

Badania były finansowane z projektu: 1138-T08-2005-29.

Piśmiennictwo

- [1] T. Wierzchoń, E. Sikorska. Zgłoszenie patentowe nr P351 835 z dn. 23.01.2002.
 [2] T. Wierzchoń, E. Czarnowska i wsp. Proc 15 th Symp on Plasma Chemistry, Orleans, France. 2001; 5:625.
 [3] E. Sikorska-Matysiak, E. Czarnowska, T. Wierzchoń. Inżynieria Biomateriałów 2002; 23-25: 17.

WPŁYW MODYFIKACJI BIAŁKOWEJ NA WŁAŚCIWOŚCI HYDROKSYAPATYTU JAKO NOŚNIKA GENTAMYCYN

JUSTYNA ZALEWSKA*, GRAŻYNA GINALSKA*, ANNA ŚLÓSARCZYK**, PIOTR GODLEWSKI***

*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-093 LUBLIN, UL. CHODŹKI 1, POLSKA

**KATEDRA TECHNOLOGII I CERAMIKI AGH, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

***KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-094 LUBLIN, UL. JACZEWSKIEGO 8, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),214-216]

Wprowadzenie

Hydroksyapatyty złożone z fosforanów wapnia będących naturalnym składnikiem konstrukcyjnym kości, są obecnie jednym z lepszych materiałów implantacyjnych w ortopedii i stomatologii. Są one biokompatybilne i po wszczepieniu nie wywołują znaczącej odpowiedzi immunologicznej [1]. Ze względu na specyfikę zabiegów implantacyjnych, częstość występowania zakażeń miejscowych jest bardzo niska i oscyluje w granicach 1-3%, jednak w obrębie tych przypadków, ryzyko utraty kończyny lub śmierci pacjenta jest bardzo wysokie. Głównymi czynnikami etiologicznymi zakażeń są *S. aureus* i *S. epidermidis*. Skutecznym sposobem profilaktyki zakażeń implantu jest stosowanie antybiotykoterapii ogólnej, jednakże mniej szkodliwa dla pacjenta jest ochrona miejscowa wszczepionego materiału. Pozwala ona na zmniejszenie dawki leku dostarczonej do organizmu [2]. Hydroksyapatyt dzięki porowatej strukturze może być potencjalnym nośnikiem leków [3;4] i uwalniając lek *in situ* może zapobiec infekcjom pooperacyjnym i tworzeniu biofilmu na powierzchni implantu [5].

Celem prezentowanej pracy była modyfikacja materiału hydroksyapatytowego białkami a następnie immobilizacja chemiczna gentamycyny w kierunku wytworzenia biomateriału zdolnego do stopniowego uwalniania leku do otaczającego środowiska.

Metodyka

Granulat hydroksyapatytowy wykonano w Katedrze Technologii i Ceramiki AGH w Krakowie. Parametry HAP

Acknowledgements

This study was financed by project: 1138/T08/2005/29.

References

- [4] T. Wierzchoń. Materials Science Forum 2003; 426: 232.
 [5] E. Czarnowska, A. Sowinska, B. Cukrowska i wsp. Ann. Transplant. 2004; 9: 72.
 [6] E. Czarnowska, A. Zajączkowska, A. Sowińska. CIMTEK 2006:173.
 [7] D.O. Meredith et al. Experimental Cell Research. 2004; 293: 58.

THE INFLUENCE OF PROTEIN MODIFICATION ON HYDROKSYAPATITE PROPERTIES AS GENTAMICIN CARRIER

JUSTYNA ZALEWSKA*, GRAŻYNA GINALSKA*, ANNA ŚLÓSARCZYK**, PIOTR GODLEWSKI***

*CHAIR AND DEPARTMENT BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 1 CHODZKI STR., 20-930 LUBLIN, POLAND

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

***DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 8 JACZEWSKIEGO STR., 20-954 LUBLIN, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),214-216]

