

## Podsumowanie

Wszczepiony dotkankowo kopolimer P(LLA/GLA)+CF nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych - dotyczy to zarówno tkanki podskórnej, mięśniowej jak i kostnej.

Przeprowadzone w warunkach in vivo badania biologiczne wykazują, iż najbardziej aktywny proces odnowy tkanki kostnej następuje między 14 a 21 dobą, a mineralizacji pomiędzy 6 a 12 tygodniem obserwacji.

Kopolimer P(LLA/GLA)+CF wyraźnie powodował przyspieszenie odnowy tkanki kostnej w porównaniu z grupą kontrolną.

and 21 day, however the most mineralization was between 6 and 12 week of observation.

The co-polymer P(LLA/GLA)+CF visibly caused acceleration of osseous tissue regeneration compared to control group.

107

## Piśmiennictwo

- [1] Bajor G., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Starzak P., Proszek M., Chłopek J., Sabat D., Cieślak T.: Wczesny okres obserwacji bioresorbowalnego kompozytu kopolimeru P(LLA/GLA) wprowadzonego w kość udową królika - badania doświadczalne. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 228-231.
- [2] Bajor G., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Starzak P., Proszek M., Sabat D., Cieślak T.: Sześciotygodniowy okres obserwacji wszczepów P(LLA/GLA)+CF wprowadzonych w kość udową królika. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 231-234.
- [3] Proszek M.: Gojenie ran kostnych zuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmocnionym włóknami węglowymi. Rozprawa doktorska, Śląska Akademia Medyczna 2005.
- [4] Cieślak-Bielecka A., Adwent M., Proszek M., Bajor G., Sabat D., Cieślak T.: Ocena wstępna kopolimerów P(LLA/GLA) wprowadzonych w tkanki miękkie i zuchwę królików nowozelandzkich. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 238-239.
- [5] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. Biomaterials, 1996, 17(2), 93-102.
- [6] Böstman O., Pihlajamäki H.: Clinical biocompatibility of biodegradable orthopedic implants for internal fixation: a review. Biomaterials, 2000, 21(24), 2615-2621.
- [7] Lajtai G., Balon R., Humer K., Aitzetmuller G., Unger F., Orthner E.: Resorbable interference screws. Histologic study 4.5 years postoperative. Unfallchirurg., 1998, 101(11), 866-875.
- [8] Lajtai G., Schmiedhuber G., Unger F., Aitzetmuller G., Klein M., Noszian I., Orthner E.: Bone tunnel remodeling at the site of biodegradable interference screws used for anterior cruciate ligament reconstruction: 5-year follow-up. Arthroscopy, 2001, 17(6), 597-602.
- [9] Pamula E., Chłopek J., Błażewicz M., Makinen K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Materiały kompozytowe z nowego biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktydu dla celów medycznych. Inż. Biomat., 2000, 12, 23-28.

## References

- [10] Tiainen J., Soini Y., Tormala P., Waris T., Ashammakhi N.: Self-reinforced polylactide/ polyglycolide 80/20 screws take more than 1(1/2) years to resorb in rabbit cranial bone. J. Biomed. Mater. Res., 2004, 15;70B(1), 49-55.
- [11] Hickey T., Kreutzer D., Burgess D.J., Moussy F.: Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. Biomaterials, 2002, 23(7), 1649-1656.
- [12] Holy C., Dang S., Davies J., Shoichet M.: In vitro degradation of novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. Biomaterials, 1999, 20(13), 1177-1185.
- [13] Kim H.K., Park T.G.: Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. J. Control Release, 2004, 23;98(1), 115-125.
- [14] Pamula E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M.: Bioresorbowalne porowate podłoża dla inżynierii tkankowej z kopolimeru glikolidu z L-laktydem: wpływ mikrostruktury na osteoblasty in vitro. Inż. Biomat., 2003, 30-33, 95-99.
- [15] Chłopek J., Kmita G., Dobrzyński P., Bero M.: Właściwości zmęczenia śrub z kopolimeru P(LLA/GLA) oraz kopolimeru wzmocnianego włóknem węglowym. Inż. Biomat., 2002, 23-25, 88-90.
- [16] Proszek M., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Bajor G., Sabat D., Cieślak T., Morawska A.: Ocena gojenia ran kostnych zuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmocnionym włóknami węglowymi. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 242-245.
- [17] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grzeb P., Kryczka T., Ryba M., Walski M.: Kopolimery laktydu, glikolidu i e-kaprolaktanu niezawierające metali ciężkich. Synteza własności i zastosowanie w procesie kontrolowanego uwalniania analogów nukleozydów. Inż. Biomat., 2002, 23-25, 21-22.

## IMMOBILIZACJA AMIKACYNY NA RÓŻNYCH TYPACH PROTEZ NACZYNIOWYCH

MONIKA OSIŃSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*\*, ADAM URYNIAK\*\*\*

\*ZAKŁAD BIOCHEMII, UNIwersYTET M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ, 20-031 LUBLIN, POLSKA

\*\*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, LUBLIN, POLSKA

\*\*\*SZPITAL MIEJSKI, ODDZ. CHIRURGII OGÓLNEJ I NACZYNIOWEJ, RZESZÓW, POLSKA

MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),107-109]

Biomateriałami stosowanymi w angioplastyce naczyń są: polietylenotereftalan, polimetylometakrylan, politetrafluoroetylen i poliuretan. Poliestrowe protezy naczyniowe często

## IMMOBILIZATION OF AMIKACIN TO SEVERAL VASCULAR PROSTHESES FROM DIFFERENT SOURCES

MONIKA OSIŃSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*\*, ADAM URYNIAK\*\*\*

\*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MARIA CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY, 20-031 LUBLIN POLAND

\*\*CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL ACADEMY, LUBLIN, POLAND

\*\*\*DIVISION OF GENERAL AND VASCULAR SURGERY, MUNICIPAL HOSPITAL, RZESZÓW, POLAND

MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),107-109]

Poly (ethylene terephthalate), poly (methyl methacrylate),

pokrywane są przez producentów białkami (kolagen, żelatyna, albumina) celem nadania im odpowiedniej szczelności oraz zmniejszenia ryzyka szybkiej elucji antybiotyku z ich powierzchni.

Poważnym problemem przy wykorzystaniu syntetycznych protez naczyniowych jest występowanie pooperacyjnych powikłań infekcyjnych często o charakterze śmiertelnym. Obecnie w celu zmniejszenia ryzyka zakażeń stosuje się nasączanie protez antybiotykami. Dotychczasowe badania oprócz wymienionej powyżej adsorpcji biernej obejmują także połączenia o charakterze jonowym. Ten sposób ochrony jest jednak mało skuteczny ze względu na brak stabilności tego typu wiązań powstałych pomiędzy lekiem a biomateriałem i w związku z tym krótkotrwałym efektem leczniczym antybiotyku (Kinney 1991, Gahtan 1995, Haverich, 1998).

Głównym celem naszej pracy było sprawdzenie możliwości kowalencyjnego (trwałego) wiązania amikacyny do różnych typów poliestrowych protez naczyniowych oraz nadanie im długotrwałych właściwości antybakteryjnych.

Unieruchomienie amikacyny z biomateriałem przeprowadzono w oparciu o metodę opisaną w zgłoszeniu patentowym Nr P958934 naszego autorstwa (Ginalska 2003). Do badań wybrano komercyjne protezy naczyniowe wykonane z poliestru powlekane w zależności od producenta żelatyną bądź kolagenem. Ilość amikacyny związanej do poszczególnych biomateriałów, wydajność procesu immobilizacji oraz poziom elucji antybiotyku do buforu określono metodą spektrofotometryczną z dialdehydem ftalowym (Fru-

polytetrafluoroetylene and polyurethane are biomaterials used in blood vessels angioplastic. Polyester vascular prostheses are often sealed with proteins (collagen, gelatin, albumin) in order to obtain the appropriate tightness and to reduce the risk of quick antibiotic elution from graft surfaces. Post-operative infections are serious often mortal complications appearing in application of synthetic vascular prostheses. At present, the prostheses soaking in antibiotic solution is often applied to decrease the infections rate. Recent research include the antibiotic attachment to prostheses via ionic interactions, apart from the physical adsorption mentioned above. These protection methods, however, lack the efficiency because of the short-lived therapeutic effect of prostheses - attached antibiotic, resulting from the lack of stability of the bonds (Kinney 1991, Gahtan 1995, Haverich, 1998).

Main aim of our work was to verify the possibility of durable covalent amikacin binding to different types of polyester vascular prostheses to obtain their long-lasting antibacterial properties.

Antibiotic immobilization on biomaterials was performed according to a method described in our Patent pending No 958934 (Ginalska 2003). Polyester vascular prostheses chosen for experiments were sealed with gelatin or collagen due to producer's preferences. Amount of amikacin bound to the biomaterials, immobilization yield and level of antibiotic elution to buffer was estimated by spectrophotometric method with phthaldialdehyde (Frutos Cabanillas 2000) modified and optimized for our experiments. The results are presented in TABLE I. It was found that amikacin attaches to all tested vascular prostheses, however the immobilization yields and bound antibiotic amounts are the highest in case of gelatin-sealed biomaterials.

