

Stafylokokkien ja caco-2 solujen kiinnittyminen timantti-polytetrafluoroeteeni -hybridipinnoitteeseen

Teemu Kinnari^{1,6}, Antti Soininen², Veli-Matti Tiainen², Esa Alakoski², Yrjö T. Konttinen^{3,4,5}

1 Mikrobiologian osasto, Fundacion Jimenez Diaz, Madridin Yliopisto, Espanja

2 Tieteellinen Tutkimus ORTON

3 Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY

4 Sairaala ORTON

5 Pirkanmaan sairaanhoitopiiri, Tampere

6 Korva-, nenä- ja kurkkutautien klinikka, HUS

Background: Bacterial adhesion, colonization and subsequent formation of resistant biofilms on an implant surface are the major reasons for implant-related infections and loosening of orthopedic joint implants. It would be desirable to be able to develop implant coatings, which are repellent to bacteria in order to minimize the colonization of the implant surface with circulating planktonic bacteria.

Methods

The modified filtered pulsed arc discharge method was used to deposit novel hard and anti-soiling DLC-PTFE-h coatings. The anti-soiling properties of the coatings were studied using standard back peel test and by contact and sliding angle measurements. Bacterial adhesion tests were done with *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Cell adhesion and viability studies were performed using human intestinal adenocarcinoma cell line Caco-2. The tested materials were DLC, DLC-PTFE-h, titanium and silicon

Results

Contact and sliding angle measurements indicate that DLC-PTFE-h has properties of both of its parent materials. The back peeling force of a 5 cm wide parcel tape for silicon, titanium, DLC, DLC-PTFE-h and bulk PTFE was 5 N, 6 N, 6 N, 5 N and 2 N, respectively. *S. aureus* adhesion was lowest on DLC-PTFE-h. The mean surface areas covered with adherent *S. aureus* were 2.32 % (SEM = 0.07), 1.93 % (SEM = 0.10), 2.35 % (SEM = 0.08) and 2.57 % (SEM = 0.09) for DLC, DLC-PTFE-h, titanium and silicon, respectively. The adhesion of *S. epidermidis* was lowest on DLC-PTFE-h as well. The mean surface areas covered with adherent *S. epidermidis* were 3.90 % (SEM = 0.08), 2.57 % (SEM = 0.08), 3.32 % (SEM = 0.09) and 3.47 % (SEM = 0.10) for DLC, DLC-PTFE-h, titanium and silicon, respectively. No statistical differences in the attachment of the caco-2 cells between DLC, DLC-PTFE-h, titanium and silicon was observed.

Conclusions

DLC-PTFE-h could be used to fight implant-related infections as it diminishes bacterial adhesion without affecting the capability of the surface to bind host cells. Such primary prophylaxis seems particularly relevant as bacteria have shown a tendency to develop an increasing antibiotic resistance.

Ortopedisten tekonivelleikkausten ongelmana ovat infektiot. Tekolonkka- ja polvinivelissä infektiota esiintyy 1–2 %:ssa tapauksista, mutta esimerkiksi kyynärpään tekonivelleikkauksessa noin joka 11. (9 %) potilas saa infektion (1–3). Implantin infektoituminen aiheutuu pääasiassa bakteerien kiinnittymisestä, kolonisoitumisesta ja tiukasti kiinnittyvän biofilmin muodostumisesta sen pinnalle (1–5). Infektorisikin pienentämiseksi olisikin erittäin toivottavaa, jos implantille pystyttäisiin kehittämään pinta, joka hylkii bakteereja ja minimoi pintaan kiinnittyvien bakteerien määrän.

