

# Stafylokokkien adheesio-interaktiot dynaamisissa olosuhteissa

*Jaakko Levon, Antti Soininen, Maria Katsikogianni, Katja Myllymaa, Reijo Lappalainen, Yrjö T. Konttinen, Teemu J. Kinnari, Veli-Matti Tiainen, Yannis Missirlis*

*Sisätaudit, Kliininen laitos, Helsingin yliopistollinen keskussairaala*

*Invalidisäätiön ortopedinen sairaala ORTON, Helsinki*

*Tekonivelsairaala COXA, Tampere*

*Fysiikan laitos, Kuopion yliopisto*

*Laboratory of Biomechanics and Biomedical Engineering, Department of Mechanical Engineering & Aeronautics, University of Patras, Greece*

Staphylococcus aureus S-15981 and S. epidermidis ATCC 35984 were used study diamond-like carbon polytetrafluoroethylene (DLC-PTFE-h) and DLC polydimethylsiloxane (DLC-PDMS-h) produced using filtered pulsed arc discharge method for their ability to resist bacterial adhesion under flow conditions. They were tested at 200 s<sup>-1</sup> shear rate, stained and subjected to confocal laser scanning. DLC-PTFE-h resisted S. aureus adherence like the conventional biomaterials, but DLC-PDMS-h bound  $1.06 \times 10^7$  bacteria (against only  $0.671 \times 10^7$  on DLC-PTFE-h, and  $0.751 \times 10^7$  on tantalum,  $p < 0.05$ ). Both DLC-hybrids bound S. epidermidis like the conventional biomaterials. The new DLC and Teflon® or Silicone® hybrids are comparable to conventional biomaterials in serum free tests. Implant-related infections are not a contraindication for the use of anti-soiling DLC-PTFE-h and DLC-PDMS-h coatings.

## Johdanto

Biolääketieteellisten sovellusten käytöstä johtuvilla infektioit ovat tärkeä ongelma, joka joudutaan yleensä hoitamaan implantin poistolla ja antibioottitukihoidolla. Implantin infektoituminen on monisäikeinen prosessi. Ensin yksittäisten bakteerien tai bakteeriryppästen on päästävä materiaalille, mikä voi tapahtua aktiivisenkin liikehdinnän ansiosta. Kemokiinit kiihdyttävät tätä liikettä ja kemotaktiset ärsykkeet ja pitkin solidia pintaa tapahtuva migraatio ohjaavat sitä. Fysikokemialliset voimat, kuten gravitaatio, kuljetus, Brownian liike, van der Waals sekä elektrostaattiset ja hydrofobiset voimat määräävät bakteerin vuorovaikutusta materiaalin kanssa(1). Ensivaiheen jälkeen seuraa voimakkaampi molekyylien välittämä kiinnittyminen, jota välittää kapseli, flagellat, fimbriat (pili) ja ekstrasellulaarisen polymeerimatriksin (bakteerilima).

Ne ovat vuorovaikutuksessa materiaalin pinnalla olevan proteiinikerroksen, bakteerikertymien ja biofilmin kanssa(2). Tästä kompleksisuudesta johtuen on mahdotonta etukäteen laskennallisesti selvittää bakteerien kiinnittymistä ja sen voimakkuutta eri pinnoille. Asian selvittämiseksi joudutaan tekemään tieteellisiä kokeita.

Virtausvoimat ja biomateriaalipinnan kyky vastustaa adheesiota ovat tärkeitä vastavoimia mikrobien kiinnittymisessä. Jos bakteerit pääsevät kiinnittymään kunnolla, ne pystyvät muodostamaan bakteerikertymiä ja biofilmiä. Kliiniseen käyttöön suunniteltu implantti tai pinnoitus altistuu useiden ruumiinesteiden veren, virtsan, ulosteen, likvorin, nivelnesteiden, kudosten) virtaukselle, minkä vuoksi mikrobien kiinnittymistä tulisi tutkia ennen kaikkea dynaamisissa olosuhteissa. Koska Staphylococcus epidermidis ja Sta-

*Staphylococcus aureus* ovat yleisimpiä implantaati-infektioiden aiheuttajia, tutkimme niiden kiinnittymistä.

