

CHARAKTERYZACJA NOWEGO PRZECIWBAKTERYJNEGO CEWNIKA MOCZOWEGO PODDANEGO DZIAŁANIU TOSUFLOKSACYNY

DOROTA KOWALCZUK^{1*}, GRAŻYNA GINALSKA²

¹ KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, UL. JACZEWSKIEGO 4, 20-090 LUBLIN

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, UL. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN

* E-MAIL: DORKOW@VP.PL

Abstrakt

Przeciwbakteryjny cewnik moczowy poddany działaniu tosufloksacyiny (TOS) otrzymano przez immobilizację TOS na powierzchni cewnika, uprzednio pokrytego chitozanem, z użyciem aldehydowego łącznika. Całkowitą ilość antybiotyku przyłączonego do chitozanej warstwy oceniono na podstawie różnicy w stężeniu leków, przed i po immobilizacji, zmierzonych metodą HPLC. Jak udowodniły badania uwalniania *in vitro*, antybiotyk został połączony z matrycą cewnika na dwa sposoby: stosunkowo stabilne wiązanie kowalencyjne i słabe wiązanie niekowalencyjne. Aktywność przeciwbakteryjną cewnika modyfikowanego antybiotykiem wobec szczepów *S. aureus* i *E. coli* oceniono stosując test hamowania stref i test liczenia kolonii. Przeprowadzone badania wykazały, że immobilizacja TOS na powierzchni cewnika stanowi stabilną przeciwbakteryjną ochronę przez co najmniej 30 dni.

Słowa kluczowe: przeciwbakteryjna ochrona, cewnik moczowy, tosufloksacyina, badanie uwalniania

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 50-53]

Wprowadzenie

Zakażenia układu moczowego są najczęściej zgłaszanymi zakażeniami szpitalnymi liczącymi do 40% [1,2]. Znaczący procent tych zakażeń jest związany z cewnikami moczowymi. Stosowanie cewników może zakłócać fizjologiczny system obronny układu moczowego umożliwiając kolonizację bakterii, która prowadzi do tworzenia biofilmu i rozwoju infekcji trudnych do zwalczania z użyciem antybiotyków [3].

Z punktu widzenia prewencji, nadrzędną potrzebą jest otrzymanie cewnika z substancją, która zapobiega powstawaniu biofilmu. Uprzednio donosiliśmy o opracowaniu takiego przeciwbakteryjnego cewnika urologicznego ze sparfloksacyiną przyłączoną do heparynowego filmu umieszczonego na jego powierzchni [4].

Celem prezentowanej pracy była ocena immobilizacji TOS na powierzchni nowego przeciwbakteryjnego cewnika moczowego.

CHARACTERIZATION OF THE NOVEL ANTIMICROBIAL TOSUFLOXACIN-TREATED URINARY CATHETER

DOROTA KOWALCZUK^{1*}, GRAŻYNA GINALSKA²

¹ CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, JACZEWSKIEGO STREET 4, 20-090 LUBLIN, POLAND

² CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, CHODZKI STREET 1, 20-093 LUBLIN, POLAND

* E-MAIL: DORKOW@VP.PL

Abstract

*Antimicrobial tosufloxacin (TOS)-treated urinary catheter was developed by the immobilization of TOS on the catheter surface, previously coated with chitosan, by use of aldehyde as linker (according to the patented method). The total amount of the antibiotic attached to the chitosan layer was evaluated on the basis of the difference in the drug concentration before and after immobilization measured by HPLC method. As demonstrated by *in vitro* release studies, the antibiotic was coupled with the catheter matrix in two modes: relatively stable covalent binding and weak non-covalent binding. Antimicrobial activity of the antibiotic-modified catheter against *S. aureus* and *E. coli* strains was assessed using the zone of inhibition and colony count assays. The performed research indicated that the immobilization of TOS on the catheter surface resulted in the stable antibacterial protection for at least 30 days.*

Keywords: antimicrobial protection, urinary catheter, tosufloxacin, release study

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 50-53]

Introduction

Urinary tract infections are the most frequently reported nosocomial infections, accounting for up to 40%. A significant percentage of these infections is associated with urinary catheters [1,2]. The use of catheters can interfere with the normal defences of urinary tract, allowing the bacterial colonization which lead to the biofilm formation and infections, which are difficult to eradicate by antibiotics [3].

From a prevention standpoint, the need to develop a catheter with substance that prevents a biofilm formation is paramount. We have previously reported the production of such antimicrobial urological catheter with sparfloxacillin attached to heparin film deposited on its surface [4].

The aim of the present study was to evaluate the immobilization of TOS on the surface of the novel antimicrobial urinary catheter.

Metody

Fragmenty cewnika lateksowego (około 0,15 g) (Rusch, Malaysia) modyfikowano według procedury opisanej w Zgłoszeniu Patentowym [5].