Introduction

Hydroxyapatite ceramics based on calcium phosphates, chemical compounds being natural constructive element of bones is now regarded to be one of better implantation materials in orthopedic surgery and stomatology (1) because it is an unusually biocompatible material and it does not evoke a significant host response. Due to specifics of implantation procedures frequency of local infections is very low, achieving 1-3%. However, among these cases, the risk of limb amputation or patient's death is very high. The main etiological factors of infections are *S. epidermidis* and *S. aureus*. An efficient way of implant infections prophylaxis is systemic antibiotic therapy (2); however, local drug delivery is less harmful for organism because it allows for reduction of drug dose. So, porous structure of hydroxyapatite has recently been considered as a potential material for drug delivery system (3,4). This type of drug delivery system can release a therapeutic agent *in situ* to avoid infections after surgical procedures and formation of biofilm on implant surface (5)

The aim of the present study was modification of hydroxyapatite material by proteins and next chemical gentamicin immobilization to construct a biomaterial with ability to release the drug gradually to surrounding environment.

Methods

Hydroxyapatite was made in Chair of Technology and Ceramics, AGH, Kraków. Hydroxyapatite parameters

wynosiły: średnica 0.3-05 mm, otwarta porowatość 67%, temperatura spiekania 800°C. Otrzymany materiał pokryto dwoma rodzajami białek (żelatyną wieprzową lub keratyną z włosów ludzkich) uzyskując tym samym 2 typy matryc. W procesie tym wykorzystano metodę aktywacji γ -aminopropylotrietoksylanem Weethala [6] i własną procedurę immobilizacji białek. Ilość przyłączonego białka określano metodą Lowry'ego zmodyfikowaną przez Schacterle i Pollack'a [7]. Gentamycynę łączono z biomateriałem według Zgłoszenia Patentowego [8] i oznaczano ilościowo wg Frutos-Cabanillas [9]. Aktywność biologiczną immobilizowanej formy antybiotyku testowano wobec *S. aureus* ATCC 25923.

Rezultaty badań

Eksperymentem objęto materiał modyfikowany białkami (żelatyną i keratyną) i bez modyfikacji. Wyniki immobilizacji gentamycyny na granulacie HAP w zależności od rodzaju i ilości białka związanego z materiałem przedstawia TABELA 1.

Na podstawie osiągniętych wyników zauważono, że ilość

Rodzaj białka Kind of protein	Ilość białka przed immobilizacją Amount of protein before immobilization (mg/ml)	Ilość białka na nośniku Amount of protein on carrier (mg/g)	Wydajność Efficiency (%)	Ilość gentamycyny na nośniku Amount of gentamicin on carrier (mg/g)	Wydajność immobilizacji Immobilization yield (%)
Keratyna Keratin	18.17	40.55	55.8	3.74	33.49
	10.10	24.63	61.6	3.58	32.02
	2.5	7.87	76.9	3.86	34.49
Żelatyna Gelatin	21.76	26.63	69.4	3.78	33.38
	9.0	11.6	32.2	3.76	33.63
	2.94	7.24	61.7	3.66	32.70

*Stężenie gentamycyny przed immobilizacją wynosiło 2.795 mg/ml
*Concentration of gentamicin before immobilization was 2.795 mg/ml

TABELA 1. Wpływ rodzaju i ilości białka na immobilizację gentamycyny.
TABLE 1. Influence of kind and amount of protein on gentamicin immobilization.

antybiotyku unieruchomionego na biomateriale nie zależy od rodzaju i ilości białka modyfikującego granulaty HAP. W związku z tym dalszą część doświadczeń wykonywano z udziałem HAP modyfikowanego 0.3% roztworem białka (roztwór do immobilizacji 3 mg/ml). Stwierdzono, że gentamycyna do białkowanego materiału przyłączana jest w sposób mieszany. Niemodyfikowany białkiem nośnik (kontrola) zdolny jest związać gentamycynę na drodze adsorpcji fizycznej (31 %) i jonowo (21 %); ponadto 48 % antybiotyku pozostaje uwięzione głęboko w porach granulatu. Na nośnikach modyfikowanych białkiem ok. 30% leku było związane na drodze adsorpcji fizycznej, jonowo tylko 3 – 4 %, natomiast z pozostałej puli 63 – 68 % antybiotyku część przyłączyła się kowalencyjnie, a część została uwięziona w porach.

