

OPTIMALIZACJA WARUNKÓW WIĄZANIA GENTAMYCYNY NA RÓŻNYCH TYPACH PROTEZ NACZYNIOWYCH

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK*, GRAŻYNA GINALSKA**

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

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

E-MAIL:MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),170-172]*

W chirurgicznych zabiegach rekonstrukcji naczyń obok autogennych materiałów wszczepiennych stosuje się syntetyczne protezy naczyniowe wykonane z biomateriałów polimerowych (polietylenotereftalanu, polimetylometakrylanu, politetrafluoroetyleny i poliuretanu). Istotnym problemem występującym przy zastosowaniu tego typu biomateriałów jest pojawianie się zakażeń pooperacyjnych, które niejednokrotnie mogą prowadzić do amputacji kończyny bądź zgonu pacjenta. Obecnie, w celu zapobiegania infekcjom pooperacyjnym stosuje się nasączenie protez odpowiednim antybiotykiem, bądź tworzy się słabe połączenia o charakterze jonowym. Implanty takie charakteryzują się jednak brakiem stabilności wiązania antybiotyku i w związku z tym krótkotrwałym efektem leczniczym. [1-3]

Głównym celem pracy było sprawdzenie możliwości wiązania gentamycyny oraz optymalizacja warunków tego procesu na różnych typach protez naczyniowych wykorzystywanych w angioplastyce naczyń.

Immobilizację gentamycyny z wybranym biomateriałem przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w zgłoszeniu patentowym Nr P958934 naszego autorstwa [4]. W badaniach wykorzystano firmowe protezy naczyniowe wykonane z poliestru powlekane dwoma typami białek żelatyną bądź kolagenem. Ilość gentamycyny związanej do poszczególnych typów biomateriałów oraz wydajność procesu immobilizacji określono metodą spektrofotometryczną z dialdehydem ftalowym [5]. Uzyskane wyniki przedstawia TABELA I.

Stwierdzono możliwość wiązania gentamycyny do wszystkich badanych protez naczyniowych, przy czym spośród

Rodzaj protezy Kind of prosthesis	Stężenie gentamycyny przed immobilizacją Concentration of gentamicin before immobilization [mg/ml]	Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]	Gentamycyna związana z protezą Gentamicin bound to prosthesis [mg/g]
Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	1.58	12.0	1.14
Wovex™ (Bard)	1.60	26.3	2.52
Gelsoft™ (Vascutek)	1.75	38.2	4.02
Uni-Graft® DV straight (Braun)	1.77	37.8	4.02
Tricogel® (Tricomed)	1.07	56.7	3.64

TABELA I. Rezultaty immobilizacji gentamycyny na poliestrowych protezach naczyniowych.
TABLE I. Results of gentamicin immobilization of polyester vascular prostheses.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF GENTAMICIN BONDING ON DIFFERENT TYPES OF VASCULAR PROSTHESES

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK*, GRAŻYNA GINALSKA**

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

**CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY, LUBLIN, POLAND

E-MAIL:MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[*Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),170-172]*

In surgical vessels reconstructions, aside of autogenous implantable materials, synthetic vascular prostheses made of polymeric biomaterials (polyethylene terephthalate, polymethacrylate, polytetrafluoroethylene and polyurethane) are frequently used. The important problems appearing while using these types of biomaterials are postoperative infections which may repeatedly lead to limb amputations or even to patient's death. Presently, in order to avoid the postoperative infections, the prostheses are soaked in appropriate antibiotic solution to create weak adsorptive or ionic interactions. Such implants, however, lack the appropriate stability of antibiotic-matrice bonds and therefore lack the long-lasting antibacterial effect [1-3].

Main aim of this work was verification of possibility of gentamicin bonding to different types of vascular prostheses used in vessel angioplastics and optimization of this process.