Celem optymalizacji procesu immobilizacji, zmodyfikowane próbki poddano oddziaływaniu roztworom TOS (CHEMOS GmbH, Germany) o różnych stężeniach 4,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,2 mg/ml. Roztwory przygotowane do immobilizacji i otrzymane po tym procesie, po odpowiednim rozcieńczeniu, oznaczono metodą HPLC z detekcją UV przy 272 nm (Waters HPLC system).

Badania uwalniania TOS ze zmodyfikowanej powierzchni cewnika przeprowadzono płuczając próbki cewnika, w warunkach intensywnego wstrząsania, w różnych roztworach płuczających (chlorek sodu, bufor fosforanowy o pH 3,5; bufor fosforanowy o pH 8,5) i oznaczając bezpośrednio (bez rozcieńczania) ilość uwolnionego antybiotyku metodą UV-HPLC.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek cewników z TOS testowano *in vitro* wobec szczepów bakteryjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992, z zastosowaniem badania hamowania stref wzrostu bakterii (Mueller-Hinton agar) i liczenia koloni (Mueller-Hinton bulion). Obecność żywych bakterii kontrolowano przyrostem wartości CFU.

Rezultaty i dyskusja

Przeciwbakteryjne właściwości cewników moczowych otrzymano przez kowalencyjne i niekowalencyjne wiązanie TOS do ich powierzchni, uprzednio pokrytej chitozanem za pomocą aldehydu jako łącznika.

Methods

A latex catheter segments (about 0.15 g) (Rusch, Malaysia) were modified according to the procedure described in the Polish Patent Pending [5].

With the aim of optimizing the immobilization process, the modified samples were subjected to an impact of TOS (CHEMOS GmbH, Germany) solutions at the different concentrations of 4.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.2 mg/ml. The solutions prepared for the immobilization and the solutions obtained after this process, adequate diluted, were determined by HPLC method with UV-detection at 272 nm (Waters HPLC system).

The release studies of TOS from the modified catheter surface was carried out washing catheter sample, under intense stirring, in various washing solutions (sodium chloride, phosphate buffer at pH 3.5, phosphate buffer at pH 8.5) and determining directly (without diluting) the amount of the released antibiotic by UV-HPLC method.

Antimicrobial activity of the modified catheter samples with TOS was tested *in vitro* against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 bacterial strains, using zone of bacterial growth inhibition (Mueller-Hinton agar) and colony count (Mueller-Hinton broth) assays. The presence of living bacteria in broth medium was controlled as a CFU value increase.

Results and discussion

Antimicrobial properties of the urinary catheters were developed by the covalent and non-covalent binding of TOS to their surface, previously coated with chitosan, by using aldehyde as linker (according to the patented method).

TABELA 1. Ocena wiązania tosufloksacyny (TOS) na powierzchni zmodyfikowanego cewnika z zastosowaniem metody HPLC; roztwory przed (roztwory A) i po (roztwory B) immobilizacji.

TABLE 1. Evaluation of tosufloxacin (TOS) binding on the modified catheter surface with using of HPLC method; solutions before (solutions A) and after (solutions B) immobilization.

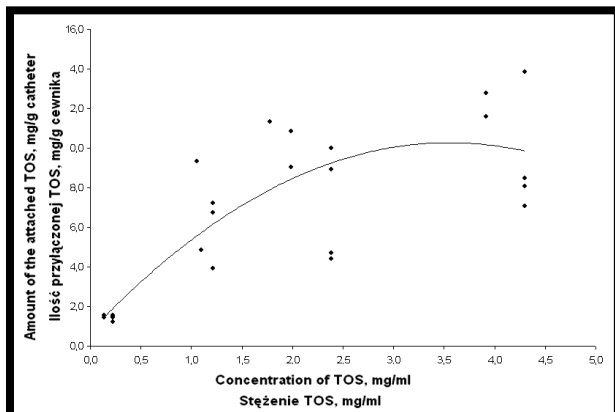
Roztwór A Solution A [mg/ml]	Roztwór B Solution B [mg/ml]	Ilość TOS przyłączona do cewnika / Amount of TOS attached to catheter [mg]	Całkowita ilość TOS przyłączona do cewnika / Total amount of TOS attached to catheter [mg/g ± RSD%]	Wydajność immobilizacji / Immobilization yield [%]
4.2956	3.0758	1.2198	10.3086 ± 27.13	29.31
2.3849	1.4505	0.9344	7.9838 ± 34.37	41.99
1.0971	0.4852	0.6119	7.2315 ± 38.04	55.77
0.2245	0.0573	0.1672	1.4626 ± 8.78	86.36

Całkowitą ilość TOS związaną ze zmodyfikowaną powierzchnią cewnika obliczono na podstawie różnic w stężeniach TOS, przed i po immobilizacji, oznaczonych metodą UV-HPLC (TABELA 1). Ilości TOS przyłączone do biomateriału były różne w zależności od jej stężenia w roztworach użytych do immobilizacji. Ze wzrostem początkowego stężenia leku, wiązanie TOS z nośnikiem stopniowo rosło (RYS. 1), podczas gdy wydajność immobilizacji malała (RYS. 2). Stężenie antybiotyku w zakresie 2-1 mg/ml zostało wybrane jako optymalne do immobilizacji TOS biorąc pod uwagę wydajność tego procesu (około 40-50%) i aktywność przeciwbakteryjną tak zmodyfikowanego cewnika.