Käyttämällä hyväksi aineen 4. olomuotoa, plasmaa, voidaan valmistaa uusia pinnoitteita, joissa yhdistyvät erilaisten biomateriaalien hyvät ominaisuudet. Erityisesti pystytään valmistamaan timantti-PTFE-hybridi (DLC-p-h) pinnoitteita, joissa yhdistyvät polytetrafluoroeteenin (PTFE, Teflon) kyky hylkiä likaa ja bakteereja, sekä tunnetuista materiaaleista kovimman, timantin, mekaaniset ominaisuudet. Pinnoitteet valmistetaan laboratoriossamme kehitetyllä plasmakiihdytymenettelmällä. Tässä tutkimuksessa esitetään DLC-PTFE-h pinnoitteiden valmistuksessa käytetty menetelmä ja pinnoitteille tehdyt bakteerien ja solujen kiinnittymiskokeet. Kliinisesti pahimpana infektioiden aiheuttajana toimivat stafylokokkibakteerit (6). Bakteerien kiinnittymistä pinnoitteeseen testattiin *Staphylococcus aureus* ja *Staphylococcus epidermidis* avulla. Toinen merkittävä tekijä implanttien infektoitumisen kannalta on ihmisen omien infektiolta suojaavien solujen kiinnittyminen pintaan. Niin sanotun kilpajuoksu pinnalle (race for the surface) hypoteesin mukaan ihmisen omien solujen kiinnittyminen pintaan pienentää bakteerin tarttumiselle vapaana olevaa pinta-alaa. Ideaalitapauksessa siis pinnoite hylkii bakteereja ja sallii ”suojaajasolujen” kiinnittymisen siihen. Solujen kiinnittymistä pinnalla testattiin käyttäen hyväksi ihmisen suolistosta peräisin olevia adenokarsinoma Caco-2 soluja. Näiden solujen ominaisuudet ovat hyvin lähellä ihmisen suoliston epiteelin solujen ominaisuuksia, ja niitä käytetään yleisesti uusien biomateriaalien sytotoksisuuden ja bioyhteensopivuuden testauksessa (8,9,10).

Aineisto ja menetelmät

Pinnoituksessa taustamateriaalina käytettiin puolijohdekomponenttien valmistuksessa käytettäviä yksikiteisiä piilevyjä (Okmetik Oyj, Vantaa, Suomi). Valmistettujen pinnoitteiden paksuudet vaihtelivat

välillä 200–500 nm. Paksuusvaihtelu ei kuitenkaan vaikuta pinnankarkeuteen. Kaikkien valmiiden näytteiden pinnankarkeusarvo RA oli 4–5 nm. Pinnoitteiden paksuudet ja karkeusarvot mitattiin Sloan Dektak IIa profilometrillä (Veeco Instruments Inc. California, Santa Barbara, USA). Pinnoitteiden kyky hylkiä likaa arvioitiin ns. teippitestillä (ASTM D3330 back peel test, 5 cm, paineherkkä 3M Scotch teippi, 3M, Minnesota, St. Paul, USA) sekä kontakti- ja liukukulmamittauksilla. Verrokkimateriaaleina tutkimuksessa käytettiin termisesti oksidoitua piitä, titaania ja timanttipinnoitetta (DLC).

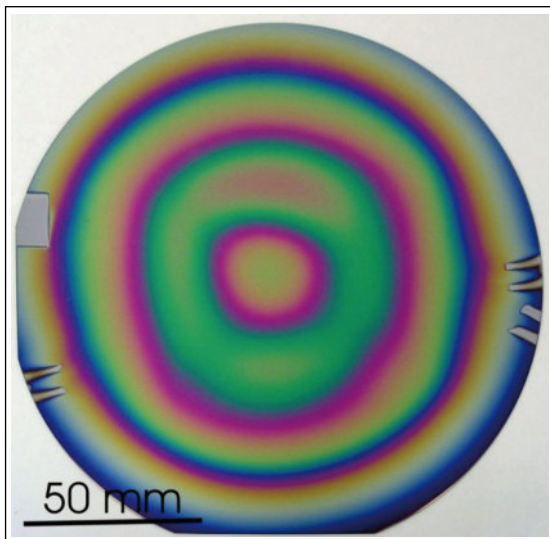
Pinnoitusmenetelmät

Ennen varsinaista pinnoitusta kaikki työssä käytetyt näytteet puhdistettiin tyhjiössä erillisellä sputterointipuhdistusyksiköllä (SAM-7kV, Minsk, Valkovenäjä). Sputteroinnissa käytetyt parametrit olivat: aika = 12 min, kiihdytysjännite = 5kV ja ionivirta = 25 mA. Kaikki pinnoitusprosessit aloitettiin välittömästi sputterointipuhdistuksen jälkeen rikkomatta tyhjiötä.