Immobilization of gentamicin on selected biomaterials was performed according to procedure described in our Patent pending no P 958934 [4]. Vascular prostheses tested in experiments were made of polyester and sealed by manufactures with two types of protein: gelatin or collagen. Amount of gentamicin bound to each type of biomaterials and immobilization yield was estimated according to spectrophotometric method with phtaldialdehyde. The results were presented in TABLE I.

It was found that gentamicin binds to all examined vascular prostheses although the best results were obtained

Rodzaj buforu Kind of buffer		Gentamycyna związana z protezą Gentamicin bound with prosthesis [mg/g]
0,1 M bufor Sörensen	pH 5.0	1.10
	pH 6.0	1.14
	pH 7.0	1.15
	pH 7.4	1.17
0,1 M bufor fosforanowy	pH 5.0	6.08
	pH 6.0	8.32
	pH 7.0	11.04
	pH 7.4	12.15
0,1 M buforowany roztwór soli (PBS)	pH 6.0	9.04
	pH 7.0	13.20
	pH 7.4	17.04

TABELA II. Dobór optymalnego typu buforu do immobilizacji gentamycyny.
TABLE II. Optimization of type of buffer for gentamicin immobilization.

wybranych do badań biomateriałów najlepsze rezultaty immobilizacji uzyskano w przypadku protez powlekanych żelatyną. W następnym etapie badań dokonano doboru odpowiedniego rodzaju i pH środowiska reakcji wiązania gentamycyny do poliestrowych biomateriałów (TABELA II). Najlepsze rezultaty immobilizacji uzyskano dla buforowego roztworu soli (PBS), pH=7.4.

W kolejnym eksperymencie określono optymalne czasy procesu wiązania gentamycyny do poszczególnych typów badanych protez. Uzyskane wyniki przedstawiono na RYSUNKU 1.

W przypadku wszystkich badanych biomateriałów optymalnym czasem immobilizacji gentamycyny jest czas 18 godzin, dalsze wydłużanie czasu wiązania wydaje się niekorzystne ze względu na możliwość utraty stabilności antybiotyku i jego właściwości bakteriobójczych.

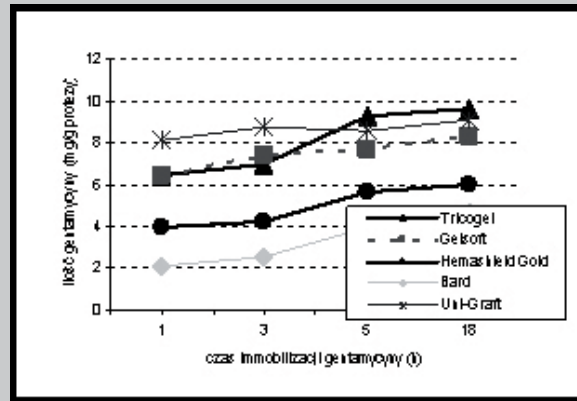
Następnie sprawdzono wpływ stężenia gentamycyny na ilość związanego antybiotyku i wydajność procesu immobilizacji (TABELA III a, b, c, d, e)

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia gentamycyny rośnie ilość związanej z protezą antybiotyku, maleje zaś wydajność immobilizacji. Przy małych stężeniach gentamycyny otrzymujemy małe ilości związanej antybiotyku i większą wydajność procesu. Wykazano również mniejszą zdolność wiązania gentamycyny do protez kolagenowanych w porównaniu z protezami powlekаныmi żelatyną.

Reasumując: wykazano możliwość immobilizacji gentamycyny do biomateriałów naczyniowych. Zoptymalizowano warunki procesu wiązania gentamycyny w celu uzyskania najbardziej efektywnego wiązania antybiotyku z protezami naczyniowymi. Ustalono między innymi: optymalne środowisko reakcji (buforowany roztwór soli PBS pH=7.4), czas wiązania antybiotyku (18h) oraz optymalne stężenia poszczególnych reagentów biorących udział w procesie immobilizacji gentamycyny z wybranymi biomateriałami.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr 3 T09B 052 29 (2005), finansowanego przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



RYS.1 Zależność ilości związanej gentamycyny od czasu reakcji.