Next experiment showed that the antibiotic is bound via three types of interactions: physical (adsorption), ionic and covalent bonds. The percentage of particular interactions was estimated on base of the prostheses shaking in distilled water (removal of antibiotic attached by physical adsorption) and in solutions of NaCl in concentrations equal to ionic strengths previously determined for particular biomaterials (ionic interactions removal) TABLE II.

The experiment showed that the highest amount of antibiotic (77,3-89,6% of total amount) is covalently bound to prostheses. The durability of covalent bond between amikacin and different biomaterials types was tested by prostheses shaking in buffered saline solution (PBS) for 30 days. The prostheses soaked in antibiotic solution served as control. Low level of antibiotic elution from prostheses (2-3%) in comparison with control prostheses (50-100%) was observed, indicating the stability of created covalent bonds (FIG.1). In further research the bactericidal effect of immobilized amikacin against E. coli strain was tested. It was found that, on base of obtained results (TABLE III) that all types of amikacin-modified prostheses inhibited the growth of tested bacterial strain, in contrary to antibiotic-soaked control prostheses. Only in case of Gelsoft (modified by producer for ionic rifampicin attachment), the bactericidal effect was observed also for central prosthesis.

To sum up: the possibility of covalent immobilization of amikacin to different types of vascular prostheses was shown. The best immobilization results were obtained for gelatin-sealed biomaterials. All antibiotic-modified prostheses retain their bactericidal properties for least 30 days what may allow for sufficient protection against perioperative graft infections.

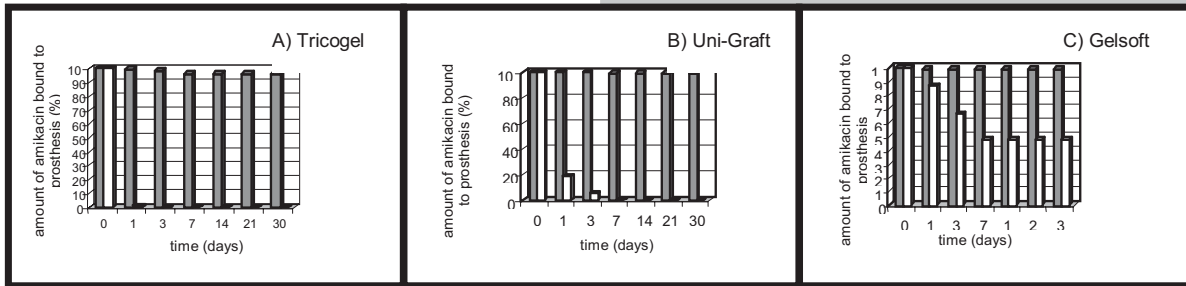
Rodzaj protezy Type of prosthesis		Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	Wovex™ (Bard)	Gelsoft™ (Vascutek)	Uni-Graft® DV straight (Braun)	Tricogel® (Tricomed)
Stężenie amikacyny Concentration of amikacin [mg/ml]	A	2,15	2,15	2,15	2,19	2,50
	B	1,84	1,76	1,51	1,41	1,92
Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]		14,4	18,1	30,0	35,6	23,2
Amikacyna związana z protezą Amikacin bound to prosthesis [mg/g]		2,48	3,12	5,12	6,24	4,64

A- concentration of amikacin before immobilization, B- concentration of amikacin after immobilization

**TABELA I. Rezultaty immobilizacji amikacyny na poliestrowych protezach naczyniowych.**  
**TABLE I. Results of amikacin immobilization on vascular prostheses.**

Rodzaj protezy Type of prosthesis	Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	Wovex™ (Bard)	Gelsoft™ (Vascutek)	Uni-Graft® DV straight (Braun)	Tricogel® (Tricomed)
Całkowita ilość związanej amikacyny Total amount of bound amikacin	100	100	100	100	100
Ilość amikacyny związanej adsorpcyjnie Amount of amikacin bound by physical adsorption	4,4	7,4	2,5	7,3	7,7
Ilość amikacyny związanej jonowo Amount of ionically bound amikacin	18,3	13,3	14,2	8,1	2,7
Ilość amikacyny związanej kowalencyjnie Ilość amikacyny związanej kowalencyjnie Amount of covalently bound amikacin	77,3	79,3	83,3	84,6	89,6

**TABELA II. Procentowy udział różnych typów wiązań utworzonych pomiędzy amikacyną i protezą.**  
**TABLE II. Percentage of different types of amikacin-prosthesis bonds.**



tos Cabanillas 2000) zmodyfikowaną i zoptymalizowaną przez nas do potrzeb eksperymentu. Uzyskane wyniki przedstawia TABELA I. Stwierdzono, że amikacyna immobilizuje się na wszystkich typach testowanych protez naczyniowych, jednak w przypadku biomateriałów żelatynowanych poziom wydajności procesu i ilość związanego antybiotyku jest najwyższa. W kolejnym eksperymencie stwierdzono, że w immobilizacji leku biorą udział trzy typy oddziaływań: fizyczne (adsorpcja), jonowe i kowalencyjne. Udział poszczególnych typów wiązań utworzonych pomiędzy antybiotykiem a protezą sprawdzono poprzez wytrząsanie różnych typów protez w wodzie destylowanej (adsorpcja bierna) i roztworach NaCl o stężeniach zgodnych z wcześniej wyznaczonymi siłami jonowymi dla poszczególnych biomateriałów (wiązania jonowe) TABELA II.

