

## SPOSOBY IMMOBILIZACJI CEFTRIAKSONU NA PROTEZACH NACZYNIOWYCH

MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*,  
DOROTA KOWALCZUK\*\*

\*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-930  
LUBLIN, UL. CHODŹKI 1

\*\*KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-  
090 LUBLIN UL. JACZEWSKIEGO 4,

[*Inżynieria Biomateriałów, 58-60, (2006), 39-41*]

### Wprowadzenie

W angioplastyce wykorzystywane są protezy naczyniowe wykonane z politetrafluoroetyleny (PTFE), polimetylometa-krylanu (PMMA) oraz polietylenotereftalanu (PET) uszczelnianego żelatyną lub kolagenem. Wszczepione pacjentowi implanty ulegają jednak zakażeniom bakteryjnym. Celem obniżenia ryzyka tego typu komplikacji pooperacyjnych proponuje się modyfikację biomateriałów naczyniowych antybiotykami lub związkami antyseptycznymi. Prosty sposób jest zwykle nasączenie protezy naczyniowej roztworem leku, prowadzone przed zabiegiem. W tym przypadku substancja przeciwbakteryjna wiąże się biernie lub jonowo z implantem. Jednak ze względu na brak stabilności wiązania pomiędzy protezą a lekiem, metoda ochrony przeciwbakteryjnej protez naczyniowych jest wciąż mało skuteczna.

Celem pracy badawczej było opracowanie formy chemicznego wiązania ceftriaxonu do żelatynowanych protez naczyniowych i w efekcie otrzymania efektywnej i przedłużonej w czasie antybakteryjnej ochrony implantów.

### Metodyka badań

Protezy naczyniowe Uni-Graft® (Braun) były modyfikowane chemicznie dwoma metodami. Pierwsza (Met. I) polegała na aktywacji 12.5% aldehydem glutarowym (GA) wg zmodyfikowanej metody Hermanson i wsp. (1) i wytworzeniu ramienia przestrzennego. Natomiast druga (Met. II) zachodziła z udziałem etyleno(diaminopropyl)-karbodiimidu (EDAC) bądź drugiego aktywatora hydroksylsulfosukcynyloimidu (HSSI). W obrębie tych dwóch głównych metod zastosowano dodatkowe modyfikacje: Met. I a- immobilizacja antybiotyku za pomocą GA z oddzielną immobilizacją leku, Met. I b- immobilizacja antybiotyku za pomocą GA z oddzielną immobilizacją leku w obecności kwasu octowego, Met. I c- jednoczesna aktywacja protezy GA i immobilizacja leku, Met. II a – aktywacja protezy przy pomocy EDAC, z oddzielną immobilizacją leku, Met. II b – niezależna aktywacja leku i protezy za pomocą EDAC, Met. II c – wspólna aktywacja protezy i leku za pomocą EDAC, Met. II d – immobilizacja antybiotyku na protezie aktywowanej przy pomocy dwóch aktywatorów (EDAC i HSSI), Met. II e - niezależna aktywacja leku i protezy roztworem dwóch aktywatorów (EDAC, HSSI), Met. II f – wspólna aktywacja antybiotyku i protezy roztworem dwóch aktywatorów (EDAC, HSSI). Zaktywowane wymienionymi sposobami protezy łączono z ceftriaxonem – cefalosporyną III generacji. Ilość antybiotyku związanego z protezami określono techniką HPLC wg Farmakopei Brytyjskiej (1998). Aktywność biologiczną immobilizowanej formy antybiotyku testowano wobec *S. aureus* ATCC 25923, bakterii odpowiedzialnej za infekcje pooperacyjne. Ocenę tworzenia biofilmu dokonano metodą redukcji TTC (3).

## METHODS OF CEFTRIAXON IMMOBILIZATION ON VASCULAR PROSTHESES

MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*,  
DOROTA KOWALCZUK\*\*

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

\*\*CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY, MEDICAL  
UNIVERSITY OF LUBLIN, 4 JACZEWSKIEGO STR, 20-090 LUBLIN,  
POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006), 39-41*]

### Introduction

In angioplasty, standard vascular prostheses made of polytetrafluoroethylene (PTFE), polymethylmethacrylate (PMMA) and polyethylene terephthalate (PET) sealed with gelatin or collagen are applied. However, after the implantation, these grafts may undergo bacterial infections. To lower the risk of these postoperative complications, the modification of vascular grafts with antibiotics or other aseptic compounds was proposed. The simple method include soaking the prosthesis before its implantation in antibiotic solution. In this case, however, the antibacterial agent binds to graft via physical absorption or ionic interactions. However, for the low stability of these bonds, such a method of vascular grafts protection lacks the appropriate effectiveness.