DLC-PTFE-h näytteiden valmistukseen käytettiin tutkimusryhmämme kehittämää plasmakiihdytymenettelmää (11,12). Kaikki pinnoituksessa käytetyt laitteet ovat ORTONin Timanttiryhmän kehittämää ja rakentamia. Kuten olemme aiemmin osoittaneet, plasmamenettelmällä pystytään valmistamaan korkealaatuisia ja (jopa satoja mikrometrejä) paksuja timanttipinnoitteita (13–16). DLC-PTFE-h pinnoitteiden valmistusta varten menetelmää täytyy hieman muuntaa ja ottaa käyttöön erikoisrakenteinen grafiitti-polymeerikatodi. Katodi on konstruoitu siten, että grafiitin höyrystämiseen käytetty plasmakaaripurkaus samalla höyrystää ja sputteroi polymeeriä hiiliplasman sekaan. Katodi on valmistettu puhtaasta grafiittisesta hiilestä (puhtaus >99,9 %, Carbone Lorraine, Pariisi, Ranska) ja teollisuuslaadun PTFE:stä (Irpola Oy, Turku, Suomi). Plasmakiihdytymenettelmässä (17) plasmapulssi saadaan aikaiseksi sytyttämällä grafiittikatodin ja rengasmaisen anodin välille plasmakaaripurkaus, jolloin laitteiston pääkondensaattorit ($C=29.4 \mu F$) purkautuvat. Systemin pulssitaajuus vaihteli prosessin eri vaiheissa välillä 1–7 Hz. Plasman kiihdyttämiseen käytettiin 500–6000 V jännitettä, ja plasma ohjattiin näytteelle purkausvirran solenoidissa ($L= 3.0-10 \mu H$) aikaansaaman magneettikentän avulla. Plasman ohjaamisen käytetty solenoidi poikkeuttaa plasman 90° lähtösuunnastaan ja suodattaa plasmasta kaaripurkauksessa grafiittikatodilla syntyvät neutraalit

atomit ja grafiittipartikkelit. Katodi-anodi pari, sole-noidi ja säätövastus ($R=0.1 \Omega$) ja pääkondensaatto-rit on kytketty sarjaan. Piilevylle syntyvässä DLC-p-h pinnoitteessa näkyvät ns. Newtonin renkaat (kuva 1) tulevat näkyviin koska pinnoite on hieman paksumpi näytteen keskeltä kuin reunoilta. Näytteen reunalla näkyvistä puristimen jäljistä mitattiin profiometrillä pinnoitteen paksuus.

Verrokkimateriaalina käytetyt titaanikalvot valmistettiin kaupallisella magnetronsputterointi yksiköllä (AJA International A320, Massachusetts, North Scituate, USA). Valmistuksessa käytetty titaanin puhtaus oli 99.7 %. Yksikössä käytetty kiihdytysjännite oli 430 V, ionivirta oli 1.5 A ja pinnoitusaika oli 2+2 minuuttia. Työstökaasuna käytettiin korkean puhtausluokan argonia.



Kuva 1. Piilevylle syntyvässä DLC-PTFE-h pinnoitteessa näkyvät ns. Newtonin renkaat tulevat näkyviin koska pinnoite on hieman paksumpi näytteen keskeltä kuin reunoilta. Näytteen reunalla näkyvistä puristimen jäljistä mitattiin profiometrillä pinnoitteen paksuus.

Stafylokokkien adheesiokokeet

S. aureus ATCC 25923 ja *S. epidermidis* ATCC 25923 bakteereja viljeltiin yön yli tryptikaasi soijaliemessä lämpötilassa 37°C. Viljelyn jälkeen bakteerit korjattiin 10 minuutin sentrifugoinnilla (4500xG, 22°C). Pelletti pestiin kolmesti steriilissä fosfaatti puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS). Bakteerit asetettiin PBS liuokseen ja liuos laimennettiin haluttuun pitoisuuteen (10^8 CFU/ml). PBS liuosta käytettiin koska se ei

sisällä ravintoaineita ja näin stafylokokkien lukumäärä säilyy vakiona adheesiokokeiden ajan. Biomateriaalinäytteet (3 kpl/materiaali) asetettiin bakteeriliuokseen ja bakteereja viljeltiin 90 min ajan lämpötilassa 37°C. Viljelyn jälkeen pinnassa olleet tarttumattomat bakteerit poistettiin huuhtelemalla steriilissä PBS liuoksessa ja näytteet kuivatettiin. Kuivatut näytteet värjättiin akridiinioranssilla ja huuhdeltiin vedessä. Jokaisesta näytteestä valokuvattiin fluoresenssimikroskoopissa (suurennus 100x) kymmenen kohtaa ennalta määrätyn suunnitelman mukaisesti. Mikroskooppikuvista mitattiin bakterien kolonisoima pinta-ala käyttäen ImageJ ohjelmistoa (National Institute of Health, Bethesda MD, USA).

