

Silné antibakteriální vlastnosti kovového povrchu modifikovaného nanotrubicemi titanu a nanostříbrem

Strong Antibacterial Efficacy of Titanium Surfaces Modified by Nanotubes and Silver Nanoparticles

J. GALLO¹, Š. HRADLOVÁ², L. JOSKA³, R. VEČEŘOVