

korozyjnych oraz prądów korozyjnych. Dla próbek poddanych pasywacji chemicznej średnie wartości potencjałów korozyjnych wynosiły $E_{cor}=150\text{mV}$, natomiast dla próbek pasywowanych elektrochemicznie były niższe i wynosiły $E_{cor}=-88\text{mV}$. Natomiast dla próbek pasywanych chemicznie oraz elektrochemicznie średnie wartości gęstości prądu korozyjnego wynosiły odpowiednio $i_{cor}=231\text{ nA/cm}^2$ oraz $i_{cor}=223\text{ nA/cm}^2$.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość zastosowania zabiegów pasywacji do uszlachetniania powierzchni implantatów ze stopów NiTi. Modyfikacja zastosowanych parametrów procesów pasywacji, zarówno chemicznej, jak również elektrochemicznej nie wpływa istotnie na odporność korozyjną badanego stopu. Z uwagi na łatwość obróbki oraz ze względu na uzyskiwaną jakość powierzchni po obróbce zaleca się przeprowadzenie procesu pasywacji metodami chemicznymi.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010-2012 jako projekt badawczy N N507 464538.

Conclusions

The results of the research showed that the proposed passivation methods can be applied as surface treatment of implants made of NiTi alloys. Modification of the applied parameters of passivation, both chemical and electrochemical, does not significantly influence the corrosion resistance of the investigated alloy. Due to the ease of the surface treatment and the obtained surface quality, passivation of the NiTi alloy should be carried out with the use of chemical methods.

Acknowledgements

The work was financially supported by Ministry of Science and Higher Education from the funds in the years 2010 - 2012 as the research grant N N507 464538.

Piśmiennictwo

References

- [1] V. Chuprina: Examination of the process of oxidation of titanium nickelide, Powder metallurgy and metal ceramics. 28(4) (1989), 310 - 314.
- [2] C. Chan, C. Trigwell, T. Duerig: Oxidation of an NiTi alloy, Surface and Interface Analysis. 15 (1990), 349 - 354.
- [3] S. A. Shabalovskaya: Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material, Bio-Medical and Engineering, 12, (2002).

OCENA WIĄZANIA ANTYBIOTYKÓW FLUROCHINOLONOWYCH Z PROTEZĄ NACZYNIOWĄ

DOROTA KOWALCZUK^{*1}, GRAŻYNA GINALSKA², MAŁGORZATA
MIAZGA-KARSKA²

¹KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW,
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
UL. JACZEWSKIEGO 4,
20-090 LUBLIN, POLSKA

²KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
UL. CHODZKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA

Abstrakt

Przeciwbakteryjną protezę naczyniową otrzymano przez kowalencyjne wiązanie sparfloksacyiny (SPA) lub tosufloksacyiny (TOS) z jej żelatynowaną powierzchnią z użyciem aldehydowego i aminowego łącznika. Ilości obydwu antybiotyków związanych z żelatynową warstwą oceniono na podstawie różnic w stężeniu leków,

EVALUATION OF THE BINDING OF FLUROQUINOLONE ANTIBIOTICS TO THE VASCULAR PROSTHESIS

DOROTA KOWALCZUK^{*1}, GRAŻYNA GINALSKA², MAŁGORZATA
MIAZGA-KARSKA²

¹CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY,
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
4 JACZEWSKIEGO STREET, 20-090 LUBLIN, POLAND

²CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
1 CHODZKI STREET, 20-093 LUBLIN, POLAND.