Implantaati-infektioita voidaan estää käyttämällä mikrobien kiinnittymistä vastustavaa pinnoitusta, esim. timantinkaltaista hiiltä (DLC) ja sen johdannaisia (3-5). Pinnoitteen valmistetaan käyttämällä kaaripurkaustekniikkaa, jonka avulla timantinkal-tiaseen hiileen voidaan liittää Teflonia® tai Silikonია®. Oletimme, että nämä likaantumattomat ja tarttumattomat DLC hybridit olisivat parempia tai yhtä ainakin hyviä kuin DLC ja jotkin laajalti käytetyt biomateriaalit kyvyssään vastustaa bakteerien adheesiota dynaamisissa viljelyolosuhteissa.

### *Aineisto ja menetelmät*

#### Pinnoitusmenetelmät ja näytteiden valmistus

Tantaali-, titaani-, kromi-, DLC-, DLC-PDMS-h ja DLC-PTFE-h-pinnat valmistettiin 4" <100> piioksidikiekoille (Okmetic, Vantaa, Finland) käyttäen kahta fysikaalista kaasufaasipinnoitus menetelmää (6).

Metallipinnoitteiden valmistukseen käytettiin tasavirta-sputterointitekniikkaa. DLC:n ja sen hybridien tuottamiseksi käytettiin pulssitettua kaaripurkausmenetelmää. Näytepinnat puhdistettiin ensin tyhjiössä ionisuihkulla (SAM-7KV, Minsk, Belarus) käyttäen 5 kV:n jännitettä sekä 30 mA:n virtaa. Tasavirta-sputteroinnissa (Stiletto Serie ST20, AJA International Inc., North Scituate, MA, USA) käytettiin positiivisesti varautuneiden Ar (Goodfellow Cambridge Ltd, Huntingdon, England) ionien kiihdyttämiseen negatiivista 500 V kohdepotentiaalia. Ensiksi valmistetun 200 nm paksun adheesiokerroksen tekeminen kesti noin 5 minuuttia. Pulssitettua kaaripurkausmenetelmää (Filtered pulsed plasma arc discharge method) käytettiin joko grafiittikatodin tai grafiittipolymeerikatodin rakenteen kanssa DLC, DLC-PTFE-h tai DLC-PDMS-h pinnoitteiden tuottamiseen silikonikiekoille. Jokaisen näytteen kerrostuminen kesti noin 15 minuuttia. DLC, DLC-PDMS-h ja DLC-PTFE-h pinnoitteiden paksuus oli noin 150 nm ja pintakarheus (Ra) väliltä 2-5 nm.

Pinnoitetut piikiekot pilkottiin sopimaan virtauskammion dimensioihin (15 mm x 30 mm) käyttämällä timanttiterää.

Timantinkaltainen hiilipinnoite ei sisältänyt vetyä ja oli amorfinen(7-9), sekä tuotetuissa näytteissä sp<sup>3</sup>-timanttisidosten osuus oli 85%(10). DLC ja DLC-polymeerihybridit tuotettiin käyttäen pulssitettua

kaaripurkausmenetelmää (10-13). 1-7 Hz taajuinen plasmapulssi saatiin aikaan sytyttämällä kaaripurkaus grafiittikatodilla (>99.9%). Adheesiokerros tuotettiin korkeaenergisellä plasmalla käyttämällä 16.0 µF:n kondensaattoria sekä 5000 V:n jännitettä. Plasma ohjattiin kohteeseensa solenoidin (L=3.0 µH) tuottaman 90° kaartavan magneettikentän avulla, joka siivilöi neutraalit atomit ja grafiittipartikkelit plasmapilvestä. Plasmaa kiihdyttävä katodi-anodi pari koostuu sarjaan kytketystä solenoidista, vastuksesta (R=0.1 Ω) ja kondensaattorista. DLC-polymeerihybridipinnoitteet valmistettiin käyttäen yhdistettyä grafiittikatodia PDMS tai PTFE (Irpola Oy, Turku, Finland) komponentin kanssa.

