

OCENA MOŻLIWOŚCI IMMOBILIZACJI FLUROCHINOLONÓW DO POLITEREFTALANU ETYLENU

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK¹, GRAŻYNA GINALSKA²,
MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA²

¹ ZAKŁAD BIOCHEMII, UNIwersYTET M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ,
20-031 LUBLIN, POLSKA

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA,
20-031 LUBLIN, POLSKA

E-MAIL: MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 23-24]

Polietereftalan etylenu należy do grupy biomateriałów poliestrowych wykorzystywanych w kardiologii naczyniowej między innymi do produkcji syntetycznych protez naczyniowych. Istotnym zagrożeniem wynikającym z zastosowania tego typu biomateriałów w zabiegach chirurgii naczyniowej jest pojawianie się wczesnych bądź późnych zakażeń, które z kolei mogą prowadzić do amputacji kończyny bądź zgonu pacjenta. Obecnie, znane metody zapobiegające tego typu powikłaniom ograniczają się do zastosowania protez naczyniowych nasączanych odpowiednim antybiotykiem, bądź powlekanych solami srebra. Implanty tego typu odznaczają się jednak słabymi właściwościami bakteriobójczymi i nie zapewniają skutecznej ochrony protez przed infekcjami bakteryjnymi [1-3].

Głównym celem pracy było sprawdzenie możliwości wiązania chemioterapeutyków należących do grupy fluorochinolonów (pefloksacyna, sparfloksacyna i cyprofloksacyna) do protez naczyniowych wykonanych z politereftalanu etylenu wykorzystywanych w chirurgii naczyń.

Immobilizację pefloksacyny, sparfloksacyny i cyprofloksacyny do protezy naczyniowej Tricogel® (Tricomed, Polska) przeprowadzono z zastosowaniem czynnika wiążącego 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu. Sprawdzono dwie metody wiązania fluorochinolonów: 1) polegającą na utworzeniu aktywnych grup $-C=O$ na powierzchni biomateriału, oraz 2) polegającą na aktywacji karbodiimidem odpowiedniego chemioterapeutyku. Dodatkowo zastosowano klasyczną metodę nasączania protez wybranymi fluorochinolonami. Ilość poszczególnych specyfików związanych do biomateriału oraz wydajność procesu immobilizacji określono metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w opracowaniu własnym. Otrzymane wyniki przedstawia TABELA 1 i 2.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wiązania pefloksacyny i cyprofloksacyny tylko po zastosowaniu metody wiązania polegającej na aktywacji biomateriału karbodiimidem. Pozostałe badane metody wiązania uniemożliwiają skuteczne unieruchamianie wszystkich badanych fluorochinolonów. W przypadku sparfloksacyny stwierdzono brak możliwości skutecznej immobilizacji leku bez względu na rodzaj zastosowanej techniki wiązania. W następnym etapie badań sprawdzono działanie bakteriobójcze fluorochinolonów unieruchomionych metodą I na protezie naczyniowej. Na podstawie otrzymanych wyników (TABELA 3) stwierdzono zahamowanie wzrostu testowanych szczepów bakterii (*E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*) wobec biomateriałów modyfikowanych pefloksacyną i cyprofloksacyną, w przeciwieństwie do protez zawierających związaną sparfloksacynę.

W kolejnym etapie badań określono właściwości antibakteryjne, pefloksacyny związanej z protezą naczyniową inkubowaną w pożywce płynnej LB w czasie 7 dni.