Soluviljelykokeet

Ihmissen paksunsuolen adenokarsinooma Caco-2 (ATCC HTB37) solujen kiinnitysmiskokeet tehtiin RPMI-1640 soluviljelyaineessa (Rosewell Park Memorial Institute, Cambrex Bioscience), joka sisälsi 2.2 mM L-glutamiinia, 10 % vasikan sikiö seerumia (FCS), 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Soluja haudottiin 48 tuntia 5 % hiilidioksidia sisältäneessä kosteutetussa ilmassa. Jokaiselle biomateriaalille tehtiin kolme soluviljelykoetta 24-osastoisella Falcon soluviljelyalustalla (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Viljelyn jälkeen soluviljelyaine poistettiin ja soluja värjättiin 30 minuuttia, seerumivapaassa RPMI-1640 liuoksessa, joka sisälsi 10 µM vihreää solunvärjäysainetta (CellTracker Green, 5-klorometyylifluoreseeni asetaatti, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Värjäysainetta sisältänyt liuos korvattiin tuoreella RPMI-1640 soluviljelyaineella ja soluja haudottiin vielä 30 minuuttia. Lopuksi näytteet huuhdeltiin PBS liuoksessa. Kaikki viljelyn vaiheet tehtiin lämpötilassa 37°C. Solut kiinnitettiin 4 % paraformaldehydi PBS liuoksessa. Solujen tumat värjättiin DAPI -värjäysaineella (4',6 diamidino-2-phenylidole, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Näytteet pestiin kaksi kertaa PBS liuoksessa ja kerran vedessä ja kiinnitettiin mikroskooppilasilevyihin. Jokaisesta näytteestä otettiin fluoresenssimikroskoopilla (suurennus 10x) 4 kuvaa toisistaan riippumattomista kohdista. Pintaan kiinnittyneet solut laskettiin ImageJ -ohjelmiston avulla.

Tulosten tilastitiikan arvioinnissa käytettiin hyväksii varianssianalyysiä (ANOVA). Jakautuman normaalius arvioitiin Levenen testin avulla. Bakteerien kiinnitysmiskokeissa käytettiin hyväksi Tukeyn testiä.

Tulokset

Pinnoitteiden kyky hylkiä likaa

Teippitestin ja pinnoitteiden kontakti- ja liukukulmamittausten (7 kpl/materiaali) perusteella DLC-PTFE-h pinnoitteessa yhtyvät molempien lähtöaineiden ominaisuudet. Takaisinvetoteippikokeessa 5 cm leveän teipin irrottamiseen tarvittavaksi voimaksi saatiin eri biomateriaaleille: pii, titaani, DLC, DLC-PTFE-h ja bulkki PTFE, 5N, 6N, 6N, 5N ja 2N vastaavasti. Pinnoitteiden kiinnipysyvyys taustamateriaaliinsa oli erinomainen.

Kemiallisille sidoksille herkkien röntgen fotoelektronispektroskopia mittausten perusteella DLC-PTFE -pinnoite sisälsi sekä sp^3 -timantti, että sp^2 -grafittisidoksia, joita havaitaan myös tavanomaisessa timanttipinnoitteessa (DLC). Myös lähtöpolymeerin kemialliset sidokset havaittiin. Pinnoitteen alkuainekoostumuksen selvittämiseen käytetyllä elastisella takaisirontaspektroskopialla havaittiin pinnoitteen sisältävän merkittävästi enemmän hiiltä kuin äitipolymeeri. Hiilen määrä vastaa hyvin pinnoitteen timanttikomponenttia. Pinnoitteen koostumusta voidaan säädellä muuntelemalla pinnoitusparametreja, mutta korkealaatuisessa DLC-PTFE-h pinnoitteessa on noin 50 % enemmän hiiltä kuin äitipolymeerissä ja jopa 70 % prosenttia hiilestä on sitoutunut sp^3 -timanttisidoksilla.

