

ANTYINFEKCYJNE WŁAŚCIWOŚCI ŻELATYNOWANYCH PROTEZ NACZYNIOWYCH MODYFIKOWANYCH GENTAMYCYNĄ

Osińska M., Ginalska G., Belcarz A.

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

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 97-99]

Powszechne stosowanie protez naczyniowych spowodowało zwiększenie liczby infekcji związanych z użyciem sztucznych materiałów. Jest to poważny problem dla chirurgów, gdyż zakażenia syntetycznych przeszczepów naczyniowych

niejednokrotnie prowadzą do zgonu chorego lub są powodem amputacji kończyny. Dotychczasowe badania nad użyciem ochrony przeciwbakteryjnej wszczepianych biomateriałów obejmują unieruchamianie antybiotyków na drodze adsorpcji lub są związane z wytwarzaniem słabych wiązań jonowych pomiędzy lekiem a materiałem wszczepiennym (Kinney 1991; Gahtan 1995; Haverich 1998).

Głównym celem pracy było nadanie właściwości antybakteryjnych żelatynowanym protezom naczyniowym wykonanym z politereftalanu etylenu (gel-PET) poprzez ich kowalენტne związanie z gentamycyną, antybiotykiem aminoglikozydowym.

Procedura immobilizacji wymienionego leku została przeprowadzona według zgłoszenia patentowego naszego autorstwa (Ginalska 2003). Ilość gentamycyny związanej z protezą gel-PET, wydajność procesu immobilizacji oraz poziom elucji leku z materiału do buforu określano techniką wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) według zoptymalizowanej metody farmakopealnej (Farmakopea Brytyjska 1998). Uzyskane wyniki prezentuje TABELA I.

Stwierdzono, że każda z form gentamycyny wiąże się z biomateriałem, a całkowita ilość leku na protezie wynosi ponad 12000 mg/kg biomateriału. Trwałość wiązań kowalencyjnych utworzonych między antybiotykiem a protezą gel-PET sprawdzono przez wytrząsanie protez w buforowanej roztworze soli (PBS) i określano w czasie ilości uwalnianego leku. Stwierdzono, że po 30 dniach trwania doświadczenia na protezach pozostało 97.8% antybiotyku w porównaniu z poziomem wyjściowym (RYS. 1). Niski poziom elucji leku (około 3%) świadczy o stabilności utworzonego wiązania kowalencyjnego. Ta ilość gentamycyny uwolniona w pierwszych 7 dniach doświadczenia prawdopodobnie była wiązana jonowo lub pasywnie.

W dalszym etapie badań sprawdzono działanie unieruchomionych form gentamycyny na wzrost bakterii. Wykorzystano tu szczepki referencyjne *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz izolaty kliniczne tych bakterii pochodzące od pacjentów.

Uzyskane rezultaty (TABELA II) świadczą o hamującym działaniu immobilizowanej gentamycyny na wzrost bakterii. Dla każdego ze szczepków obserwowano występowanie silnego zahamowania wzrostu bakterii - efekt bakteriobójczy, a w przypadku wysokiego miana wyjściowego bakterii - efekt bakteriostatyczny. Stwierdzono ponadto, że modyfi-

ANTI-INFECTION PROPERTIES OF GELATINATED VASCULAR PROSTHESES MODIFIED BY COVALENT GENTAMICIN IMMOBILIZATION

Osińska M., Ginalska G., Belcarz A.

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY,
M. CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY, 20-031 LUBLIN, POLAND
[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 97-99]

Common use of vascular prostheses provoked an increase of frequency of their infections. This makes a significant problem for surgeons because infections of synthetic vascular grafts frequently lead to patients' decease or to limb amputations. Previous research on antibacterial material included antibiotics immobilization via adsorption or weak ionic bonding between the medicine and implanted material (Kinney 1991; Gahtan 1995; Haverich 1998). This type of modification protects vascular prostheses against bacterial infections only up to 5 days because the antibiotic is being eluted from biomaterial by circulating blood.

Main aim of the research was to protect the gelatinated vascular prostheses made of poly (ethylene terephthalate) (gel-PET) by their covalent bonding with gentamicin (aminoglycoside antibiotic).

Immobilization procedure of this medicine was performed according to our Patent pending (Ginalska 2003). Amount of gentamicin bound to prosthesis gel-PET, yield of immobilization and level of antibiotic eluted from prosthesis to buffer were determined by HPLC technique (high pressure liquid chromatography) according to British Pharmacopoeia (1998). The results were presented in Table I.

It was found that each of gentamicin form bound to the biomaterial. Total amount of antibiotic on prosthesis exceeded 12000 mg/kg of biomaterial. Stability of covalent bonds created between antibiotic and gel-PET prosthesis was tested by shaking of prosthesis with buffered saline solution (PBS). Amount of antibiotic released to buffer was estimated at time intervals. After 30 days of experiment duration, 97.8% of initial amount of antibiotic remained on prostheses (FIG. 1). Such a low level of antibiotic elution (about 3%) confirms the stability of such created covalent bonds. This amount of gentamicin eluted from prostheses during first 7 days of experiment suggests that it was bound passively or via ionic bonds. Activity of gentamicin immobilized on prostheses was tested against reference strains of *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and also against clinical isolates of these strains from hospital patients.