ESTIMATION OF POSSIBILITY OF FLUROQUINOLONE ANTIBIOTICS IMMOBILIZATION TO POLYETHYLENE TEREPHTHALATE

MONIKA OSIŃSKA-JAROSZUK¹, GRAŻYNA GINALSKA²,
MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA²

¹ DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MARIA CURIE-SKŁODOWSKA
UNIVERSITY, 20-031 LUBLIN, POLAND

² CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY,
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 20-093 LUBLIN, POLAND

E-MAIL: MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 23-24]

Polyethylene terephthalate belongs to the group of polyester biomaterials used in vascular cardiosurgery for different purposes including the production of synthetic vascular prostheses. The serious disadvantage of these prostheses is the risk of early and high infections after their surgical implantations, which may result in limb amputation or even patients' death. Commonly known methods used for the infection prevention include the impregnation with silver salts or soaking with antibiotics solutions. Such implants, however, reveal only weak antibacterial activities and do not prevent the prostheses effectively against bacterial infections [1-3].

The aim of the research was the verification of possibility of fluoroquinolone chemotherapeutics (pefloxacin, sparfloxacyn, ciprofloxacin) immobilization to polyethylene terephthalate vascular prostheses used in vascular surgery.

Immobilization of pefloxacin, sparfloxacyn and ciprofloxacin to vascular prosthesis Tricogel® (Tricomed, Poland) was performed using 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide as a binding factor. Two methods of fluoroquinolones binding were tested: 1) creation of active $-C=O$ groups on biomaterial surface 2) activation of an appropriate drug with carbodiimide. Moreover, classical method of soaking the prostheses with the fluoroquinolone solution was used. Amount of the chemicals bound to the biomaterial and immobilization yield were estimated on a base of HPLC technique with some modifications. The results are presented in TABLE 1 and 2.

The results showed the possibility of pefloxacin and ciprofloxacin binding to the prostheses only via carbodiimide activation method. Other tested methods of biomaterial activation were found to be ineffective for fluoroquinolones binding. In case of sparfloxacyn, the drug was found to be unsusceptible for immobilization regardless of the binding technique.

Antibacterial activity of fluoroquinolones immobilized to prosthesis according to the method I was tested against *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* bacterial strains. According to the results presented in TABLE 3, the growth of all tested strains was inhibited by pefloxacin and ciprofloxacin but not sparfloxacyn immobilized on vascular prostheses.

Antibacterial activity of pefloxacin immobilized according to the method I was tested also in liquid LB medium while incubated for 7 days. Bactericidal effect was measured as a function of increase of medium turbidity at OD550nm. It was shown that tested bacterial strain growth was inhibited in presence of pefloxacin-modified vascular prosthesis in opposite to control non-modified prosthesis without the drug (TABLE 4, FIG.1).

Summarizing the conclusions: Immobilization of pefloxacin and sparfloxacyn to polyethylene terephthalate vascular prostheses via the biomaterial activation by carbodiimide is possible.

Metoda wiązania / Binding method		Pefloksacyna Pefloxacin	Sparfloksacyna Sparfloxacin	Cyprofloksacyna Ciprofloxacin
		Wydajność immobilizacji / Immobilization yield (%)		
I	karbodiimid + proteza / carbodiimide + prosthesis	60,2	0,2	49,6
II	karbodiimid + fluorchinolon / carbodiimide + fluoroquinolone	0,6	0,15	0,14
III	nasączenie / soaking	0,5	0,1	0,09

TABELA 1. Rezultaty wydajności immobilizacji wybranych fluorochinolonów do poliestrowych protez naczyniowych Tricogel®.

TABLE 1. Field of immobilization of tested fluoroquinolones on polyester vascular prostheses Tricogel®.

Szczep bakteryjny / Bacterial strain	Strefy zahamowania wzrostu / Growth inhibition zones [mm]		
	Pefloksacyna pefloxacin	Sparfloksacyna sparfloxacin	Cyprofloksacyna ciprofloxacin
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, MIC < 5µg	43	0	30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, MIC < 5µg	30	0	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853, MIC 5-10µg	29	0	24

TABELA 3. Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla fluorochinolonów immobilizowanych z protezą Tricogel® metodą I (karbodiimid-proteza).