Stafylokokkien adheesio

Stafylokokkien adheesio DLC ja DLC-p-h pinnoitteilla (kuva 2, ruudut A ja B) arvioitiin morfometrisesti (kuva 2, ruutu C) akridiinioranssilla värjäytystä näytteistä. *S. aureuksen* kiinnittyminen oli vähäisintä DLC-p-h pinnoitteella. 30 toistomittauksen keskiarvona saatiin pintaan kiinnittyneiden bakteerien peittämäksi osuudeksi näytteen pinta-alasta 2,32 % (SEM=0,07), 1,93 % (SEM = 0,10), 2,35 % (SEM = 0,08) and 2,57 % (SEM = 0,09) DLC:lle, DLC-PTFE-h:lle, titaanille ja piille, vastaavasti (kuva 2, ruutu C). Myös *S. epidermidiksen* kiinnittyminen oli vähäisintä DLC-PTFE-h näytteessä. Bakteerien peittämäksi osuudeksi näytteen pinta-alasta saatiin, 3,90 % (SEM = 0,08), 2,57 % (SEM = 0,08), 3,32 % (SEM = 0,09) and 3,47 % (SEM = 0,10) DLC:lle, DLC-PTFE-h:lle, titaanille ja piille, vastaavasti (kuva 2, ruutu D). Ero DLC-PTFE-h:n ja muiden materiaalien välillä oli molemmilla bakteereilla tilastollisesti merkittävä ($P < 0.05$).

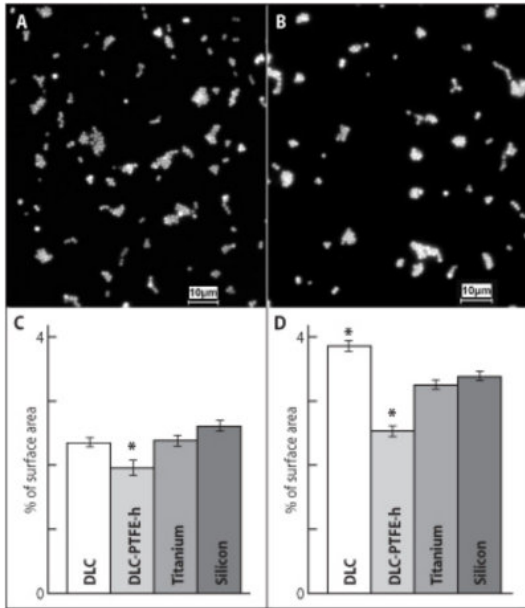
Solujen kiinnittyminen ja leviäminen

Solu- ja tumavärjäyskuviissa sekä pyyhkäiselektronimikroskooppikuviissa (kuva 3, ruudut A, B ja C) havaittiin suurimman osan CACO-2 soluista kiinnittyneen biomateriaalitaustojen pintaan hyvin ja leviävän 4 tunnin kuluttua kokeen alkamisesta. Solut näkyivät pääosittain yksittäisinä, eivätkä olleet vielä ehtineet muodostaa soluryppäitä. 48 tunnin kuluttua CACO-2 solut olivat jo muodostaneet pintaan yksittäisiä solukerroksia, jotka voitiin erottaa selvästi sekä molemmissa fluoresenssivärjäyksissä (kuva 3, ruudut D ja E), että pyyhkäiselektronimikroskoopilla (kuva 3, ruutu F). Vertailumittauksissa ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa solujen kiinnittymisessä eri biomateriaalien pintaan (kuva 4). Solut kiinnittyivät siis ainakin yhtä hyvin DLC-PTFE-h pinnoitteeseen kuin muihin verrokkimateriaaleihin.

Pohdinta

Koska implantit vuorovaikuttavat ympäristönsä kansa pintansa kautta, on modulaaristen implanttien pinnoille pyritty kehittämään erilaisiin toiminnallisiin tarkoituksiin soveltuvia pinnoitteita. Olemme aiemmin osoittaneet, että plasmamenetelmällä pystytään laboratoriossamme valmistamaan paksuja, korkealaatuisia timanttipinnoitteita, jotka pysyvät erinomaisesti kiinni taustamateriaalissa. Timanttipinnoitteen potentiaali biomateriaalina on valtava, koska sillä on erinomainen bioyhteensopivuus ja ylivoimainen kulutus- ja korrosionkestävyys. Naudan seerumissa kaupallisella tekonlonkkasimulaattorilla tehdyissä kokeissa on havaittu timanttipinnoitteen pienentävän implantin kulumista noin tekijällä miljoona verrattuna nykyään käytössä oleviin kaupallisiin materiaaleihin (18,19).