Abstract

Antimicrobial gelatine-sealed vascular prosthesis was developed by the covalent bonding of sparfloxacilin (SPA) or tosufloxacilin (TOS) to their surface by using of aldehyde and amine linkers. The amounts of both antibiotics bound to the gelatine layer were evaluated on the basis of the differences in drug concentrations before and after immobilization measured by HPLC

przed i po immobilizacji, określanych metodą HPLC. Aktywność przeciwbakteryjną protezy modyfikowanej antybiotykiem wobec szczepów oceniono stosując test hamowania stref wzrostu i test liczenia kolonii. Przeprowadzone z użyciem szczepów *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* badania wykazały, że kowalencyjna immobilizacja SPA i TOS na powierzchni implantu stanowi stabilną przeciwbakteryjną ochronę przez co najmniej 2 tygodnie. [Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 34-37]

Wprowadzenie

W przypadku stosowania syntetycznych materiałów implantacyjnych, należy zawsze liczyć się z ryzykiem pooperacyjnych infekcji powszczepiennych. Infekcja wszczepionej protezy naczyniowej sama w sobie jest rzadką, ale poważną komplikacją chirurgii naczyniowej. Przypadki zakażenia wszczepionych protez notowano zmiennie od 1% do 6% [1,2]. Z punktu widzenia prewencji, nadrzędną potrzebą jest otrzymanie protezy z substancją, która zapobiega powstawaniu biofilmu.

Celem prezentowanej pracy było otrzymanie przeciwbakteryjnej protezy naczyniowej z kowalencyjnie związanymi antybiotykami fluorochinolonowymi (sparflokscyną lub tosuflokscyną), używając homobifunkcjonalnego aldehydu i multi-aminę jako łączników, w celu redukcji pooperacyjnych infekcji.

Metody

Fragmenty protez naczyniowych (10x5 mm) pokrytych żelatyną (Vascutek® Gelsoft) aktywowano glutaraldehydem według procedury zawartej w patencie [3]. Zaktywowaną powierzchnię poddano działaniu dietylenotriaminy (łącznik aminowy) i ponownie glutaraldehydu (łącznik aldehydowy), a następnie tak zmodyfikowaną powierzchnię połączono ze SPA (Rhône-Poulenc Rorer, France) lub TOS (Chemos GmbH, Niemcy) w środowisku dimetylosulfotlenku (DMSO). Celem zwiększenia trwałości wiązania, ugrupowania iminowe zredukowano wodorem „in statu nascendi” z użyciem borowodorku sodu do ugrupowań aminowych.

Celem optymalizacji procesu immobilizacji, zmodyfikowane próbki poddano oddziaływaniu roztworom SPA lub TOS o różnych stężeniach 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml i 0,1 mg/ml przygotowanych w DMSO. Roztwory przygotowane do immobilizacji i otrzymane po tym procesie, po odpowiednim rozcieńczeniu, oznaczono metodą HPLC z detekcją UV (Waters HPLC system) dla oceny całkowitej ilości leku związanego z powierzchnią zmodyfikowanej próbki.

Aktywność przeciwbakteryjną protez naczyniowych ze związanym chemioterapeutycznym testowano in vitro wobec szczepów bakteryjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992, odpowiedzialnych za infekcje pooperacyjne, z zastosowaniem badania hamowania stref wzrostu bakterii (Mueller-Hinton agar) i liczenia koloni (Mueller-Hinton bulion). Obecność żywych bakterii kontrolowano przyrostem wartości CFU.

Rezultaty

Do otrzymania przeciwbakteryjnych protez naczyniowych zastosowano sparflokscynę i tosuflokscynę. Fluorochinolonowe antybiotyki zostały wybrane ze względu na ich szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych.

Przeciwbakteryjne właściwości powierzchni protezy

method. Antimicrobial activity of antibiotic-modified prosthesis against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains was assessed using zone of inhibition and colony count assays. The performed researches indicated that the covalent immobilization of SPA and TOS on the graft surface resulted in stable antibacterial protection for at least of 2 weeks.

[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 34-37]

Introduction

The risk of postoperative graft infections must be taken into account when these synthetic materials are applied. Infection of the prosthetic vascular graft itself is a rare but serious complication of vascular surgery. The incidence of prosthetic graft infections has been reported to vary from 1% to 6% [1,2]. From a prevention standpoint, the need to develop a prosthesis with substance that prevents a biofilm formation is paramount.