W dalszej części pracy testowano wpływ odczynu środowiska na efektywność wiązania białka (TABELA 2). Okazało się, że środowisko zasadowe (pH=9) sprzyja zwiększeniu ilości unieruchomionego białka oraz wydajności procesu immobilizacji.

Następnie badano zależność pomiędzy stosunkiem masy materiału do objętości roztworu antybiotyku a wydajnością procesu immobilizacji i stwierdzono, że należy eksperymen-

were: diameter: 0.3-0.5 mm, open porosity: 67 %, sintering temperature: 800°C. This material was chemically covered by two kinds of protein (porcine gelatin or keratin derived from human hair). So, we obtained two types of matrix. HAP was activated by γ -aminopropyltriethoxysilane according to Weethal's method (6), keratin and gelatin were covalently immobilized to silanized HAP according to our own procedure. Protein concentration was measured colorimetrically by Lowry method modified by Schacterle i Pollack (7). Gentamicin was immobilized according to the Patent pending (8) and its concentration was estimated spectrophotometrically after Frutos-Cabanillas (9). Biological activity of immobilized antibiotic was tested in the presence of *S. aureus* ATCC 25923.

Results

Our experiments involved the modification of both: the material sealed by proteins (gelatin and keratin) and the non-modified one. Results of gentamicin immobilization on HAP in dependence on a kind and amount of protein are presented in TABLE 1. The data leads to the conclusion that there is not any correlation between a kind and amount of protein on carrier and amount of immobilized gentamicin. So, 0.3 % (3 mg/ml) initial concentration of protein before the matrix activation was chosen for further experiments. It was found that gentamicin was attached to the matrices in mixed way. Non-modified carrier (control) had the ability to bind gentamicin by physical adsorption (31%) and by ionic interaction (21%); however, 48% was entrapped deeply in HAP pores. To protein-modified carriers, about 30% of drug was bound by physical adsorption, only 3-4% by ionic interactions, whereas the remaining amount of 63-68%

Typ białka Type of protein	pH	Ilość białka związanego z HAP Amount of protein on HAP (mg/g)	Wydajność immobilizacji Immobilization yield (%)
Keratyna Keratin	5	8.51	34.88
	7	12.11	47.01
	9	12.42	54.75
Żelatyna Gelatin	5	13.75	36.66
	7	18.19	48.76
	9	22.96	60.07

TABELA 2. Wpływ pH środowiska na efektywność wiązania białka.
TABLE 2. Influence of medium pH on effectiveness of protein attachment process.

Typ nośnika Type of carrier	Stężenie leku przed immobilizacją Concentration of drug before immobilization (mg/ml)	Ilość leku na HAP Amount of drug on HAP (mg/g)	Wydajność immobilizacji Immobilization yield (%)
HAP pokryty keratyną Keratin-sealed HAP	1.13	1.28	56.73
	2.66	2.75	51.62
	5.17	3.54	34.24
HAP pokryty żelatyną Gelatin-sealed HAP	1.13	1.17	51.86
	2.66	2.17	40.86
	5.17	3.09	29.86
HAP	10.47	4.20	20.05

TABELA 3. Wpływ stężenia gentamycyny na wydajność immobilizacji.
TABLE 3. Influence of gentamicin concentration on immobilization yield.

talnie wyznaczać tę proporcję. W przypadku testowanego granulatu HAP optymalna proporcja wynosiła: 1 ml roztworu gentamycyny/ 0.75 g HAP.

Następnie określano wpływ stężenia antybiotyku na wydajność immobilizacji. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia leku wzrasta ilość gentamycyny przyłączonej do białkowanego HAP, jednak łączy się to z obniżeniem wydajności procesu (TABELA 3).