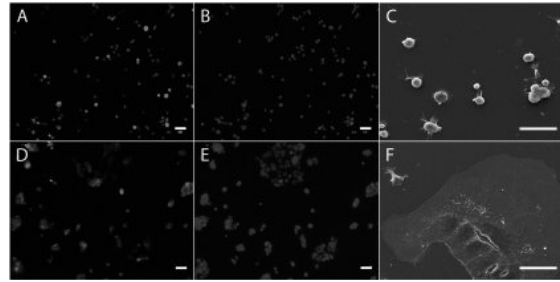
Tavanomaisten implanttimateriaalien ongelmana ovat infektiot. Bakteerien tarttumista ja kolonisoitumista implantin pintaan seuraa isännän puolustusmekanismeja (leukosyytit, immunoglobuliinit jne.) vastustavan biofilmin muodostuminen. Usein yksi- tai kaksivaiheinen implantin vaihto on ainoa tapa taistella infektiota vastaan. Implanttipinnoite, joka hylkii bakteereja, on erittäin tarpeellinen, jos halutaan vähentää implanteista aiheutuvia infektiota, antibioottien käyttöä ja uusintaleikkausten määrää. DLC-PTFE-h on lupaava pinnoite tähän tarkoitukseen. Pinnoitteessa yhdistyvät timantin poikkeukselliset mekaaniset ominaisuudet ja PTFE:n kyky hylkiä likaa ja bakteereja. Tutkimusryhmämme kehittämä plasmamenetelmä



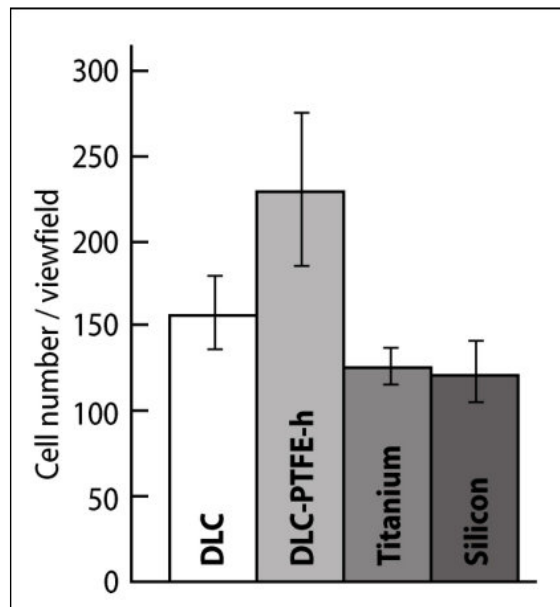
Kuva 2. Ruutu A: *Staphylococcus aureus* kiinnittyminen timanttipinnoitteeseen (DLC) (akridiinioranssivärjäys). Ruutu B: *Staphylococcus aureus* kiinnittyminen timantti-polytetrafluoroeteeni pinnoitteeseen (DLC-PTFE-h) (akridiinioranssivärjäys), mittakaava = 10 µm. Ruutu C: *S. aureus* peittävä prosenttiosuus pinta-alasta (keskiarvo). Ruutu D *S. epidermidis* peittävä prosenttiosuus pinta-alasta (keskiarvo). Tilastollisesti merkittävä ero piikontrollinäytteeseen on merkitty tähdellä.

on ainoa maailmassa, jolla kyseisenlaisia pinnoitteita pystytään valmistamaan.