The aim of the present paper was to obtain antibacterial vascular prosthesis with a covalent binding of a fluoroquinolone antibiotics (sparfloxacin or tosufloxacin), using of homobifunctional aldehyde and multi-amine as linkers, in order to reduce postoperative infections.

Methods

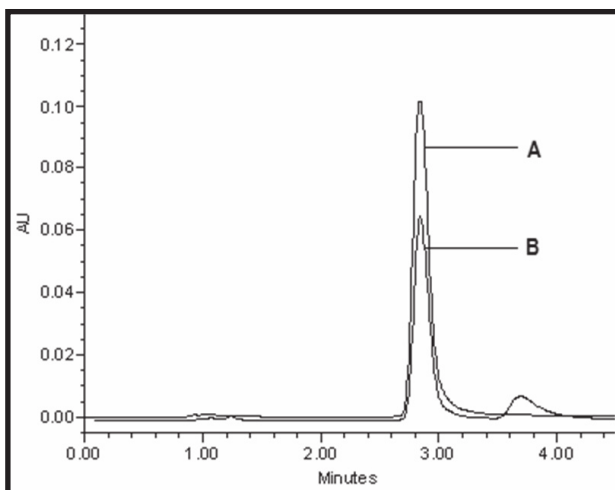
A vascular prosthesis segments (10x5 mm) gelatine-sealed (Vascutek® Gelsoft) were activated with glutaraldehyde according to the procedure described in the Polish Patent [3]. The activated surface was subjected to impact of diethylenetriamine (amine linker) and again of glutaraldehyde (aldehyde linker), and then such modified surface was linked to SPA (Rhône-Poulenc Rorer, France) or TOS (Chemos GmbH, Germany) in dimethyl sulfoxide (DMSO) medium. In order to an increase of the bond stability, the imine group was reduced with hydrogen „in statu nascendi” to amine group using sodium borohydride. With the aim of optimizing the immobilization process, the modified samples were subjected to impact solutions of SPA or TOS at the different concentrations of 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml and 0.1 mg/ml prepared in DMSO. The solutions prepared for the immobilization and the solutions obtained after this process, adequate diluted, were determined by HPLC method with UV-detection (Waters HPLC system) for the evaluation of the total amount of drug linked with surface of the modified sample.

Antimicrobial activity of the vascular prosthesis with the bound chemotherapeutic agent was tested in vitro against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 bacterial strains, responsible for postoperative infections, using zone of bacterial growth inhibition (Mueller-Hinton agar) and colony count (Mueller-Hinton broth) assays. The presence of living bacteria in broth medium was controlled as a CFU value increase.

Results

To obtain the antimicrobial vascular prosthesis, sparfloxacin and tosufloxacin was used. This fluoroquinolone antibiotics were selected because of their broad-spectrum antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms.

Antimicrobial properties of prosthesis surface was obtained by an alternatively activation with glutaraldehyde and diethylenetriamine, and then by coupling with SPA or TOS in organic medium to form a relatively stable Schiff base following by hydrogen reduction.



RYS.1. Przykładowe chromatogramy otrzymane dla roztworów przed (A) i po (B) immobilizacji przy stężeniu początkowym TOS 1.0 mg/ml.

FIG.1. The exemplary chromatograms obtained for the solutions before (A) and after (B) immobilization at initial TOS concentration of 1.0 mg/ml.