The aim of our research was optimization of chemical method of ceftriaxon immobilization on gelatin-sealed vascular prostheses and – as an effect – obtaining an effective and prolonged antibacterial protection of vascular grafts.

### Methods

Vascular prostheses Uni-Graft® (Braun) were chemically modified via two methods. One of them (Method I) was based on 12.5% glutaraldehyde (GA) activation according to modified Hermanson method (1), resulting in space-arm formation. The second one (Method II) was performed with ethylene(diaminopropyl)carbodiimide (EDAC) and optionally the second activator: hydroxylsulfosuccinylimide (HSSI). The versions of Method I were: Met. I a – GA as an activator with subsequent drug immobilization, Met. I b – GA as an activator with subsequent drug immobilization in presence of acetic acid, Met. I c – simultaneous prosthesis activation with GA and drug immobilization. For Method II, six versions were tested: Met. II a – prosthesis activation with EDAC, with subsequent drug immobilization, Met. II b – independent activation of both ceftriaxon and prosthesis with EDAC, Met. II c – simultaneous activation of both ceftriaxon and prosthesis with EDAC, Met. II d – drug immobilization on prosthesis activated with both agents (EDAC and HSSI), Met. II e – separate activation of ceftriaxon and prosthesis by solution of two activators (EDAC, HSSI), Met. II f – simultaneous activation of antibiotic and prosthesis with both agents (EDAC and HSSI). Then, the activated prostheses were coupled with ceftriaxon – third generation cephalosporin. Amount of antibiotic bound with the grafts was estimated by HPLC technique according to British Pharmacopoeia (1998). Antibacterial activity of immobilized antibiotic form was tested against *S. aureus* ATCC 25923, bacteria responsible for postoperational infections. Estimation of biofilm formation was performed according to the method based on TTC reduction method (3).

Metoda immobilizacji Immobilization method	I a	I b	I c	II a	II b	II c	II d	II e	II f
Ceftriakson związany z protezą Ceftriaxon bound to prosthesis mg/gprotezy]	3.79	5.58	22.79	10.95	5.10	4.73	6.09	3.71	5.17
Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]	13.00	25.92	62.06	30.65	11.53	14.70	15.50	6.11	11.64

TABELA 1. Ilości ceftriaksonu immobilizowanego na protezach naczyniowych.

TABLE 1. Amounts of ceftriaxon immobilized to the vascular prosthesis.

Metoda immobilizacji Immobilization method	Strefy zahamowania wzrostu po 24h Zones of bacterial growth inhibition after 24 h [mm]	CFU <i>S. aureus</i> after 1 day	CFU <i>S. aureus</i> after 7 days	CFU <i>S. aureus</i> after 14 days
I b	38	0	0	0
II a	31	0	0	$3 \times 10^2$
control	0	$3 \times 10^6$	Wzrost zlewny Heavy growth	Wzrost zlewny Heavy growth
* initial CFU <i>S. aureus</i> : $3 \times 10^6$				

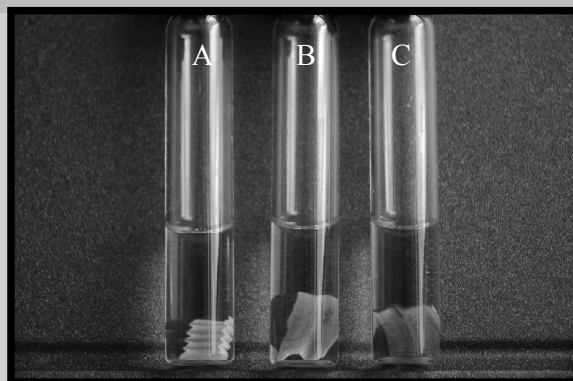
TABELA 2. Hamujący wpływ unieruchomionego ceftriaksonu na wzrost *S. aureus*.

TABLE 2. Inhibitory effect of immobilized ceftriaxon on *S. aureus* growth.