The results (TABLE II) testify that immobilized gentamicin exerts inhibitory effect on bacterial growth. Strong inhibition of bacterial propagation - bactericidal effect - was observed for each bacterial strain; in a case of high cfu/ml this effect was bacteriostatic. Moreover, gentamicin-modified vascular prostheses reveal antibacterial effect during subsequent multiple infections of environment surrounding this biomaterial by fresh doses of bacterial cells (TABLE III).

In vitro experiment included also growth of bovine aorta endothelial cells on gentamicin-modified biomaterial.

Stężenie gentamycyny Concentration of gentamicin [mg/ml]										Wydajność immobilizacji Immobilization yield (%)	Gentamycyna związana z protezą Gentamicin bound to prosthesis (mg/kg)
C1		C1a		C2a		C2		Całkowita ilość gentamycyny Total amount of gentamicin			
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
2.973	1.811	1.146	0.666	0.490	0.300	0.632	0.359	5.242	3.138	40.15	12 620

TABELA I. Rezultaty immobilizacji gentamycyny na protezach naczyniowych PET uszczelnianych żelatyną. C1, C1a, C2a, C2 - formy gentamycyny, A-stężenie składników gentamycyny przed immobilizacją, B-stężenie składników gentamycyny po immobilizacji

TABLE I. Results of gentamicin immobilization on gelatinated vascular prostheses PET.

C1, C1a, C2a, C2 - gentamicin forms, A-concentration of gentamicin components before immobilization, B-concentration of gentamicin components after immobilization

Szczep / Strain	MIC µg/ml	Wyjściowe miano bakterii Cell density cfu/ml	% zahamowania wzrostu bakterii Percent of bacterial growth inhibition
<i>Escherichia coli</i>			
izolat z ucha / isolated from ear	1,0	4×10^6	100
izolat z układu moczowego / isolated from urinal system	1,5	4×10^6	100
ATCC 25922	4,0	4×10^6 4×10^8	100 80±5
<i>Staphylococcus aureus</i>			
izolat z gardła / isolated from throat	1,0	$1,9 \times 10^7$	100
izolat z kału / isolated from stools	1,0	$1,9 \times 10^7$	100
ATCC 25923	3,0	$1,9 \times 10^7$ $1,9 \times 10^9$	100 50 ±8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
izolat ze skóry powieki / isolated from eyelids	3,0	$5,9 \times 10^6$	100
ATCC 27853	0,5	$5,9 \times 10^6$ $5,9 \times 10^8$	100 50 ±8

TABELA II. Hamujące działanie immobilizowanej gentamycyny na wzrost bakterii wytrząsanych w pożywce Luria-Bertani w temp. 37°C przez 28 dni.

TABLE II. Inhibitory effect of immobilized gentamicin on bacteria growth during shaking in Luria-Bertani medium at 37°C during 28 days.

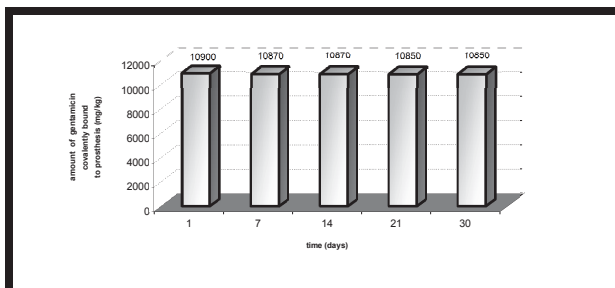
kowane gentamycyną protezy naczyniowe wykazują skuteczność hamowania wzrostu bakterii w warunkach wielokrotnego zakażenia środowiska otaczającego biomateriał świeżymi dawkami bakterii (TABELA III).

W doświadczeniach *in vitro* przeprowadzono hodowlę komórek śródbłonna aorty wołowej na zmodyfikowanym gentamycyną biomateriale. Ilość komórek śródbłonna stwierdzona na protezach gel-PET-genta była porównywalna z

Amount of endothelial cells found on gel-PET-genta prostheses was comparable with their number on control prostheses (FIG. 2).

Therefore, it was found that chemical modification of gel-PET prosthesis by the antibiotic did not exert any toxic effect on growth of endothelial cells.

To sum up: covalent immobilization of gentamicin on surface of vascular prostheses provides a stable antibacterial protection of biomaterial as the antibiotic remains on prosthesis surface at appropriate concentration for a long time.