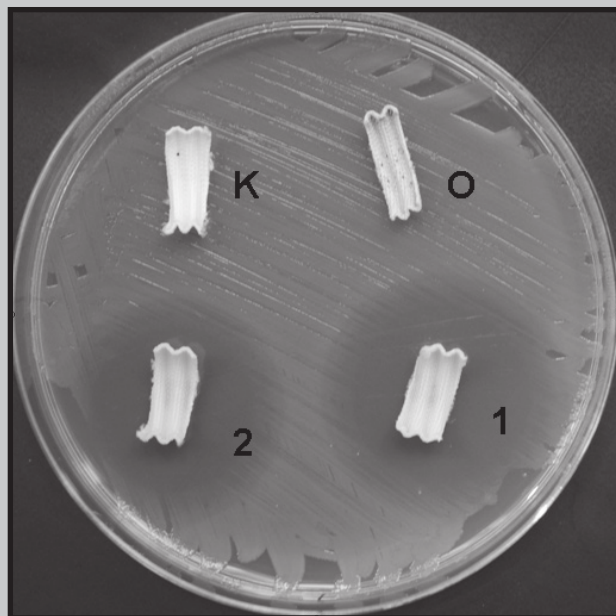
otrzymano przez naprzemienną aktywację glutaraldehydem i dietylenotriaminą, a następnie przez połączenie ze SPA lub TOS w organicznym środowisku tworząc stosunkowo trwałą zasadę Schiff'a, w kolejnym etapie zredukowaną wodorem.

Ilości leków związanych ze zmodyfikowaną powierzchnią protezy obliczono na podstawie różnic w stężeniach SPA lub TOS, przed i po immobilizacji, oznaczonych metodą HPLC (RYSUNEK 1). Ilości antybiotyków przyłączonych do biomateriału były różne w zależności od ich stężeń w roztworach użytych do immobilizacji. Ze wzrostem początkowego stężenia leków, ilości tych leków związane z nośnikiem rosły, ale wydajność immobilizacji malała. Stężenie antybiotyku w zakresie 2 - 1 mg/ml zostało wybrane jako optymalne do immobilizacji obydwu leków biorąc pod uwagę wydajność tego procesu (ok. 50%) i aktywność przeciwbakteryjną tak otrzymanego implantacyjnego materiału.

Zmodyfikowane próbki ze SPA lub TOS zbadano pod względem ich działania wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992 stosując test płytkowy. Jak pokazano (RYSUNEK 2), strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek ze SPA lub TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 0.2 mg/ml wynosiły 10–15 mm, a dla próbek ze SPA lub TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 2.0 mg/ml wynosiły 25–30 mm. Próbki nie modyfikowane antybiotykiem nie wykazały stref zahamowania wobec wszystkich badanych szczepów, podobnie jak próbki aktywowane tylko glutaraldehydowym i aminowym łącznikiem. Obecność stref zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek zawierających antybiotyk demonstruje, że proces immobilizacji nie zmienił aktywności przeciwbakteryjnej SPA i TOS.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek ze SPA lub TOS otrzymanych przy stężeniu 1 mg/ml potwierdzono przy użyciu testu cieczowego wobec tych samych szczepów bakteryjnych, jak również w badaniu płytkowym. Brak wzrostu bakterii może sugerować, że antybiotyk był zdolny dyfundować do bulionu i był aktywny. Jak pokazano (TABELA 1), próbka zmodyfikowana SPA była chroniona przed kolonizacją mikroorganizmów przez 17 dni (*E. coli*) i 16 dni (*S. aureus*), podczas gdy próbka zmodyfikowana TOS była chroniona przed kolonizacją mikrobów przez 16 dni (*E. coli*) i 9 dni (*S. aureus*).

Na podstawie testów mikrobiologicznych można wyde-



RYS.2. Strefy zahamowania wzrostu jako przejaw aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowanych protez. K - kontrola niemodyfikowana, O - kontrola modyfikowana łącznikami, 1- próbka ze SPA modyfikowana przy stężeniu 2 mg/ml, 2 - próbka ze SPA modyfikowana przy stężeniu 0.2 mg/ml.

FIG.2. Zones of antibacterial effect of the modified biomaterial; K - unmodified sample, O - sample modified with linkers, 1- sample with SPA modified at concentration of 2 mg/ml, 2 - sample with SPA modified at concentration of 0.2 mg/ml.

