purchasable implants we assume that the combination of the hydroxyapatite core shaped like porous microgranules with the poly(D,L-lactide) degradable covering, which is also the matrix for clindamycin, could be potential injectable bone implant and drug delivery system. In conclusion, we believe that the proposed material should find application in the oral and maxillofacial surgery.

## Podziękowania

Autorzy dziękują Prof. dr hab. Jackowi Międzobrodzkiemu oraz Mgr Klaudii Polakowskiej z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za udzielenie konsultacji oraz przeprowadzenie badań antybiotykową metodą dyfuzyjno-krażkową.

Autorzy dziękują również Prof. Barbarze Oleksyn z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego za cenne wskazówki i rady.

Badania zostały zrealizowane z wykorzystaniem aparatury zakupionej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (projekt POIG.02.01.00-12-023/08).

Badanie metodą SEM zostało przeprowadzone w Laboratorium Mikroskopii Skaningowej z Emisją Polową i Mikroanalizy w Instytucie Nauk Geologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Jacek Międzobrodzki and MSc Klaudia Polakowska from the Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology at the Jagiellonian University for consultation about the bacteria experiment and for performing the disc diffusion method antibiotic testing.

The authors would like to thank Prof. Barbara Oleksyn from the Faculty of Chemistry at the Jagiellonian University for the valuable guidance and advice.

The research was carried out with the equipment purchased thanks to the financial support of the European Regional Development Fund in the framework of the Polish Innovation Economy Operational Program (contract no. POIG.02.01.00-12-023/08).

The SEM analysis was performed in Laboratory of the Scanning Electron Microscopy with Field Emission and Microanalysis in the Institute of Geological Sciences of the Jagiellonian University.

## Piśmiennictwo

- [1] Acosta-Torres L.S., Lopez-Marin L.M., Barcelo F.H., Castano V.M.: Bioengineering of Ceramics: Evolution, Challenges and Opportunities. In: Kumar S.A., Thiagarajan S. and Wang S.-F. (Editors) Biocompatible Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Applications, Chapter 1, Nova Science Publishers Inc. New York (2010) 1-22.
- [2] Orlovskii V.P., Komlev V.S., Barinov S.M.: Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials*: 38 (2002) 973-984.
- [3] De Aza P.N.: Progress in Bioceramic Materials. In: Caruta B.M. (Editor): Ceramics and Composite Materials: New Research, Nova Science Publishers Inc. (2006) 101-132.
- [4] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (2007) 116-123.
- [5] Ślósarczyk A.: Biomateriały ceramiczne. In: Nałęcz M., Błażewicz S., Stoch L.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4. Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT Warszawa (2003) 99-149.
- [6] Hideto Tsuji, Yoshito Ikada: Blends of aliphatic polyesters. I. Physical properties and morphologies of solution-cast blends from poly(DL-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science* 60 (1996) 2367-2375.
- [7] Bendix D.: Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability* 59 (1998) 129-135.
- [8] Weiler A., Hoffmann R.F., Stahelin A.C., Helling H.J., Sudkamp N.P.: Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 16 (2000) 305-21.
- [9] Hakkarainen M., Finne-Wistrand A.: Update on Polylactide Based Materials. *Smithers Rapra Technology* (2011) 1-25.
- [10] Li Chun Lin, Shwu Jen Chang, Shyh Ming Kuo, Gregory Cheng-Chie Niu, Hao Kai Keng, Pei Hua Tsai: Preparation and evaluation of  $\beta$ -TCP/polylactide microspheres as osteogenesis materials. *Journal of Applied Polymer Science* 108 (2008) 3210-3217.
- [11] Batchelor A.W., Chandrasekaran M.: Service Characteristics of Biomedical Materials and Implants (Series on Biomaterials and Bioengineering). Imperial College Press (2004) 38-39.
- [12] Brook I., Lewis M.A., Sandor G.K.B., Jeffcoat M., Samaranayake L.P., Vera Rojas J.: Clindamycin In Dentistry: More Than Just Effective Prophylaxis For Endocarditis? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 100 (2005) 550-558.

## References

- [13] Osaka A., Miura Y., Takeuchi K., Asada M. and Takahashi K.: Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2 (1991) 51-55.
- [14] Komlev V.S., Barinov S.M., Koplik E.V.: A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials* 23 (2002) 3449-3454.
- [15] Paul W., Sharma C.P.: Development of Porous Spherical Hydroxyapatite Granules: Application towards Protein Delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 383-388.
- [16] Ferraz M.P., Mateus, A.Y., Sousa J.C., Monteiro F.J.: Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: Release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81 (2007) 994-1004.
- [17] Ślósarczyk A., Paluszkiwicz C., Gawlicki M., Paszkiewicz Z.: The FTIR Spectroscopy and QXRD Studies of Calcium Phosphate Based Materials Produced from the Powder Precursors with Different Ca/P Ratios. *Ceramics International* 23 (1997) 297-304.
- [18] Rehman I., Bonfield W.: Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 1-4.
- [19] Joschek S., Nies B., Kortz R., Goopferich A.: Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials* 21 (2000) 1645-58.
- [20] Middleton J.C., Tipton A.J.: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.
- [21] Parsons J., Ricci J.L., Alexander H., Bajpai P.K.: Osteoconductive Composite Grouts for Orthopedic Use. *Bioceramics: Material Characteristics Versus in Vivo Behavior* 523 (1988) 190-207.
- [22] Min-Ho Hong, Jun-Sik Son, Kwang-Mahn Kim, Myungho Han, Daniel S. Oh, Yong-Keun Lee: Drug-loaded porous spherical hydroxyapatite granules for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22 (2011) 349-355.
- [23] Tuli P., Farbod F., Beal B., Jackson I.T.: The use of hydroxyapatite granules for the correction of skeletal facial deformities. *European Journal of Plastic Surgery* 35 (2012) 203-208.
- [24] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 3.1, valid from 2013-02-11.