Badania uwalniania pokazały, że stosunkowo niewielka część całkowitej, początkowo przyłączonej ilości TOS została wymyta (TABELA 2). Uwalnianie TOS stopniowo malało z każdym kolejnym płukaniem. Sumaryczna ilość TOS uwolniona do roztworów płuczających zmieniła się w zakresie od 0,76 do 4,50%. Stąd można wyciągnąć wniosek, że przyłączenie TOS do zmodyfikowanej powierzchni cewnika jest stosunkowo stabilne.

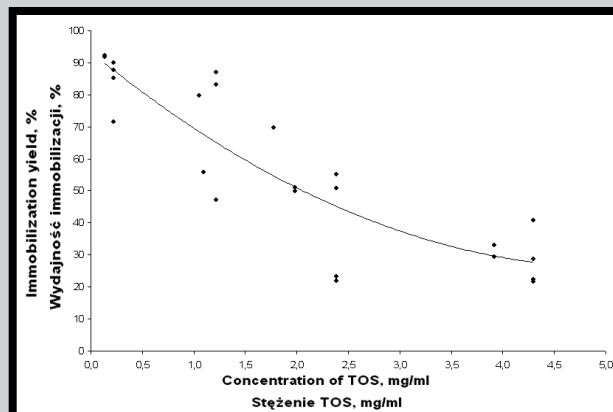
The total amount of the drug bound to the modified catheter surface was calculated on the basis of the differences in TOS concentrations, before and after immobilization, determined by UV-HPLC method (TABLE 1). The quantity of TOS attached to biomaterial was altered by changing its concentration in the solutions used for immobilization. The TOS binding with the carrier was progressively increased (FIG. 1), whereas the immobilization yield was decreased (FIG. 2) as the initial concentration of drug was increased. The antibiotic concentration in the range of 2-1 mg/ml was selected as optimal for immobilization of TOS, taking into account the yield of this process (about 40-50%) and antimicrobial activity of such modified catheter.

The release studies showed that the relatively inconsiderable fraction of the total amount of the initially attached TOS was washed (TABLE 2). The release of TOS was gradually decreased with each successive washing. It was found that the totally added amount of TOS released to washing solvents varied from 0.76 to 4.50%. Hence it can be concluded that TOS attachment to the modified surface of catheter is relatively stable.



RYS. 1. Wpływ stężenia TOS w roztworach użytych do immobilizacji na ilość TOS związaną z powierzchnią cewnika.

FIG. 1. Influence of TOS concentration in the solutions used for immobilization on the TOS amount attached to the catheter surface.



RYS. 2. Wydajność procesu immobilizacji wobec początkowych stężeń TOS.

FIG. 2. The yield of immobilization process versus initial TOS concentrations.

TABELA 2. Badanie uwalniania tosufloksacyny (TOS), immobilizowanej na cewniku, do różnych roztworów płuczących z zastosowaniem metody UV-HPLC.

TABLE 2. The release study of tosufloxacin (TOS), immobilized on the catheter, to the different washing solutions using UV-HPLC method.

Roztwór płuczący / Washing solution	Całkowita ilość TOS związana z cewnikiem / Total amount of TOS attached to catheter	Ilość TOS uwolniona z cewnika / Amount of TOS released from catheter		Ilość TOS pozostająca na cewniku / Amount of TOS remained on catheter	
	[mg]	[mg]	[%]	[mg]	[%]
NaCl	0.25	0.0065	2.49	0.2475	97.51
Bufor fosforanowy 8,5 Phosphate buffer 8.5	0.22	0.0020	0.76	0.2168	99.24
Bufor fosforanowy 3,5 Phosphate buffer 3.5	0.23	0.0117	4.50	0.2145	95.50

Zmodyfikowane próbki z TOS zbadano pod względem ich działania wobec szczepów *S. aureus* i *E. coli* stosując test płytkowy. Strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek z TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 0,2 mg/ml wynosiły 15-20 mm, a dla próbek z TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 2,0 mg/ml wynosiły 30-40 mm. Próbki niemodyfikowane (bez antybiotyku) nie wykazały stref zahamowania wobec wszystkich badanych szczepów. Obecność stref zahamowania wokół próbek zawierających antybiotyki demonstruje, że proces immobilizacji nie zmienił aktywności przeciwbakteryjnej TOS.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek z TOS otrzymanych przy stężeniu 1 mg/ml potwierdzono przy użyciu testu cieczowego wobec tych samych szczepów bakteryjnych jak w badaniu płytkowym. Brak wzrostu bakterii może sugerować, że antybiotyk był zdolny dyfundować do bulionu i był aktywny. Próbki zmodyfikowane TOS były chronione przed kolonizacją mikrobów przez 30 dni (*E. coli*) i 27 dni (*S. aureus*).

