

PODATNOŚĆ POWIERZCHNI BIOMATERIAŁU NA KOLONIZACJĘ BAKTERIAMI ZALEŻY OD RODZAJU TEJ POWIERZCHNI

W. JAKUBOWSKI*, W. SZYMAŃSKI*, W. OKRÓJ*,
I. PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ*, M. PIREK*, B. WALKOWIAK**

*INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ,
**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ,
UNIwersytet MEDYCZNY W ŁODZI,

[*Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 206-207*]

Wstęp

Wykorzystanie biomateriałów znacznie wzrosło w ciągu ostatnich dekad. Biomateriały znalazły liczne zastosowania do produkcji implantów dentystycznych, implantów ortopedycznych, zastawki serca, soczewek kontaktowych czy narzędzi chirurgicznych. Niestety, użycie ich zawsze niesie ryzyko infekcji bakteryjnej głównie w wyniku pooperacyjnego powstawania biofilmu na sztucznych powierzchniach. Adhezja bakterii do powierzchni biomateriału jest pierwszym krokiem w powstawaniu biofilmu. Jego obecność na powierzchni implantu może doprowadzić do ogólnoustrojowej infekcji w sytuacji osłabienia systemu odpornościowego. Wynikiem tego jest zwykle utrata funkcji implantu, z poważnymi następstwami zdrowotnymi, w tym długotrwałą hospitalizacją a nawet śmiercią. Bakterie żyjące w strukturze biofilmu są znacznie trudniej dostępne dla układu odpornościowego oraz bardziej odporne na antybiotyki. Dotychczas mechanizmy kolonizacji biomateriałów przez bakterie i powstawania biofilmu nie są dokładnie poznane. Ostatnio opisaliśmy zróżnicowaną podatność stali medycznej, tytanu oraz nanokrystalicznego diamentu (NCD) na kolonizację bakteriami w warunkach braku przepływu (Jakubowski W. i wsp., 2004).

Cel pracy

Nasze obecne badania poświęcone zostały obserwacjom pierwszego kroku powstawania biofilmu, w warunkach przepływu, w zależności od struktury powierzchni stali medycznej.

Materiały i metody

Wszystkie analitycznej jakości zakupione były w firmie SIGMA-ALDRICH. Komórki *E. coli* (szczep K12) otrzymano z Zakładu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego. Do badań użyto próbek ze stali medycznej (AISI 316L) polerowanej mechanicznie i elektrochemicznie. Część próbek poddano modyfikacji powierzchniowej poprzez pokrycie warstwą krystalicznego diamentu metodą RF CVPD (Mitura S. i wsp., 1999). Próbkę umieszczano wewnątrz bioreaktora własnej konstrukcji (200 ml) wypełnionego pożywką zawiera-

A SUSCEPTIBILITY OF BIOMATERIAL SURFACE TO BACTERIAL COLONIZATION DEPENDS ON TYPE OF THIS SURFACE

W. JAKUBOWSKI*, W. SZYMAŃSKI*, W. OKRÓJ*,
I. PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ*, M. PIREK*, B. WALKOWIAK**

*INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

**DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS,
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 206-207*]

Introduction

An application of implantable biomaterial as medical devices has grown rapidly over the past decades. Biomaterials found numerous applications in several fields, for example in production of dental or orthopedic implants, heart valves, contact lenses or surgical instruments. Unfortunately, the use of implants increases a risk of bacterial infection mainly due to post surgery biofilm formation on artificial surfaces. Bacterial adhesion to biomaterial surface is a first step in biofilm formation. Presence of biofilm at the implant surface can result in a massive infection when the immune system is weakened. It usually leads to complete failure of the implant with serious health problem, prolonged hospitalization and even death. Bacteria present in a biofilm structure are less accessible to the immune system and are significantly more resistant to antibiotics. So far the detailed mechanisms of bacterial colonization of biomaterials and biofilm formation remains unclear. Recently we have reported different susceptibility of medical steel, titanium and nanocrystalline diamond (NCD) to bacterial colonization under flow-less condition (Jakubowski W et. al. 2004).

The aim

Our present investigation was devoted to estimation of the first step biofilm formation under flow condition in a dependence of surface structure of medical steel.

Materials and methods

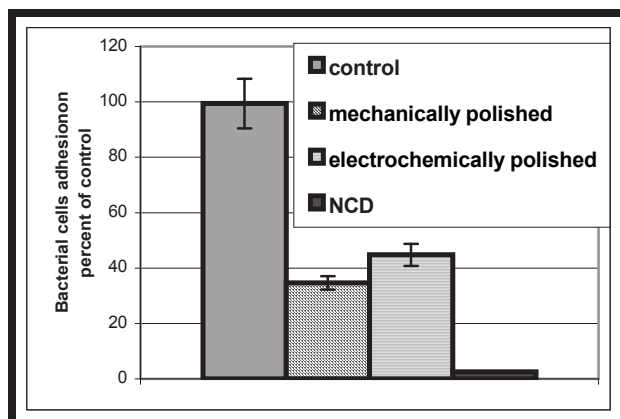
All chemicals were analytical grade and were purchased from SIGMA-ALDRICH. *E. coli* cells (strain K12) were from Department of Molecular Biophysics, University of Lodz. Samples made of stainless steel (AISI 316L) were mechanically and electrochemically polished. Some samples were then subjected to modification by nanocrystalline diamond synthesis at the surface by RF CVPD method (Mitura S. et. al., 1999).