Eksperymentalnie wykazano, iż największy procentowy udział w wiązaniu antybiotyku odgrywiają wiązania kowalencyjne (77,3-89,6 %). Trwałość wiązań kowalencyjnych utworzonych pomiędzy różnymi typami biomateriałów a amikacyną badano poprzez wytrząsanie protez w buforowanym roztworze soli (PBS) w czasie 30 dni. Kontrole stanowiły protezy nasączone antybiotykiem. Stwierdzono niski poziom elucji antybiotyku z protez eksperymentalnych (2-3%) w porównaniu do protez kontrolnych (50-100%) co świadczy o stabilności utworzonego wiązania kowalencyjnego (RYS.1). W dalszym etapie badań sprawdzano działanie bakteriobójcze unieruchomionej amikacyny wobec szczepu E.coli. Na podstawie uzyskanych wyników (TABELA III) stwierdzono zahamowanie wzrostu testowanego szczepu bakterii wobec wszystkich typów biomateriałów modyfikowanych amikacyną, w przeciwieństwie do protez nasączanych antybiotykiem. Tylko w przypadku protezy Gelsoft, która przez producenta przygotowywana jest do wiązania jonowego rifampicyny efekt bakteriobójczy uzyskano również dla protezy kontrolnej.

Reasumując: Wykazano możliwość wiązania kowalencyjnego amikacyny do różnych typów protez naczyniowych. Najlepsze efekty wiązania uzyskano dla biomateriałów powlekanych żelatyną. Wszystkie modyfikowane antybiotykiem protezy zachowują właściwości bakteriobójcze przez okres co najmniej 30 dni przez co mogą stanowić wystarczającą ochronę przed zakażeniami okołoperacyjnymi.

**RYS. 1. Uwalnianie amikacyny z protez naczyniowych wytrząsanych przez 30 dni w PBS w temp. 37°C.**

**FIG. 1. Release of amikacin from vascular prostheses during 30 days of continuous shaking in PBS at 37°C.**

Rodzaj protezy Type of prosthesis	Strefy zahamowania wzrostu Inhibition Zone Diameters (mm)	
Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	Kontrola / Control	0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis	26 ± 0,0
Wovex™ (Bard)	Kontrola / Control	0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis	28 ± 0,0
Gelsoft™ (Vascutek)	Kontrola / Control	16 ± 0,1
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis	23 ± 0,2
Uni-Graft® DV straight (Braun)	Kontrola / Control	0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis	23 ± 0,0
Tricogel® (Tricomed)	Kontrola / Control	0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis	26 ± 0,2

Kontrola- protezy nasączone roztworem amikacyny  
Control - prosthesis soaked with amikacin solution  
Proteza modyfikowana- proteza po kowalencyjnej immobilizacji amikacyną  
Modified-prosthesis – prosthesis modified by covalent amikacin immobilization

**TABELA III. Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla amikacyny zimmobilizowanej z protezami.**

**TABLE III. Inhibition zones E.coli growth as a function of biological activity of amikacin immobilized on prostheses.**

**Piśmiennictwo**

[1] Frutos Cabanillas P., Diez Pena E., Barrales-Rienda I.M. and Frutos, G.: Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int. J. Pharm.* (2000), 209, 15-26.  
 [2] Gahtan, V., Esses, G.E., Bandy, D.F., Nelson, R.T., Dupont, E., Mills, J.L. Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin impregnated Dacron grafts. *J. Surg. Res.*, 58, (1995), 105-110.  
 [3] Ginalska G. Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M., A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934, (2003).

**References**

[4] Haverich, A., Hirt, S., Karak, M., Sialari, F., Wahling, H., Prevention of graft infection by bonding gentamicin to Dacron prostheses. *J. Vasc. Surg.* 15, (1998), 187-193.  
 [5] Kinney, E.V., Bandyk, D.F., Seabrook, G.A., Antibiotic bonded PTFE vascular grafts: the effect of silver antibiotic on bioactivity following implantation. *J. Surg. Res.*, 50, (1991), 430-435. *ukowe Z* 243, (1997).