Na podstawie testów mikrobiologicznych można wyciągnąć wniosek, że aktywność przeciwbakteryjna cewników zmodyfikowanych TOS była spowodowana dyfuzją TOS do agaru i bulionu (niekowalencyjne wiązanie leku) i obecnością TOS na powierzchni (kowalencyjne wiązanie leku).

The samples modified with TOS were examined for their effect against *S. aureus* and *E. coli* strains by using of plate test. The zones of bacterial growth inhibition around the samples with TOS obtained after immobilization in a solution of 0.2 mg/ml were 15-20 mm, and for the samples with TOS obtained after immobilization in a solution of 2.0 mg/ml were 30-40 mm. The unmodified samples (without antibiotic) showed no zones of inhibition against all tested strains. The presence of inhibition zones around antibiotic-containing samples demonstrated that the immobilization process did not change the antimicrobial activity of TOS.

Antimicrobial activity of the modified samples with TOS, obtained at concentration of 1 mg/ml, was confirmed by use of the liquid test against the same bacterial strains as in plate test. The lack of bacterial growth can suggest that antibiotic was able to diffuse into the culture medium and was active. The TOS-modified samples were protected from microbial colonization for 30 days (*E. coli*) and 27 days (*S. aureus*).

From microbiological tests, it can be deduced that the antimicrobial activity of TOS modified catheters was due to the diffusion of TOS into agar and broth media (non-covalent attached drug) and to the presence of TOS on the surface (covalent attached drug).

Wnioski

Biorąc pod uwagę zapobieganie infekcjom odcewnikowym otrzymaliśmy cewnik z TOS jako substancją przeciwbakteryjną, który chroni przed kolonizacją mikroorganizmów przez co najmniej miesiąc. Ilość TOS związaną z matrycą cewnika oceniono stosując metodę HPLC. Okazało się, że immobilizacja TOS z roztworu w zakresie stężeń między 2 a 1 mg/ml zapewnia jak najbardziej zadowalającą wydajność i skuteczną aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Badania uwalniania udowodniły, że wiązanie TOS jest stosunkowo trwałe. Uwalnianie TOS ze zmodyfikowanego cewnika przebiegało stopniowo zachowując aktywność przeciwbakteryjną powierzchni, ponieważ znaczna część TOS pozostawała na cewniku. Taki nośnik zawierający lek unieruchomiony za pośrednictwem mieszanych, kowalencyjnych i niekowalencyjnych wiązań gwarantuje skuteczną ochronę przeciw infekcjom.

Podziękowania

Praca sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant Nr N N405 385037).

Conclusions

Taking account of the prevention of the catheter-related infections, we developed the catheter with TOS as antibacterial agent that protects from microbial colonization for at least month. The amount of TOS bound to the catheter matrix was evaluated using the HPLC method. We found that immobilization of TOS from the solution in the 2-1 mg/ml concentration range assured the most satisfactory yield and effective antimicrobial activity against gram-negative and gram-positive bacteria. The release studies proved that the binding of TOS is relatively stable. The release of TOS from the modified catheter proceeded gradually maintaining antibacterial activity of the surface because the significant part of TOS remained on the catheter. This carrier containing the drug immobilized via mixed, covalent and non-covalent bonds guarantees the effective protection against infections.

Acknowledgements

This work was sponsored by Ministry of Science and Higher Education (Grant No. N N405 385037).

Piśmiennictwo

- [1] Chenoweth CE., Saint S. Infections associated with urinary catheters. In: Seifert H., Jansen B., Farr B. (Eds.). Catheter-related infections. Marcel Dekker, New York, 2005.
- [2] Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging*. 2005; 22: 627-639.
- [3] Tenke P., Kovacs B., Jäckel M., Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J. Urol.* 2006; 24: 13-20.

References

- [4] Kowalczyk D., Ginalska G., Golus J. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int J Pharm* 2010; 402: 175-183.
- [5] Kowalczyk D., Ginalska G. Sposób otrzymywania przeciwbakteryjnego biomateriału przez immobilizację na jego powierzchni substancji przeciwbakteryjnej. Zgłoszenie Patentowe Nr P.392616, 2010.