## Wyniki badań

Uzyskane wyniki dotyczące immobilizacji ceftriaksonu prezentuje TABELA 1. Na podstawie osiągniętych rezultatów stwierdzono, że oba sposoby modyfikacji chemicznej biomateriałów mogą być wykorzystywane do immobilizacji ceftriaksonu. Najwyższą wydajność procesu (62%) uzyskano Met. I c, lecz z powodu częściowego rozłożenia ceftriaksonu metody tej nie można było uznać za wiarygodną. Relatywnie wysokie wartości wydajności (30%) osiągnięto w procesie prowadzonym wg. Met. II przy użyciu EDAC, a nieco tylko słabsze efekty uzyskano podczas immobilizacji leku z GA w 6%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Met. I b), gdzie obecność grup  $\text{C}=\text{O}$  i jonów  $\text{H}^+$  podnosiła wartości uzyskanych rezultatów. Natomiast obecność HSSI, środka stabilizującego powstały nietrwały związek przejściowy, wbrew doniesieniom literaturowym (2) nie poprawiła wydajności procesu immobilizacji.

W dalszym etapie badań testowano aktywność biologiczną unieruchomionych form ceftriaksonu. W eksperymentach *in vitro* sprawdzono działanie zmodyfikowanych antybiotykiem protez naczyniowych na wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 poprzez pomiar stref zahamowania wzrostu na podłożu stałym i zmianę CFU w podłożu płynnym oraz tworzenie biofilmu. Na podstawie uzyskanych rezultatów, zebranych w TABELI 2 i RYS. 1 wykazano hamujący efekt immobilizowanej Met. I b i Met. II a formy ceftriaksonu na wzrost testowanego szczepu bakteryjnego, co wskazuje, że proponowane sposoby immobilizacji nie działają negatywnie na aktywność biologiczną leku. Użycie aldehydu glutarowego jako odstępniaka (Met. I) powoduje zahamowanie wzrostu *S. aureus* przez 14 dni eksperymentu, w przeciwieństwie do protez modyfikowanych EDAC. Przypuszczać można, że utworzone ramię



RYS.1. Ocena tworzenia biofilmu jako przejaw antybakteryjnych właściwości zmodyfikowanych protez. A - lek unieruchomiony Met. I b, B - lek unieruchomiony Met. II a, C - kontrolna, nie aktywowana proteza.

FIG.1. Biofilm formation as a test of antibacterial properties of modified biomaterial. A - drug bound with Met. I b, B - drug bound with Met. II a, C - control prosthesis without activation.

## Results

The results concerning ceftriaxon immobilization were summarized in TABLE 1. They suggest that both methods of chemical modification of prosthesis can be used for ceftriaxon immobilization. The highest immobilization yield (62%) was obtained in Met. I c, however, ceftriaxon in solutions remaining after the immobilization was partially degraded; therefore this method is not reliable. Relatively high immobilization yield (over 30%) was calculated for process performed according to Met. II with EDAC. Only slightly lower results (25%) were found for immobilization of drug with GA and acetic acid (Met. I b) because the presence of carbonyl groups and  $\text{H}^+$  ions increased the effectiveness of the method used for ceftriaxon immobilization. Presence of HSSI, the agent stabilizing the unstable compound did not – in contrast with data in the known literature – affects the immobilization process. Next, the biological activity of immobilized ceftriaxon was tested. *In vitro* experiments with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (measurement of zones of bacterial growth inhibition on solid medium, CFU changes in liquid medium and biofilm formation) revealed that antibiotic-modified vascular prostheses (according to Met. I a and Met. II a) exerted strong, inhibitory effect against tested bacterial strain (TABLE II and FIG.1). It shows that the proposed methods of antibiotic immobilization did not reduce its biological activity. Moreover, the observations points on a fact that GA used as space-arm (Met. I) probably allows for the closer proximity of immobilized drug with bacterial cell, which result in *S. aureus* growth inhibition for 14 days, in contrast to EDAC used as an alternative prosthesis activator.

przestrzenne umożliwia lepszy kontakt unieruchomionego leku z komórką bakteryjną aniżeli bezpośrednie połączenie leku z protezą.