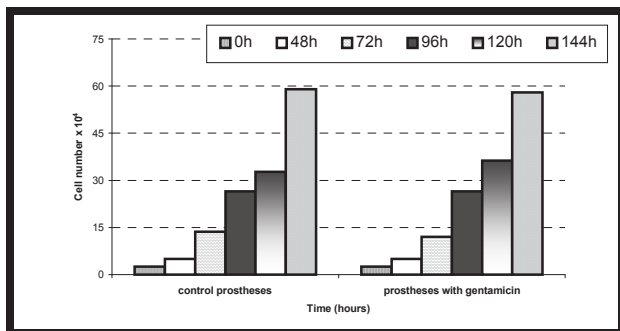


RYS. 1. Uwalnianie gentamycyny z protez naczyniowych gel-PET wytrząsanych przez 30 dni w PBS w temp. 37°C.

FIG. 1. Release of gentamicin from vascular prosthesis gel-PET during 30 days of continuous shaking in PBS at 37°C.

References

- [1] British Pharmacopoeia, (1998). HMSO, London, 1: 302.
- [2] Gahtan, V., Esses, G.E., Bandyk, 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., Osipińska M., A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934, (2003).
- [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.



RYS. 2. Ocena wzrostu komórek śródbłonna na protezach naczyniowych związanych z gentamycyną.
FIG. 2. Evaluation of endothelial cells growth on vascular prostheses with immobilized gentamicin.

ilością komórek zasiedlających protezy kontrolne (RYS.2). Stwierdzono więc, że modyfikacja chemiczna protez gel-PET podczas immobilizacji antybiotyku nie wpływa toksycznie na wzrost komórek śródbłonna.

Reasumując: immobilizacja kowalencyjna gentamycyny na powierzchni protez naczyniowych doprowadziła do uzyskania stabilnej ochrony antybakteryjnej biomateriału ze względu na utrzymanie antybiotyku na powierzchni w odpowiednim stężeniu przez długi czas.

szczep/proteza strain/prosthesis		% OD _{550nm} oznaczany w dniu: % OD _{550nm} measured at day:				
		7	14	21	28	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PK PG	100 0	182 0	191 0	295 0	332 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	PK PG	100 0	200 0	286 0	280 0	280 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PK PG	100 0	190 0	180 0	280 0	290 0

TABELA III. Ocena wzrostu bakterii w obecności protez: kontrolnych (PK) i zawierających związaną gentamycynę (PG). Protezy zakażano co 7 dni świeżą dawką inokulum bakterii (1x 10⁶ cfu/ml).

TABLE III Estimation of bacterial growth by OD 550 nm measurement in presence of control (CP) and gentamicin -bound (GP) prostheses. Fresh bacterial cells (1x 10⁶ cfu/ml) were added to the medium with prosthesis every 7 days.

MODYFIKACJA POLIETYLENU O WYSOKIEJ GĘSTOŚCI HOMO I KOPOLIMEREM KWASU ASPARAGINOWEGO

JOLANTA POLACZEK, EWA DZIKI, MAŁGORZATA WAŚ, JAN PIELICHOWSKI,

SAMODZIELNA KATEDRA CHEMII I TECHNOLOGII TWORZYW SZTUCZNYCH,
 POLITECHNIKA KRAKOWSKA
 UL. WARSZAWSKA 24, 31 -155 KRAKÓW

Streszczenie

W pracy przedstawiono kompozyty polietylen - poli(kwas asparaginowy) oraz wyniki badań fizyko - mechanicznych i analizę tych właściwości po znużeniu w płynie imitującym działanie płynów ustrojowych

Słowa kluczowe: poli(kwas asparaginowy), polietylen, właściwości fizyko - mechaniczne.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 38-43, (2004), 99-102]

Wprowadzenie

Polietylen o wysokiej gęstości (HD PE), obok innych tworzyw termoplastycznych tj. polilaktyd (PL), polisulfon (PS), jest podstawowym materiałem polimerowym stosowanym

MODIFICATION OF HD POLYETHYLENE USING HOMO AND COPOLYMER OF POLY(ASPARTIC ACID)

JOLANTA POLACZEK, EWA DZIKI, MAŁGORZATA WAŚ, JAN PIELICHOWSKI,

DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF POLYMERS,
 CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
 UL. WARSZAWSKA 24, 31 -155 KRAKÓW

Abstract

This paper presents polyethylene - poly(aspartic acid) composites and its physico - mechanical properties after exposure to model liquid, imitating the effect of body fluids.

Key words: poly(aspartic acid), polyethylene, physico - mechanical properties.

[*Engineering of Biomaterials*, 38-43, (2004), 99-102]

Introduction

High density polyethylene HDPE, like polylactide (PL) and polysulphone (PS) is a thermoplastic material used to manufacture orthopedic implants, especially pelvic joints, where the material is exposed to high load. Its advantage is high mechanical durability, good biological toleration, biodegradability resistance and low price [1, 2]. Unfortunately, there are also some disadvantages which appear after long time exploitation in a human body, such as excessively fast