#### Kontakti- ja liukukulmien mittaus

Kontaktikulma(θ<sub>m</sub>) mittaukset tehtiin käyttämällä staattista tippa (20 µl tislattua vettä) menetelmää, jota havainnointiin CCD videomikroskoopilla. Liukukulma taas on se kulma, jolla pisara alkaa liukua kaltevalta tasolla. Näiden mittausten tarkkuus on 1°. Näytepintojen topografia tutkittiin 2D stylus profiler-laitteella (Sloan Dektak IIA, Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, Kalifornia).

#### Bakteeriviljelmät

Käytimme limaa tuottavia *S. epidermidis* ATCC 35984 ja *S. aureus* S-15981 kantoja, joita säilytettiin -70 °C:ssa 70 % Tryptic Soy Broth elatusaineessa (TSB, Difco Laboratories, Detroit, USA), joka oli liuotettu 30 % glyseroli/vesi seokseen. 10 µl jäädytettyä bakteerisuspensiota siirrettiin veri-agarmaljoille kasvamaan yön yli 37 °C:ssa, jonka jälkeen maljat siirrettiin 4 °C:seen. Stationaarivaiheen soluja saatiin siirtämällä 2-3 bakteeripesäkettä verimaljoilta 5 ml:aan TSB-elatusainetta kasvamaan 18 tunnin ajaksi 37 °C:ssa ravistelijassa (120 r.p.m.). Mikro-organismit sentrifugoitiin (2683 x g, 4 °C, 10 min) ja pestiin kaksi kertaa keit- tosuolapuskurilla, pH 7.4. Pesujen jälkeen mikrobit laimennettiin samaan puskuriin 1.5×10<sup>8</sup> pesäkettä/ml vahvuuteen varmistaen tämä spektrofotometrisesti käyttäen 550 nm aallonpituutta (Techne, Cambridge, UK) McFarlandin standardin mukaan.

#### Dynaamiset adheesio kokeet

Bakteerien kiinnittymisen tutkimiseen virtausolosuhteissa käytettiin paralleelivirtauskammio (PPFC)(14)

laitteistoa. Kammiossa 30×15×1 mm kokoinen näyte sijoitetaan kahden pleksilasilevyn väliin niin että sen päälle muodostuu 30×15×0.35 mm kokoinen virtauskammio. Neljään rinnakkaiseen kammioon ruiskutetaan nestettä käyttäen ruiskuja ja ohjelmitavia pumppuja, joka liikuttaa mäntää edestakaisin kerran 60 sekunnissa aiheuttaen 3.7 ml/min nestevirtauksen 120 minuutin ajan 37 °C:ssa. Leikkuuvoima 200 s<sup>-1</sup>, mikä saatiin seuraavasta kaavasta:

$$\gamma = \frac{6Q}{Wh^2}$$

missä Q on virtausnopeus, W (kammion pituus) = 0.015 m ja h (kammion korkeus) = 0.35 x 10<sup>-3</sup> m. Kokeet tehtiin tripplikaatteina.

#### Fiksaatio ja värjäys

Kokeen jälkeen näyte huuhdeltiin 8 ml puskuria irrotakseen poistamiseksi, fiksoitiin puskuroidussa 3 % formaldehydissä 30 min 37 °C:ssä ja värjättiin 1 ml seosta, joka sisälsi 2 µl SYTO 9 (Molecular Probes, Europe BV) väriä/ml ionisuodatettua vettä, 30 min huoneenlämmössä ja pimeässä. Bakterien seinämän läpäisevä, DNA:han sitoutuva ja fluoresoiva SYTO9 värjää bakteerit. Näytteet huuhdeltiin kolmesti tislattulla vedellä ja pedattiin objektilasille vesipohjaisella Gel Mountilla (Sigma, Missouri).

#### Mikroskopia, valokuvaus ja kuva-analyysi

Näytteitä tarkasteltiin Nikon TE2000-U konfokaalilla laser scanning mikroskoopilla (Nikon, The Netherlands, Europe) käyttäen 488 nm eksitaatiota ja 500 nm emissiota. Optiset ohutleikkeet tallennettiin bitmap-muotoon kuviksi, 100 µm<sup>2</sup>/kuva ja kuusi 100 µm<sup>2</sup> kenttää valittiin satunnaisesti joka näytteestä otantavirheen minimoimiseksi.

Digitaalikuviin analysointi ja kiinnittyneiden bakteerien mittaaminen tehtiin käyttämällä Groningenin yliopiston lääketieteellisessä keskuksessa kehitettyä ohjelmaa (15).

#### Tilastollinen analyysi

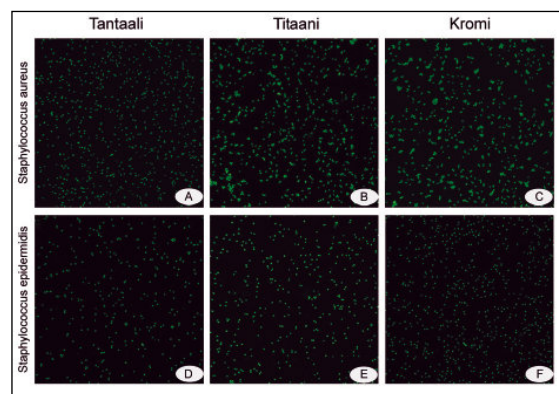
Materiaaliominaisuuksien vaikutus bakteerien kiinnittymiseen analysoitiin käyttäen SPSS ohjelmistoa (version 14.0, SPSS, Chicago, Illinois). Yksisuuntainen

variانسianalyysi ja eri yhdistelmien post-hoc vertailut tehtiin käyttäen Scheffén merkittävän eron testiä.

#### Tulokset

##### Metallien vertailu

Perinteisten implanttimetallien järjestys stafylokokkien kiinnittymistä parhaiten vastustavasta sen kiinnittymistä suosivaan suuntaan oli sama sekä *S. aureus* S-15981 että *S. epidermidis* ATCC 35984 kannoille: tantaali, titaani ja kromi (Kuvat 1-3).



Kuva 1. Värjättyjä *Staphylococcus aureus* S-15981 (ylempi rivi) ja *Staphylococcus epidermidis* 35984 (alempi rivi) bakteereja tantaali-, titaani- ja kromipinnoilla 120 minuutin dynaamisen adheesiokokeen jälkeen konfokaalimikroskopiassa. Perinteisten metallien vastustuskyky ranking oli molemmilla bakteereilla testattuna sama. Tantaali oli vastustuskykyisin ja sitä seurasi titaani ja sitten kromi.

##### Bakteerien paakkuuntuminen

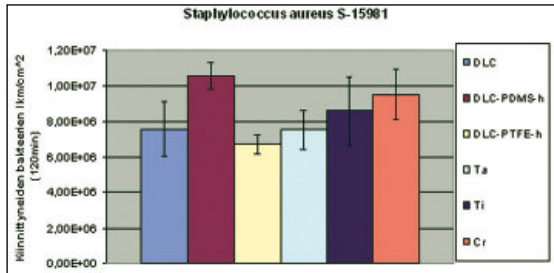
Suurimmalla osalla testatuista biomateriaaleista stafylokokit näyttivät olevan yksittäisinä mikrobeina (Kuva 4, paneeli A), mutta DLC-PDMS-h-pinnoitteella ja varsinkin DLC-PTFE-h-pinnoitteella (Kuva 4, paneeli B) ne muodostivat aggregaatteja.

##### Testattujen biomateriaalien järjestys

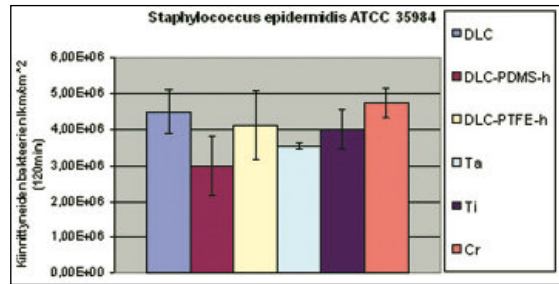
Testatut biomateriaalit olivat melko samankaltaisia (Kuvat 2 ja 3) paitsi että *S.aureus* sitoutui paremmin DLC-PDMS-h-pinnalle kuin DLC-PTFE-h- tai tantaalipinnoille ( $p < 0.05$ , Kuva 5).

##### Kontaktikulma, liukukulma ja pinnan karheus

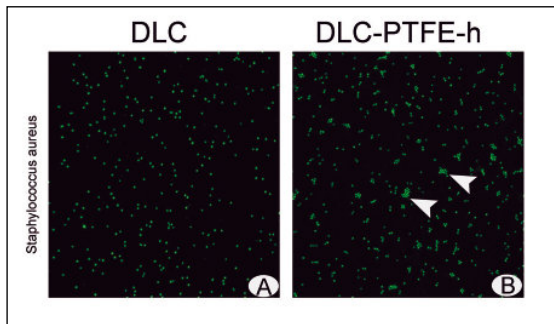
Bakteerien tarttumista on pyritty selvittämään myös pinnan hydrofobisten ominaisuuksien ja karheuden



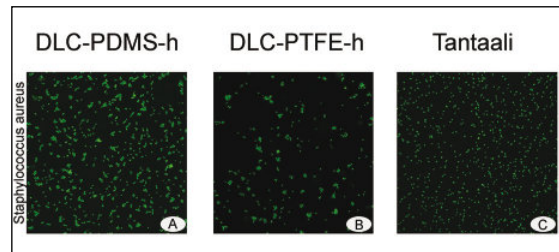
Kuva 2. *Staphylococcus aureus* S-15981 bakteerien (keskiarvo ja SEM) kiinnittyminen 120 minuutin dynaamisessa inkubaatiossa. Materiaalit vasemmalta oikealle ovat timantinkaltainen hiili (diamond-like carbon, DLC), DLC-polydimetyylisiloksaani-hybridi (DLC-PDMS-h), DLC-polytetrafluoroetyyleeni-hybridi (DLC-PTFE-h), tantaali, titaani ja kromi.



Kuva 3. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 bakteerien (keskiarvo ja SEM) kiinnittyminen 120 minuutin dynaamisessa inkubaatiossa, materiaalit vasemmalta oikealle ovat DLC, DLC-PDMS-h, DLC-PTFE-h, tantaali, titaani ja kromi.



Kuva 4. *Staphylococcus aureus* S-15981 bakteereja timantinkaltaisella hiilellä (DLC, paneeli A) ja sen tefloni hybridillä (DLC-PTFE-h, paneeli B) konfokaalimikroskopiassa. Yksittäisiä bakteereita näkyi DLC pinnalla (paneeli A), mutta DLC-tefloni hybridillä (paneeli B) ne muodostivat pieniä rykelmiä.



Kuva 5. *Staphylococcus aureus* S-15981 bakteereja konfokaalimikroskopiassa timantinkaltaisen hiilen silikoni ja tefloni hybrideillä ja tantaalilla. Bakteerit tarttuivat varsinkin DLC-silikoni hybridin pintaan verrattuna tantaaliin ( $p < 0.05$ ) ja DLC-tefloni hybridiin ( $p < 0.05$ ).

**Taulukko 1. Eri testimateriaalien kontaktikulma, liukukulma ja pinnan karheus (\* tarkoittaa sitä, että vesipisara ei liukunut edes  $>90^\circ$  pinnan kallistuksella).**

	Kontaktikulma	Liukukulma	Ra
Ti	53-56	*	19 nm
Ta	20-22	38	17 nm
Cr	70-74	*	25 nm
DLC	58	70	2-5 nm
DLC-PDMS-h	100-108	8-10	2-5 nm
DLC-PTFE-h	100-108	40	2-5 nm

avulla ja näitä kuvastavat kontaktikulma, liukukulma ja pinnan karheus mitattiin (Taulukko 1).