Ostatnim etapem badań było sprawdzenie wpływu modyfikacji chemicznej biomateriału na aktywność biologiczną gentamycyny. W tym celu HAP modyfikowany białkiem i lekiem oraz niemodyfikowany białkiem a tylko impregnowany fizycznie gentamycyną, umieszczono w bulionie bakteryjnym ($CFU=1.5 \times 10^8$). Eksperyment prowadzono 7 dni i co 48 godzin wprowadzano do bulionu nową porcję bakterii. W wyniku eksperymentu stwierdzono, że HAP białkowany i połączony z gentamycyną w sposób mieszany (adsorpcja fizyczna, interakcje jonowe, wiązania kowalencyjne) wykazywał właściwości bakterioobójcze. Natomiast w przypadku HAP łączonego biernie z gentamycyną zauważono wzrost bakterii *S. aureus* po 24 godzinnej inkubacji.

Wnioski

1. Modyfikacja granulatu HAP białkami wpływa na immobilizację gentamycyny w sposób mieszany. Lek wiązany jest do biomateriału przede wszystkim na drodze adsorpcji fizycznej i kowalencyjnie, choć pewna część pozostaje uwięziona fizycznie w porach granulatu HAP.
2. Środowisko zasadowe jest korzystne dla modyfikacji HAP białkami.

antibiotic was partially attached via covalent bonds and partially entrapped within the pores.

In further part of research the influence of medium pH on effectiveness of protein binding was tested (TABLE 2). It was shown that alkaline medium (pH=9) promoted both an increase of protein amount and immobilization yield. Next, the dependence between a proportion of material mass to antibiotic solution volume and an immobilization yield was examined. In this case the optimal proportion was 1ml gentamicin to 0.75g of HAP. On a base of this experiment we found that there is a need to set this proportion experimentally.

Further experiment concerned the estimation of influence of antibiotic concentration on immobilization yield. It was shown that when drug concentration was increased also the amount of immobilized gentamicin on protein-sealed HAP increased but immobilization yield decreased (TABLE 3).

The last step of this research concerned checking of the influence of chemical biomaterial modification on gentamicin biological activity. Drug-protein-modified HAP and non-modified one soaked in gentamicin solution (control) were placed in bacterial broth. Experiment lasted for 7 days. After every 48 hours, a new portion of bacteria was added. In view of experiment it was shown that protein-sealed HAP bound with gentamicin in mixed way (physical adsorption, ionic interactions and covalent bonds) exerted bactericidal properties. In case of control HAP, the presence of *S. aureus* just after 24 incubation was observed.

Conclusions

1. Modification of HAP carrier by proteins influenced on gentamicin immobilization. Drug was bound to biomaterial mostly by physical adsorption and in covalent mode; remaining part was entrapped in HAP pores.
2. Alkaline medium is advantageous for HAP modification by proteins.

Piśmiennictwo

- [1] Dawidowicz A., Pielka S., Paluch D., Kuryszko J., Staniszevska-Kus J., Solski L. Application of elemental microanalysis for estimation of osteoinduction and osteoconduction of hydroxyapatite bone implants. *Polim Med.* 35(1) (2005), 3-14
- [2] Szczepanik A., Gach T., Midura M. Infections in the implant surgery. *Zakażenia* 3 (2003), 38-44
- [3] Guicheux J., Grimandi G., Trecant M., Faivre A., Takahashi S., Daculsi G. Apatite as a carrier for growth hormone: *in vitro* characterization of loading and release. *J Biomed Mater Res* 34 (1997), 165-170
- [4] Sivakumar M., Panduranga Rao K. Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. *Biomaterials* 23(2002), 3175-3181
- [5] Ragel CV., Vallet-Regi M. *In vitro* bioactivity and gentamicin release from glass-polymer-antibiotic composites. *J Biomed Mater Res* 51(2000),424-429

References

- [6] Weethal H. Covalent coupling methods for inorganic support materials. *Methods Enzymol.*, 44 (1976), 134-148
- [7] Schacterle G.R., Pollack R.L. A simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal Biochem.* 51 (1973), 654-655.
- [8] Ginalska G. Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M., A metod of antibiotic immobilization. Polish Patent no P-358934, 2003. Biuletyn Urzędu Patentowego 18 (2004), 801, s.124.
- [9] Frutos-Cabanillas P., Díez Peña E., Barrales-Rienda I.M. and Frutos G. Validation and *in vitro* characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int. J. Pharm.* 209 (2000), 15-26.