## Wnioski

1. Przyłączanie ceftriaksonu do białkowej protezy naczyniowej można prowadzić przy pomocy aldehydu glutarowego, jako odczynnika między lekiem a protezą lub z użyciem EDAC, jako środka umożliwiającego formowanie wiązania amidowego pomiędzy wymienionymi czynnikami.
2. Porównanie obu metod unieruchamiania leku wskazuje, że antybiotyk odsunięty od biomateriału ramieniem przestrzennym wykazuje lepsze działanie przeciwbakteryjne aniżeli antybiotyk unieruchamiany metodą z udziałem EDAC.

## Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego promotorskiego Nr 2 PO5B 067 30

## Piśmiennictwo

- [1.] Hermanson G.T, Mallia A.K, Smith P.K. (1992), Immobilized affinity ligand techniques Academic Press, INC.  
 [2.] Abdel-Magid F. A., Carson G. K., Harris D. B. (1996), Reductive Animation of aldehydes and ketones with sodium triacetoksyborohydride. Studies on direct and indirect reductive animation procedures, J. Org. Chem., 61, 3849-3862.

## OPTIMALIZACJA WARUNKÓW IMMOBILIZACJI CEFTRIAKSONU W CELU UZYSKANIA SKUTECZNEGO DZIAŁANIA PRZECIWBAKTERYJNEGO PROTEZ NACZYNIOWYCH

MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*, DOROTA KOWALCZUK\*\*

\*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII,  
 AKADEMIA MEDYCZNA, 20-930 LUBLIN UL. CHODŹKI 1  
 \*\*KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW,  
 AKADEMIA MEDYCZNA, 20-090 LUBLIN UL. JACZEWSKIEGO 4

[*INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW, 58-60,(2006),41-43*]

## Wprowadzenie

Bakteryjne infekcje protez naczyniowych choć nie są częstym problemem w chirurgii naczyniowej (4%), to jednak są związane z dużą ilością przypadków amputacji kończyn (do 79%), śmiertelnością (do 75%) i mogą być spowodowane zaniedbaniami przedoperacyjnymi, zakażeniami miejsc operowanych lub układową bakteremią (1,2). Głównie *Staphylococcus aureus* (~70%) jak również *Staphylococcus epidermidis* i *Escherichia coli* są odpowiedzialne za większość infekcji implantów. W celu redukcji przypadków takich infekcji można stosować impregnację białkowych protez naczyniowych roztworem antybiotyku. Sposób ten jednak daje jedynie krótkotrwały efekt leczniczy.

Celem naszej pracy było uzyskanie protez o przedłużonej antybakteryjnej aktywności przez utworzenie kowa-

## Conclusions

1. Attachment of ceftriaxon to protein-sealed vascular prosthesis can be performed either using glutaraldehyde as a spacer arm between the drug and matrix or EDAC as an agent enabling the formation of amide bond between both elements subjected to coupling .
2. Comparison of the immobilization method used in the experiments showed that the method with GA allows for obtaining the higher antibacterial activity of immobilized drug than in the case of EDAC-method.

## Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Higher Education Polish Grant 2 Po5B 067 30

## References

- [3.] Wójtowska – Mach J., Róžańska A., Bulanda M. i wsp., (2002), Nadzór epidemiologiczny nad zakażeniami miejsca operowanego. Zakażenia, 1 – 2: 72 – 75.

## OPTIMIZATION OF CEFTRIAKSON IMMOBILIZATION CONDITIONS FOR OBTAINING THE EFFECTIVE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF VASCULAR PROSTHESES

MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA\*, GRAŻYNA GINALSKA\*, DOROTA KOWALCZUK\*\*

\*CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 1 CHODŹKI STR, 20-930 LUBLIN, POLAND  
 \*\* CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 4 JACZEWSKIEGO STR, 20-930 LUBLIN, POLAND

[*ENGINEERING OF BIOMATERIALS, 58-60,(2006),41-43*]

## Introduction

Vascular graft infections are still infrequent (4% incidence) but significant complications in vascular surgery. They are associated with high rate of limb loss (up to 79%) and mortality (up to 75%) and may be caused by preoperative contamination, postoperative wound infection or systemic bacteraemia [1,2]. Mainly *Staphylococcus aureus* (~70% cases) but also *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* are responsible for majority of implants' infections. Reduction of graft infection rate may be achieved by impregnation of the commercial protein-sealed prostheses with antibiotics solutions. However, simple soaking of prostheses in antibiotic solutions gives only short-term remedial effect.

Aim of our study was to obtain prolonged antibacterial