### Pohdinta

DLC on kulutus ja korrosio kestävä ja kudossyhteensopiva(3-6,16). Polymeereillä, kuten PTFE (Teflon®) ja PDMS (Silicon®) on myös potentiaalisesti hyödyllisiä ominaisuuksia kuten likaantumattomuus ja toisiinsa tarttumattomuus (17-19). Käyttämällä nykyaikaista kaaripurkaus-plasma kiihdytys (FPAD) menetelmää oli mahdollista yhdistää perinteisiä materiaaleja innovatiivisella tavalla (20). Menetelmää mahdollistaa hyvin kiinnittyvien ja paksujen hybridipinnoitteiden tuottamisen. Likaantumattomat ja toisiinsa tarttumattomat biomateriaalit voisivat soveltua stenteihin ja mekaanisiin sydänläppiin, joissa saattaa esiintyä

tromboembolisia komplikaatioita myös varfariinilla hoidetuilla potilailla. Nyt näitä uusia DLC-polymeeri-hybridimateriaaleja tutkittiin ensimmäien kerran bakteerikiinnittymiskokeissa. Tulosten mukaan DLC-PTFE-h ja DLC-PDMS-h ovat verrattavissa laajalti käytettyihin metallisiin biomateriaaleihin ja perinteiseen DLC-pinnoitukseen. Tosin DLC-PDMS-h sitoi enemmän *S.aureus* bakteereja kuin DLC-PTFE-h tai tantaali, jotka olivat seerumivapaassa asetelmassa tutkittuina resistentimpiä adheesiolle.

Hydrofobisilla vuorovaikutuksilla on pyritty selvittämään bakteerien kiinnittymistä biomateriaaleille. Hydrofiilisyyttä lisää vastustuskykyä ja hydrofobisuus vähentää sitä. Hydrofiilinen musiinipinnoitus lisäsi polymetyylimetakrylaatin, polystyreenin ja silikonin vastustuskykyä (21). Myös bakteerin vesikontaktikulmalla mitattu hydrofiilisyyttä vähensi adheesiota negatiivisesti varautuneilla hydrofobisilla sulfatoituilla polystyreenipinnoilla (22,23). Kokeissamme käytimme vesikontaktikulmaa ilmentämään testattujen materiaalien hydrofobisuutta. Perinteisten metallien joukossa tantaalilla oli alhaisin kontaktikulma eli se oli joukon hydrofiilisin, sitten seurasi titaani ja lopulta kromi, joka oli hydrofobisin testatuista materiaaleista (Taulukko 1). Tämä oli niiden keskenäinen järjestys stafylokokki kiinnittymiskokeissa tantaalin ollessa vastustuskykyisin. Nämä löydökset siis tukevat yllämainittua hydrofiilisyysoletusta. Kun myös DLC ja sen hybridit otetaan mukaan pohdintaan, ajatuskuvio särkyy. DLC-PTFE-h ja DLC-PDMS-h olivat materiaaleista hydrofobisimpia omaten yhtä suuren vesikontaktikulman, mutta DLC-PTFE-h-pinnoitus osoittautui kaikkein vastustuskykyisimmäksi. Koe osoittaa, että suoraa laskennallista yhteyttä ei voida osoittaa pinnan hydrofiilisyyden ja bakteeriadheesioinnin vastustuskyvyn välillä. Johtopäätökset ovat yhtäpitäviä äskettäin julkaistujen suomalaisten havaintojen kanssa (24). Mikrobian ja materiaalien vuorovaikutus on monimutkainen tapahtuma. Viime kädessä ainoastaan erilaisissa olosuhteissa tehdyt kokeet antavat luotettavaa tietoa.