Samples were placed into a homemade bioreactor (200 ml) filled with a media containing NaCl (1%), bactopectone (1%) and yeast extract (0.5%), pH 7.0. The medium was supplemented with a trace amount of *E. coli* cells (approximately

jącą NaCl (1%), bactopectone (1%) i ekstrakt drożdżowy (0.5%), pH 7,0. Do medium dodawano śladową ilość bakterii *E.coli* (ok. 2×10^6). Komórki były hodowane przez 6 godzin w temp. 28°C w warunkach ciągłego przepływu pożywki (10 ml/min). Po tym czasie próbki intensywnie przemyto wodą destylowaną. Na powierzchnię próbki nanoszono barwnik fluorescencyjny bis-benzidynę - 20 ml z roztworu wyjściowego (100 mg/ml). Wybarwione komórki bakteryjne obserwowane były na powierzchni próbki, i dokumentowane, przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i kamery CCD. Wyniki z trzech niezależnych eksperymentów poddano analizie statystycznej. Rezultaty prezentowane są jako ŚREDNIA ± ODCHYLENIE STANDARDOWE.

Wyniki

W pracy porównaliśmy liczbę komórek bakteryjnych znalezionych na powierzchniach próbek. Jako próbkę kontrolną potraktowano surową, niepolerowaną próbkę ze stali medycznej. Okazało się, że powierzchnia NCD była prawie całkowicie oporna na formowanie biofilmu, podczas gdy obie próbki, polerowane mechanicznie i elektrochemicznie, były z łatwością kolonizowane przez bakterie (RYS. 1). Jednocześnie porównano wartości parametru Ra (chropowatości) pomierzonego dla badanych próbek (RYS. 2). Nasze wyniki wyraźnie sugerują, że liczba zaadherowanych bakterii zależy zarówno od chropowatości powierzchni jak i od modyfikacji tej powierzchni.



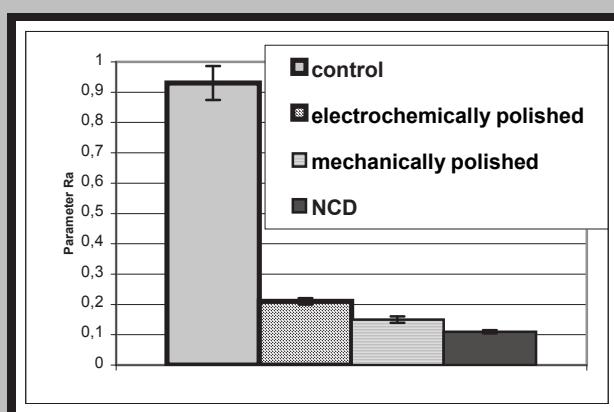
RYS. 1. Liczba komórek *E.coli* znalezionych na badanych powierzchniach przedstawiona jako procent kontroli (surowej stali medycznej).

FIG. 1. A number of *E.coli* cells found at the studied surfaces presented as a percent of control (crude sample of medical steel).

2×10^6). The cells were cultured for 6 hours at 28°C with a continuous flow of 10 ml/min. After that, samples were removed from the grow medium and were extensively washed out with distilled water. *E.coli* cells adhered to the surfaces were observed by a fluorescence microscope inspection with the use of bis-benzidine. Each surface was robed with the dye by applying of 20 μ l of stock solution (100 μ g/ml). Finally, bacterial cells present at the sample surface were detected with the fluorescence microscope, and pictures were documented with a CCD camera. At least three independent experiments with several examined segments of the samples provided data for statistical evaluations. The results are presented as a MEAN \pm SD.

Results

In the present report we have compared a number of bacterial cells found at the sample surfaces. As a control sample the crude, no polished, stainless steel sample was used. We have found that surface made of nanocrystalline diamond was almost totally resistant for biofilm formation, whereas both, mechanically and electrochemically polished medical steel samples were easily colonized by bacteria (FIG. 1). Simultaneously we have compared values of Ra parameter (roughness) determined for the studied samples (FIG. 2). Our results strongly suggest that the number of adhered bacteria depends on both, surface roughness and surface modification.



RYS. 2. Wartości współczynnika Ra oznaczonego dla badanych powierzchni.

FIG. 2. Values of Ra parameter determined for the studied surfaces.

Piśmiennictwo

References

- [1] W. Jakubowski, G. Bartzosz, W. Okrój, P. Niedzielski, S. Mitura, B. Walkowiak, Nanocrystalline diamond surface is resistant to bacterial colonization. *Diam Rel Mater* 2004, 10:1761-1763.
- [2] Mitura S, Mitura A, Niedzielski P, Couvrat P. Nanocrystalline Diamond Coatings, *J Chaos, Solitons and Fractals*, 1999; 10:2165-2177.