

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 ostatecznika 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

Metodyka

Ceftriakson (BIOTON Polska) był unieruchamiany na żelatynowanej protezie PET (Braun) według zmodyfikowanej metody Hermanson i wsp. (3) z własnymi zmianami. Aldehyd glutarowy (GA) stosowany był w tej metodzie jako aktywator i jednocześnie ramię przestrzenne pomiędzy protezą a lekiem. Ilość ceftriaksonu związanego z protezą oraz wydajność procentowa procesu immobilizacji były wyznaczane metodą HPLC wg Farmakopei Brytyjskiej (1998). Ocenę tworzenia biofilmu wykonano metodą redukcji TTC (4). Testowanym szczepem był *S. aureus* ATCC 25922, częste źródło zakażeń poszczipiennych.

Stężenie leku przed immobilizacją Concentration of ceftriaxon before immobilization [mg/ml]	Ceftriakson związany z protezą Ceftriaxon bound to prosthesis [mg/g]	Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]
20	33.47	8.85
2	20.00	11.00
0.1	0.67	18.84
0.01	0.06	20.80

TABELA 1. Rezultaty immobilizacji ceftriaksonu na protezach naczyniowych Uni-Graft® (Braun) w zależności od użytego stężenia leku.
TABLE 1. Results of ceftriaxon immobilization on vascular prostheses Uni-Graft® (Braun) in dependence on concentration of drug.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawione w TABELI 1 wskazują, że przy wysokich stężeniach ceftriaksonu użytego do immobilizacji, ilość leku związanego z nośnikiem jest najwyższa, ale wydajność procesu jest wówczas najniższa. Natomiast przy niskich wyjściowych stężeniach ceftriaksonu wydajność immobilizacji jest wysoka, ale do protezy wiąże się mała ilość leku. Uzyskane wyniki wskazują, że ilość związanego antybiotyku może być łatwo regulowana. Stwierdzono dodatkowo (TABELA 2), że wydajność procesu wzrasta w obecności jonów H^+ do 34%, natomiast środowisko zasadowe jest niekorzystne dla reakcji aminacji. W kolejnym doświadczeniu wykazano obecność różnych oddziaływań wytworzonych między lekiem a protezą typu: adsorpcji fi-

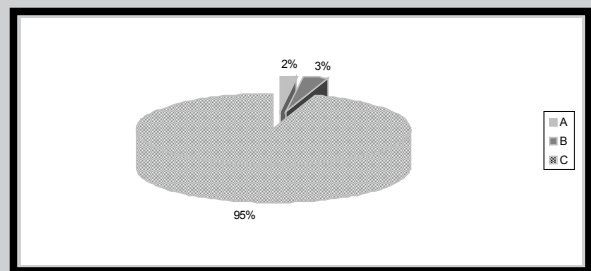
pH środowiska reakcji immobilizacji pH of immobilization medium	Ceftriakson związany z protezą Ceftriaxon bound to prosthesis [mg/g]	Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]
4.3	5.98	33.66
7.0	5.50	25.90
9.0	1.30	7.87

TABELA 2. Rezultaty immobilizacji ceftriaksonu na protezach naczyniowych Uni-Graft® (Braun) w zależności od zastosowanego pH reakcji immobilizacji.
TABLE 2. Results of ceftriaxon immobilization on vascular prostheses Uni-Graft® (Braun) in dependence on medium pH for immobilization reaction.

protection of vascular grafts, employing covalent immobilization of ceftriaxon to gelatin-sealed prostheses.

Methods

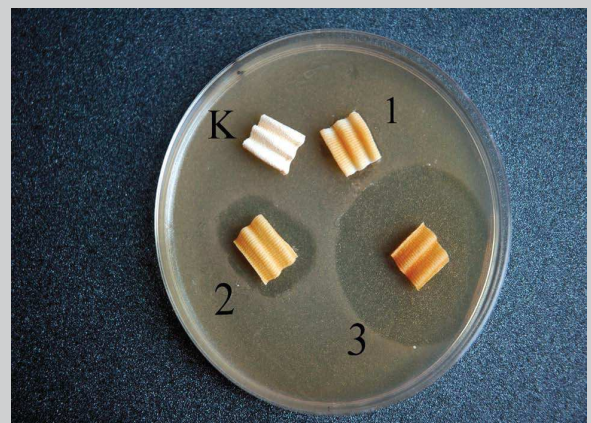
Ceftriaxon (BIOTON, Poland) was immobilized on gelatin-sealed PET prosthesis (Braun) according to the modified method described by Hermanson et al [3]. Glutaraldehyde (GA) was used in this method as an activator and space arm between biomaterial and drug. Amount of ceftriaxon bound to prosthesis and percent yield of immobilization were determined by HPLC technique according to British Pharmacopoeia (1998). Estimation of biofilm formation was performed according to the method based on TTC reduction (4). The bacterial strain tested in the experiments was *S. aureus* ATCC 25922, the most common bacteria responsible for the majority of post-operational infections.