FIG.1. Dependence of amount of bound gentamicin upon a time of immobilization process.

for gelatin-sealed ones. Then, the type of buffer and its pH for gentamicin binding to polyester biomaterials were optimized (TABLE II). The best results were observed for PBS, pH=7.4.

Next, the optima time of gentamicin bonding process to all prostheses types was found. The results are presented on FIGURE 1.

In case of all prostheses, the optima time for gentamicin immobilization is 18 hours; the prolonged time seems to be unprofitable because of the possibility of antibiotic stability and its antibacterial activity loss.

Next, the influence of initial antibiotic concentration on amount of immobilized gentamicin and the yield of the process was tested (TABLE III a, b, c, d, e).

It was observed that the higher was initial gentamicin concentration the higher was the amount of bound gentamicin and lower was immobilization yield. Therefore, for low gentamicin concentration, the amount of bound antibiotic was also low but with higher immobilization yield. Moreover, collagen-sealed prostheses showed lower ability for gentamicin bonding than gelatin-sealed ones.

To recapitulate: the possibility of gentamicin immobilization to vascular prostheses was shown. The conditions of gentamicin immobilization were optimized for most effective antibiotic bonding to the prostheses. Optimized parameters were: reaction buffer (phosphate buffered saline –PBS –pH7.4), time of antibiotic immobilization (18 h) and optimal initial concentration of gentamicin used for immobilization process.

Acknowledgements

The work was supported by Polish grant No 3 T09B 052 29 (2005), financed by the Minister of Science and Higher Education.

	Ilość gentamycyny przed immobilizacją (mg/g protezy) Amount of gentamicin before immobilization (mg/g of prosthesis)	Ilość gentamycyny związanej do protezy (mg/g protezy) Amount of gentamicin bound to prosthesis (mg/g of prosthesis)	Wydajność immobilizacji % Immobilization yield %
a) proteza prosthesis Tricogel	2.88	1.91	66.46
	6.43	3.64	56.72
	15.42	7.90	51.11
	28.32	9.94	35.06
	46.02	10.26	22.29
b) proteza prosthesis Gelssoft	88.26	13.92	15.77
	2.64	1.20	45.4
	3.96	1.56	39.3
	10.50	4.02	38.2
	20.46	4.45	21.7
c) proteza prosthesis Uni-Graft	42.60	7.20	16.9
	90.42	22.32	24.6
	2.76	0.72	26.0
	4.98	1.56	31.3
	10.62	4.02	37.8
d) proteza prosthesis Hemashield Gold	20.46	6.96	34.0
	38.28	10.56	27.5
	82.56	18.78	22.7
	3.00	1.20	40.0
	4.62	0.72	15.5
e) proteza prosthesis Wovex	9.48	1.14	12.0
	20.16	3.12	15.4
	39.60	4.32	10.9
	82.02	6.24	7.6
	2.76	1.56	56.5
	4.14	1.92	46.3
	9.60	2.52	26.3
	20.64	4.38	21.2
	41.58	6.60	15.8
	68.22	6.72	9.8

TABELA III Optymalizacja stężenia gentamycyny w procesie immobilizacji.

TABLE III Optimization of gentamicin concentration for immobilization process.

- [1] F. Sardelic, P.Y. Ao, D.A. Taylor, J.P. Fletcher, Prophylaxis against Staphylococcus epidermidis vascular graft infection with rifampicin – soaked, gelatin-sealed Dacron, *Cardiovasc. Surgery* 4 (1996) 389-392.
- [2] M. Vicaretti, W.J. Hawthorne, P. Y. Ao, J.P. Fletcher, An increased concentration of rifampicin bonded to gelatin sealed Dacron reduces the incidence subsequent graft infection following a staphylococcal challenge, *Cardiovasc. Surgery* 6 (1998) 268-273.
- [3] A. Haverich, S. Hirt, M. Karak, F. Sialari, H. Wahling, Prevention of graft infection by bonding gentamicin to dacron prostheses, *J. Vasc. Surg.* 15 (1998) 187-193.