The amounts of drugs bound to the modified prosthesis surface were calculated on the basis of the differences in SPA or TOS concentrations, before and after immobilization, determined by HPLC method (FIGURE 1). The quantities of antibiotics attached to biomaterial were altered by changing their concentrations in solutions used for immobilization. With increasing initial concentration of drugs, the amounts of these drugs associated with the carrier were increased, but immobilization yield decreased. The antibiotic concentration in the range of 2 - 1 mg/ml was selected as optimal for immobilization of both drugs, taking into account the yield of this process (about 50%) and antimicrobial activity of such obtained implantable material.

The modified samples with SPA or TOS were examined for their effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 strains by using of plate test. As it has been shown (FIGURE 2), the zones of bacterial growth inhibition around the samples with SPA or TOS obtained after immobilization in a solution of 0.2 mg/ml were 10-15 mm, and for the samples with SPA or TOS obtained after immobilization in a solution of 2.0 mg/ml were 25-30 mm. The unmodified samples without antibiotic showed no zones of inhibition against all tested strains, similarly as samples modified only with glutaraldehyde and amine linkers. The presence of inhibition zones of bacterial growth around antibiotic-containing samples demonstrated that the immobilization process did not change the antimicrobial activity of SPA and TOS.

Antimicrobial activity of the modified samples with SPA or TOS, obtained at concentration of 1 mg/ml, was confirmed by use of the liquid test against the same bacterial strains as in plate test. The lack of bacterial growth can suggest that antibiotic was able to diffuse into the culture medium and was active. As it has been shown (TABLE 1), the SPA-

TABELA 1. Hamujący wpływ immobilizowanego antybiotyku na wzrost *E. coli* i *S. aureus*.
TABLE 1. Inhibiting effect of the immobilized antibiotic on growth of *E. coli* and *S. aureus*.

Badana próba Test sample	CFU, days																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Próba kontrolna A* Control sample A*	Wzrost zlewny Heavy growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Próba kontrolna B* Control sample B*	Heavy growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli																	
Próba ze SPA Sample with SPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4x10 ⁸
Próba z TOS Sample with TOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Heavy gro- wth
Staphylococcus aureus																	
Próba ze SPA Sample with SPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	3x10 ⁶
Próba z TOS Sample with TOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	He- avy gro- wth	-	-	-	-	-	-
*-control sample A - the unmodified sample, control sample B - the sample modified with linkers																	

dukować, że aktywność przeciwbakteryjna protez naczyniowych zmodyfikowanych SPA i TOS była spowodowana zarówno dyfuzją obydwu antybiotyków do agaru i bulionu (niekowalencyjne wiązanie leków) jak i obecnością obydwu antybiotyków na powierzchni (kowalencyjne wiązanie leków).

Podziękowania

Badanie było finansowane z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, KBN No N N405 385037.

modified sample was protected from microbial colonization for 17 days (*E. coli*) and 16 days (*S. aureus*), whereas the TOS-modified sample was protected from microbial colonization for 16 days (*E. coli*) and 9 days (*S. aureus*).

From microbiological tests, it can be deduced that the antimicrobial activity of SPA and TOS modified vascular prostheses was due to the diffusion of both antibiotics into agar and broth media (non-covalent attached drugs) and to the presence of both antibiotics on the surface (covalent attached drugs).

Acknowledgements

This research was supported by a grant from Ministry of Scientific Research and Information Technology, KBN No N N405 385037.

Piśmiennictwo

- [1] Zeltsman D, Tzamas CD, Kerstein MD. Management of vascular prosthetic infections: results of long-term follow-up. *Am Surg.* 65 (1999) 331–333.
 [2] Wilson SE. New alternatives in management of the infected vascular prosthesis. *Surg Infect.* 2 (2001) 171–177.

References

- [3] Ginalska G., Uryniak A., Łoborzewski J., Osińska M. Polski Paatent Nr 201383 Sposób immobilizacji antybiotyków zawierających l-rzędowe grupy aminowe ze stałymi matrycami pokrytymi białkiem, (2003)