RYS. 1. Procentowy udział 3 typów oddziaływań wytworzonych między protezą naczyniową a ceftriaksonem: A – adsorpcja fizyczna, B – wiązania jonowe, C – wiązania kowalencyjne
FIG. 1. The percentage particular interactions of ceftriaxon with prosthesis: A: physical adsorption, B – ionic bonds, C – covalent bonds

Results

The results (TABLE I) affirm that large concentration of ceftriaxon used for immobilization process allowed for ob-



RYS. 2. Strefy zahamowania wzrostu jako przejaw aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowanych protez. 1 - proteza odpłukana NaCl, 2 - proteza odpłukana wodą, 3 - proteza nieodpłukana, K - proteza bez aktywacji.
FIG. 2. Zones of bacterial growth inhibition as a function of antibacterial effect of modified biomaterial. 1 - prosthesis washed out in NaCl, 2 - prosthesis washed out in water, 3 - prosthesis without washing, K - control prosthesis without activation.

	Protezy nieodpłukane Prosthesis without washing out	Protezy odpłukane H ₂ O Prosthesis washed out in H ₂ O	Protezy odpłukane NaCl Prosthesis washed out in NaCl	Kontrola Control pros- thesis without activation
Tworzenie biofilmu po 14 dniach Biofilm formation after 14 days	-	-	++	++++
CFU <i>S. aureus</i> po 14 dniach CFU <i>S. aureus</i> after 14 days	0	0	5x10 ²	Wzrost zlewny Heavy growth
* initial CFU of <i>S. aureus</i> : 3x10 ⁶				

TABELA 3. Ocena tworzenia biofilmu (metodą TTC) i zmian CFU jako przejawy antybakteryjnych właściwości zmodyfikowanych protez.

TABLE 3. Biofilm formation (TTC-method) and CFU values changes as a test of antibacterial properties of modified biomaterial.

zycznej, wiązań jonowych i silnych wiązań kowalencyjnych. Ich procentowy udział określono przez odmywanie protez w wodzie (usunięcie antybiotyku związanego fizycznie) i następnie w 0.9% NaCl (usunięcie antybiotyku związanego jonowo). Stwierdzono, że wiązania kowalencyjne stanowią zdecydowaną większość (~95%) całej puli oddziaływań proteza-lek (RYS. 1). Następnie testowano efekty mikrobiologiczne unieruchomionego leku wobec szczepu *S. aureus* ATCC 25922. Na podstawie wykonanych zdjęć (RYS.2) oraz wyników zebranych w tabeli 3 stwierdzono, że protezy naczyniowe modyfikowane ceftriaksonem hamują wzrost badanego szczepu przez 14 dni trwania eksperymentu. Jednocześnie wykazano, że unieruchomienie ceftriaksonu za pomocą 3 typów oddziaływań chroni protezę naczyniową przed zasiedleniem bakteriami *S. aureus*, bowiem na biomateriale nie stwierdzono żywych bakterii. Zatem wydaje się, że stosowanie tak modyfikowanych protez może być korzystne dla antybakteryjnej ochrony wszczepionych implantów.

Wnioski

- Obecność jonów wodorowych poprawia wydajność procesu immobilizacji
- Ilość ceftriaksonu związanego z protezą zależy od stężenia leku użytego do immobilizacji
- Użycie protez modyfikowanych ceftriaksonem może być korzystne dla antybakteryjnej ochrony wszczepionych implantów.

Podziękowania

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

Piśmiennictwo

- [1] Kielar M., (2001), Wyniki leczenia późnych zakażeń protez naczyniowych. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 9: 68 – 83.
 [2] Wang J, Huang N, Yang P (2004), The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials*, 25: 3163-70

taining the highest amount of drug bound to matrix, but the immobilization yield was the lowest, whereas using small concentration of drug, the immobilization yield was the highest, but quantity of bound ceftriaxon was the smallest. Hence the amount of immobilized drug can be easily regulated. We asserted (TABLE II) that presence of H⁺ ions additionally improved the process of antibiotic immobilization (up to 34%) but basic medium was not profitable for amination reaction. In the next experiment we showed that ceftriaxon was bound by different types of interactions: physical adsorption, ionic bonds and strong covalent bonds. The percentage of particular interactions was estimated by washing out the prosthesis in water (removal of antibiotic attached by physical adsorption) and then in 0.9% NaCl (removal of ceftriaxon bound by ionic bonds). It was found that the dominating amount of antibiotic (~95% of total amount) was covalently bound to the graft. (FIG. 1). In further research, the biological effect of bound antibiotic was tested against *S. aureus* ATCC 25922 strain. Results presented in FIG.2 and TABLE 3. showed that the ceftriaxon-modified vascular prostheses inhibited the growth of tested bacterial strain for 14 days of experiment. Moreover it was found that ceftriaxon immobilization via 3 types of interactions allowed for the prosthesis protection against *S. aureus* settling because no living bacteria were observed on the graft surface. Therefore it seems that the use of such modified prostheses may be highly promising at antibacterial perioperative implants protection.

Conclusions

- presence of H⁺ ions improves the process of antibiotic immobilization
- quantity of bound ceftriaxon depends on used concentration of antibiotic
- modified prostheses possess highly promising properties for antibacterial protection of perioperative implants

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Higher Education Polish Grant 2 PO5B 067 30

References

- [3] Hermanson G.T, Mallia A.K, Smith P.K. (1992), Immobilized affinity ligand techniques Academic Press, INC.
 [4] Wójtowska – Mach J., Różańska A., Bulanda M. i wsp., (2002), Nadzór epidemiologiczny nad zakażeniami miejsca operowanego. *Zakażenia*, 1 – 2: 72 – 75.