- [4] Ginalska G. Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M., A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934, (2003), *Biuletyn Urzędu Patentowego* 18 (2004) (801) s.124.
- [5] Frutos Cabanillas P., Dičz 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.

OKREŚLENIE OPTIMALNYCH WARUNKÓW IMMOBILIZACJI AMIKACYNY NA MATERIAŁACH NACZYNIOWYCH

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK*, GRAŻYNA GINALSKA**

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

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

E-MAIL:MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 58-60, (2006), 172-174*]

Immobilizowane formy antybiotyków od lat budzą duże zainteresowanie zarówno w przemyśle biotechnologicznym jak i w medycynie. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy możliwość trwałego wiązania gentamycyny i amikacyny do biomateriałów poliestrowych wykorzystywanych w angioplastyce naczyń [1-3]. Uzyskanie tego typu wiązania wydaje się mieć istotne znaczenie w ewentualnym leczeniu infekcyjnych powikłań pooperacyjnych, ze względu na możliwość utrzymywania odpowiedniej dawki leczniczej antybiotyku na powierzchni protezy naczyniowej w określonym czasie.

Głównym celem pracy było zoptymalizowanie warunków procesu immobilizacji amikacyny na różnych typach protez naczyniowych wykorzystywanych w chirurgii naczyniowej.

Wiązanie amikacyny z wybranymi biomateriałami naczyniowymi przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w zgłoszeniu patentowym naszego autorstwa [4]. Badania przeprowadzono na firmowych protezach naczyniowych wykonanych z polietylenotereftalanu uszczelnianych białkami (żelatyną bądź kolagenem). Stężenie amikacyny określano metodą spektrofotometryczną z dialdehydem ftalowym z detekcją UV przy długości fali 335 nm opracowaną przez nas na podstawie metody oznaczania gentamycyny [5]. Wstępne badania nad optymalizacją procesu wiązania amikacyny obejmowały określenie środowiska reakcji poprzez dobór odpowiedniego typu buforu i jego pH. Wykazano, że najodpowiedniejszym

ESTIMATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR AMIKACIN IMMOBILIZATION ON VASCULAR BIOMATERIALS

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK*, GRAŻYNA GINALSKA**

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

**CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY, LUBLIN, POLAND

E-MAIL:MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[*Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006), 172-174*]

Immobilized antibiotic for years attract the interest of both biotechnological industry and medicine. In our earlier works [1-3] we have shown the possibility of durable and stable bonding of gentamicin and amikacin to polyester biomaterials used in vessel angioplastics. Such a modification seems to be a great importance in likely treatment of postoperative infections, because such modified prostheses retain the appropriately high antibiotic concentration in sufficient time after the implantation.

The main aim of this work was optimization of conditions of amikacin immobilization on different types of prostheses used in vascular surgery.

Immobilization of amikacin on selected vascular prostheses was performed according to procedure described in our patent pending [4]. The vascular prostheses were all made of polyethylene terephthalate and sealed either with gelatin or with collagen. Concentration of amikacin was estimated by spectrophotometric method with phtaldialdehyde and UV-detection at 335 nm, optimized for our conditions on base of gentamicin estimation method [5]. Pilot exper-

Rodzaj buforu Kind of buffer		Amikacyna związana z protezą Amikacin bound with prosthesis [mg/g]
0,1 M bufor Sörensen	pH 5.0	0.98
	pH 6.0	1.26
	pH 7.0	1.34
	pH 7.4	1.15
0,1 M bufor fosforanowy	pH 5.0	2.98
	pH 6.0	3.67
	pH 7.0	5.24
	pH 7.4	5.67
0,1 M buforowany roztwór soli (PBS)	pH 6.0	3.91
	pH 7.0	4.25
	pH 7.4	6.56

TABELA I. Dobór optymalnego typu buforu do immobilizacji amikacyny.

TABLE I. Optimization of type of buffer for amikacin immobilization