PTFE:n kyky hylkiä likaa käytetään laajalti hyödyksi teollisuudessa ja kotitalouksissa. Tässä tutkimuksessa verrattiin kahden erilaisen stafylokokkibakteerin tarttumista DLC-PTFE-h pinnoitteeseen, tavanomaiseen timanttipinnoitteeseen ja biomateriaalina yleisesti käytettyyn titaaniin. Referenssimateriaalina käytettiin piiä, joka toimii myös pinnoitteiden taustamateriaalina. Stafylokokit valittiin käytettäväksi bakteerikannaksi, koska ne ovat yleisimpiä implantti-infektioiden aiheuttajia (6). Oletuksena oli, että DLC-PTFE-h pinnoite, jossa yhdistyvät timantin ja PTFE:n hyvät ominaisuudet, hylkisi bakteereja paremmin kuin tavanomainen timanttipinnoite. Bakteerien kiinnittymiskokeiden tulokset vahvistivat tämän työhypoteesin paikkansapitävyyden. Sekä *S. aureus*kin, että *S. epidermidis*in tarttuminen DLC-p-h pinnoitteeseen oli tilastollisesti merkitsevästi pienempää ($p < 0.05$) kuin tavanomaiseen timanttipinnoitteeseen. Sama tulos saatiin myös muille verrokkimateriaaleille. Verrattais-



Kuva 3. Caco-2 solut eri biomateriaalien pinnalla 4 tunnin jälkeen ja 48 tunnin jälkeen soluvärjäyskoe (ruudut A ja D, mittakaava = 50 µm) and ydinvärjäyskoe (ruudut B ja E, mittakaava = 50 µm). Pyyhkäisyelektronimikroskooppikuvassa voidaan nähdä vastaava käyttäytyminen (ruudut C ja F, mittakaava = 50 µm).



Kuva 4. Caco-2 solujen kiinnittyminen timanttipinnoitteeseen (DLC), timantti-polytetrafluoroeteeni-hybridipinnoitteeseen (DLC-PTFE-h), titaaniin ja piihin (kappaletta/mikroskooppikenttä, keskiarvo).

ta materiaaleista bakteerien tarttuminen oli vähäisintä DLC-p-h pinnoitteeseen. Vaikka erot eri materiaalien välillä, eivät olleet numeerisesti järin suuret, pienikin vähennys implantti-infektion määrässä on erittäin merkittävä yksittäisille potilaille ja koko terveydenhuoltojärjestelmälle. Stafylokokkien kiinnittymiskokeilla voidaan kohtuullisen hyvin ennakoida planktonisen bakteerikannan kykyä kolonisoida kehoon asetettavien implanttien pintoja. Kokeet soveltuvat siis hyvin uusien implanttimateriaalien testaukseen.

Uusien materiaalien todellinen kliininen arvo voidaan kuitenkin testata vasta kontrolloiduissa kliinisissä satunnaiskokeissa.

Joutuessaan kosketuksiin kehon kanssa implantin pinta tulee ainakin osittain kosketuksiin isännän solujen kanssa ja niiden peittämäksi. Pinnat joilla tällainen solupeitto on, pystyvät paljaita pintoja huomattavasti paremmin vastustamaan bakteerien tarttumista ja kolonisoitumista. Ns. ”kilpajuoksu pinnalle” hypoteesin (7) mukaan pintojen infektoituminen muualta tulevilla bakteerikannoilla, vähenee merkittävästi, mikäli pinta sallii tai jopa suosii isännän solujen kiinnittymistä. Caco-2 soluja käytetään yleisesti solujen bioyhteensopivuus- ja sytocompatibiliteetti tutkimuksissa, koska se on hyvin pintoihin tarttuva epiteelin solukanta ja herkkä myös sytotoksisille vaikutuksille. Caco-2 solujen kiinnittymiskokeissa havaittiin DLC-PTFE-h pinnoitteen olevan bioyhteensopiva. Pinnoitteella ei myöskään ollut sytotoksisia vaikutuksia. Lyhytaikaisissa 12 tunnin kokeissa Caco-2 solut tarttuivat DLC-PTFE-h pinnoitteeseen ja 72 tunnin kokeissa solut olivat levittyneet elinkykyisiksi yksittäiskerroksiksi pinnalle. DLC-PTFE-h pinnoitteiden ja verokkimateriaalien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa solujen kiinnittymisessä. Tämä on merkittävä tulos sillä PTFE pinnan liukkaudesta johtuen oli mahdollista, että Caco-2 solut tarttuisivat huonosti DLC-PTFE-h pinnoitteeseen. Solujen kiinnittymiskokeissa havaittiin, että timanttipinnoitteen muokkaaminen PTFE:llä vähentää selektiivisesti stafylokokkien tarttumista pinnoitteeseen, eikä vaikuta pinnoitteen kykyyn sitoa itseensä isännän soluja.