TABLE 3. Zones of inhibition of bacterial growth for fluoroquinolones immobilized on Tricogel® vascular prosthesis according to the method I (carbodiimide-prosthesis).

Efekt bakteriobójczy określano przez pomiar zmętnienia OD550nm. Wykazano brak wzrostu badanych szczepów bakteryjnych w obecności modyfikowanej pefloksacyną protezy naczyniowej w przeciwieństwie do protez kontrolnych nie posiadających związanego leku. (TABELA 4; RYS. 1).

Reasumując: wykazano możliwość immobilizacji pefloksacyny i cyprofloksacyny do protez naczyniowych wykonanych z polietereftalanu etylenu metodą polegającą na aktywacji biomateriału karbodiimidem. Biomateriały zawierające tak związane chemioterapeutyki wykazywały skuteczną ochronę przeciwbakteryjną. Pozostałe metody wiązania nie wykazywały zadawalającego poziomu wiązania badanych fluorochinolonów.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr T09B05229, finansowanego przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Piśmiennictwo

- [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] 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.

Metoda wiązania / Binding method		Pefloksacyna Pefloxacin	Sparfloksacyna Sparfloxacin	Cyprofloksacyna Ciprofloxacin
		Ilość związanego leku / Amount of bound drug (mg/g)		
I	karbodiimid + proteza / carbodiimide + prosthesis	8,0	0,026	6,5
II	karbodiimid + fluorchinolon / carbodiimide + fluoroquinolone	0,07	0,019	0,018
III	nasączenie / soaking	0,06	0,013	0,012

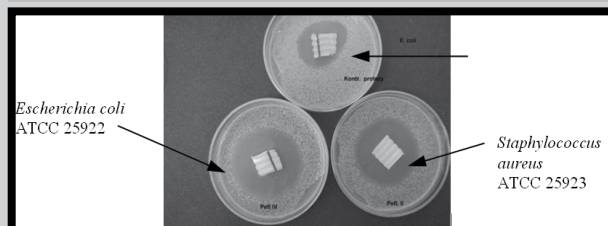
TABELA 2. Rezultaty ilości związanego leku do poliestrowych protez naczyniowych Tricogel®.

TABLE 2. Amounts of the drug bound to polyester vascular prostheses Tricogel®.

Szczep / strain	Dawka infekcyjna / Infecting dose (CFU/mL)	Proteza / Prosthesis	% OD _{550nm}	
			1 dzień / 1'day	dzień / 7 day
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1 x 10 ⁴	Kontrola / Control PET + pefl.	0,33 0	0,53 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1 x 10 ⁴	Kontrola / Control PET + pefl.	0,28 0	0,56 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1 x 10 ⁴	Kontrola / Control PET + pefl.	0,18 0	0,46 0

TABELA 4. Ocena wzrostu bakterii na podstawie pomiaru OD550nm w obecności protez: kontrolnej i zawierającej związaną pefloksacynę.

TABLE 4. Estimation of bacterial growth (turbidity measurement at OD550nm) in presence of prostheses: control and containing immobilized pefloxacin.



RYS.1. Zdjęcie ilustrujące strefy zahamowania wzrostu *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* na podłożu Mueller-Hinton w obecności protez Tricogel® zmodyfikowanych pefloksacyną (metoda I).

FIG.1. Inhibition of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* growth on Mueller-Hinton agar medium in presence of Tricogel® prosthesis modified with pefloxacin (method I).

The biomaterials containing such immobilized antibiotics revealed the effective antibacterial properties. Other binding methods did not provide satisfactory results of tested fluoroquinolones immobilization to vascular prostheses.

Acknowledgements

The work was supported by polish Grant of Ministry of Science and Higher Education No T09B05229.

References

- [3] T. Hernández-Richter, H.M. Schardey, F.Wittmann, S. Mayr, M. Schmidt-Sody, S. Blasenbren, M.M. Heiss, C. Gabka, M.K. Angele, Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 26 (2003) 550-557.