Bakteerit elävät oikeastaan kahdessa eri olomuodossa, yksittäisinä eksponentiaalisesti kasvavina soluina liuosviljelmissä, jota käytetään testattaessa bakteerien herkkyyttä erilaisille antibiooteille, tai bakteeriyhteisöinä biofilmeissä. Biofilmeissä bakteerit käyttävät älykkäitä selvitysmiskeinoja ja kommunikoivat keskenään (quorum sensing, 25). Useimmat mikrobialiset *in vitro* adheesioinnit on tehty käytännöllisistä syistä staattisissa olosuhteissa, vaikka implantti-infektioissa kiinnittyneet bakteerit ja biofilmit altistuvat yleensä

ihmiskehon ruumiinnesteiden virtausvaikutukselle. Bakteerit elävät biofilmeissä vita minimaa, jolloin niiden käyttäytyminen muuttuu bakteerisolujen keskenäisten vuorovaikutusten, aggregoitumisen ja bakteerilimaan liimautumisen sekä ravinteiden, vitamiinien ja hapen saatavuuden seurauksena. Biofilmi estää antibioottien ja isäntäperäisten molekyylien diffuusiota kuten myös leukosyyttien migraatiota. Siksi implantti-infektioit ovat vaikeasti hoidettavissa ilman vierasesineen poistoa. Hyvä vaihtoehto olisi käyttää biomateriaaleja ja pinnoitteita jotka ovat vastustuskykyisiä bakteeriadheesiolle.

Limaa tuottavien *S. epidermidis* kantojen tarttuminen polyvinyylikloridille ja muille pinnoille virtausolosuhteissa osoitti, että korkeammat leikkuuvoimat yleensä irrottivat bakteereja pinnoilta (26). Virtausolosuhteet ja lisääntynyt leikkuuvoima vähensivät termodynaamisten mallien ennustettavuutta (27). Fysiologiset intravaskulaariset leikkuuvoimat vakaassa laminaarisessa virtauksessa vaihtelevat 2000 s<sup>-1</sup> ja 40 s<sup>-1</sup> välillä korkeimpien vallitessa suonien alkukohdissa ja haarautumisissa (28). Aikaisemmin ryhmämme on tehnyt adheesioinnit kokeita staattisissa olosuhteissa perinteisillä proteesimateriaaleilla ja DLC-pinnoitteella. Näissä kokeissa ja olosuhteissa adheesioindeksi osoitti seuraavan järjestyksen: titaani, tantaali, kromi ja DLC *vm.* ollessa selvästi vastustuskykyisin *S. aureus*lle (29). Staattisissa olosuhteissa uusi DLC-PTFE-h-pinnoitus vastusti kahden eri stafylokokkikannan kiinnittymistä paremmin kuin titaani tai piioksidit ( $p < 0.05$ ) (6). Nyt käytetyissä virtausolosuhteissa ei esiintynyt merkittäviä eroja DLC-pinnoitteen ja muiden testattujen materiaalien välillä. Voidaan päätellä että eri materiaalien vertailussa tarvitaan testausta myös dynaamisissa, *in vivo* olosuhteita jäljittelevissä olosuhteissa.

#### Kiitososa

*Kiitämme EU COST 537 "Core laboratories for the improvement of Medical Devices in Clinical Practice from the Failure of the Explanted Prostheses Analyses FEPA" ohjelmaa, joka mahdollisti LK Jaakko Levónin työskentelyn Patraksessä Kreikassa.*

#### Kirjallisuus:

1. Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Nieuwenhuis P: Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mat Sci Mat In Med* 2002;13:717-722.
2. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Physico-chemistry of initial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 1999;23:179-230.

3. Anttila A, Lappalainen R, Heinonen H, Santavirta S, Konttinen YT: New Diamond Front Carbon Technol 1999;9:283-288.
4. Lappalainen R, Anttila A, Heinonen H: Diamond coated total hip replacements. Clin Orthop Relat Res 1998;352:118-127.
5. Lappalainen R, Selenius M, Anttila A, Konttinen YT, Santavirta S: Reduction of wear in total hip replacement prostheses by amorphous diamond coatings. J Biomed Mater Res Appl Biom 2003;66B:410-413.
6. Kinnari TJ, Soininen A, Esteban J, Zamora N, Alakoski E, Kouri V-P, Lappalainen R, Gomez-Barrena E, Tiainen V-M: Adhesion of staphylococcal and CACO-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating, J Biomed Mater Res A 2008;86:760-768.
7. Anttila A. Ion induced diamond-like carbon coatings. NATO ASI Ser, Ser E: Appl Sci 1989;170:455-475.
8. Lifshitz Y. Diamond-like carbon - present status. Diamond Relat Mater 1999;8:1659-1676.
9. Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. Mater Sci Eng: R-Rep 2002;37:129-281.
10. Anttila A, Lappalainen R, Tiainen VM, Hakovirta M: Superior attachment of high-quality hydrogen-free amorphous diamond films to solid materials. Adv Mater 1997;9:1161-1164.
11. Anttila A., Hirvonen J-P, Koskinen J: Procedure and apparatus for the coating of materials by means of a pulsating plasma beam. United States patent US 5078848, 1992.
12. Anttila A, Salo J, Lappalainen R: High adhesion of diamond-like films achieved by the pulsed arc-discharge method. Mater Lett 1995;24:153-156.
13. Alakoski E, Kiuru M, Tiainen VM, Anttila A: Adhesion and quality test for tetrahedral amorphous carbon coating process. Diamond Relat Mater 2003;12:2115-118.
14. Stavridi M, Katsikogianni M, Missirlis YF: The influence of surface patterning and/or sterilization on the heamocompatibility of polycaprolactones. Mater Sci Eng C 2003;23:359-365.
15. Meinders JM, van der Mei HC, Busscher HJ: In situ enumeration of bacterial adhesion in a parallel plate flow chamber - elimination of in focus flowing bacteria from the analysis. J Microbiol Methods 1992;16:119-124.
16. Thomson L, Law F, Ruchton N, Franks L: Biocompatibility of diamond-like carbon coating. Biomaterials 1991;12:37-40.
17. Colas A, Curtis J. Silicone biomaterials: History and chemistry. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. 2nd ed. Elsevier Academic Press; 2004. p 80-86.
18. McDonald JC, Whitesides GM: Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. Acc Chem Res 2002;35:491-499.
19. Teoh SH, Tang ZG, Hastings GW: Thermoplastic polymers in biomedical applications: structures, properties and processing applications. In: Black J, Hastings G, editors. Handbook of Biomaterial properties. 1st ed. London: Chapman&Hall; 1998. p 275-276.
20. Anttila A, Tiainen V-M, Kiuru M, Alakoski E, Arstila K: Preparation of diamond-like carbon - polymer -hybrid films with filtered pulsed arc discharge method. Surface Engineering 2003;19:425-428.
21. Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P: Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. Col Surf B: Biointerf 2000;17:229-239.
22. Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ: The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol 1987;53:1893-1897.
23. Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J: Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Res Microbiol 2005;156:506-514.
24. Raulio M, Järn M, Ahola J, Peltonen J, Rosenholm JB, Tervakangas S, Kolehmainen J, Ruokolainen T, Narko P, Salkinoja-Salonen M: Microbe repelling coated stainless steel analysed by field emission scanning electron microscopy and physicochemical methods. J Ind Microbiol Biotechnol. 2008;35:751-760.
25. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M: Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis 2003;188:706-718.
26. Katsikogianni M, Spiliopoulou I, Dowling DP, Missirlis YF: Adhesion of slime producing Staphylococcus epidermidis strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. J Mater Sci Mater Med. 2006;17:679-689.
27. Katsikogianni M, Amanatides E, Mataras D, Missirlis YF: Staphylococcus epidermidis adhesion to HE, HE/O2 plasma treated PET films and aged materials: Contributions of surface free energy and shear rate. Colloids Surf B Biointerfaces 2008;65:257-268.
28. Goldsmith HL, Turitto VT: Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost 1986;55:415-435.
29. Levon J, Myllymaa K, Kouri V-P, Rautemaa R, Kinnari TJ, Myllymaa S, Konttinen YT, Lappalainen R: Patterned macro-array plates in comparison of bacterial adhesion resistance of tantalum, titanium and chromium compared to diamond-like carbon, submitted for publication.