Vaikka edellä on puhuttu ”kilpajuoksusta pinnalle” on mainittava, että tässä esitettyjen tulosten perusteella ei voida tehdä suoria vertailuja bakteerien ja isännän solujen kiinnittymisen välillä, koska bakteerien ja solujen kiinnittymistä testattiin aina erillisissä koejärjestelyissä

ORTONin timanttiryhmän kehittämällä plasma-pinnoitusmenetelmällä voidaan valmistaa uusia DLC-PTFE-h pinnoitteita, joissa yhdistyvät tavanomaisen timanttipinnoitteen ja PTFE:n suotuisat ominaisuudet. Tutkimuksessa pyrittiin kehittämään pinnoite, joka suosisi isännän solujen ja vähentäisi pahimpien implantti-infektioiden aiheuttajien *S. aureuksen* ja *S. epidermidiksen* kiinnittymistä implantin pintaan. Bakteerien ja nisäkkään solujen kiinnittymiskokeissa havaittiin isännän solujen kiinnittyvän yhtä hyvin DLC-PTFE-h pinnoitteeseen kuin vertailumateriaaleihin, kun taas bakteerien kiinnittyminen oli tilas-

tollisesti merkitsevästi pienempää. Johtopäätöksenä voidaan sanoa, että DLC-PTFE-h pinnoite soveltuu hyvin estämään implantti-infektioita, koska se toimii suotuisana kasvualustana isännän soluille ja vähentää infektoita aiheuttavien bakteerien kiinnittymistä pintoihin. Tällaisten suorien menetelmien kehittäminen infektioiden estämiseksi on erityisen tärkeää, kun bakteerien antibioottiresistenssi kasvaa.

Kirjallisuus

1. Darouiche R: Device-associated infections: a macro-problem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis* 2001;33:1567-1572.
2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE: Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645-1654.
3. DeMane CQ: The development of implants and implantable materials. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:225-234.
4. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1998;43:338-348.
5. Donlan RM: Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387-1392.
6. Waldvogel FA, Bisno AL, editors: Infections Associated with Indwelling Medical Devices. Third Edition. Washington: ASM Press; 2000.
7. Gristina AG: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588-1595.
8. Weiss B, Schaefer UF, Zapp J, Lamprecht A, Stallmach A, Lehr CM: Nanoparticles made of fluorescence-labelled poly(L-lactide-co-glycolide): preparation, stability, and biocompatibility. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:3048-3056.
9. Maher S, McClean S: Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1289-1298.
10. Esposito A, Mezzogiorno A, Sannino A, De Rosa A, Menditti D, Esposito V, ym: Hyaluronic acid based materials for intestine tissue engineering: a morphological and biochemical study of cell-material interaction. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:1365-1372.
11. Anttila A, Tiainen V-M, Kiuru M, Alakoski E, Arstila K: Preparation of diamond-like carbon polymer hybrid films using filtered pulsed arc discharge method. *Surface Engineering* 2003;19:425-428.
12. Kiuru M, Alakoski E: Low sliding angles in hydrophobic and oleophobic coatings prepared with plasma discharge method. *Mater Lett* 2004;58:2213-2216.
13. 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.
14. Anttila A, Lappalainen R, Tiainen V-M, Hakovirta M: Superior attachment of high-quality hydrogen-free amorphous diamond films to solid materials. *Adv Mater* 1997;9:1161-1164.

15. Alakoski E, Kiuru M, Tiainen V-M, Anttila A: Adhesion and quality test for tetrahedral amorphous carbon coating process. *Diam Relat Mater* 2003;12:2115-2118.
16. Robertson J: Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R* 2002;37:129.
17. Anttila A, Hirvonen J-P, Koskinen J: Procedure and apparatus for the coating of materials by means of a pulsating plasma beam. US Patent No. 5078848, 1992.
18. Anttila A, Lappalainen R, Heinonen H, Santavirta S, Konttinen YT: Superiority of diamondlike carbon coatings on articulating surfaces of artificial hip joint, *New Diam. Front C Tech* 1999;9:283-288.
19. 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 Part B: Appl. Biomater.* 2003;66B:410-413.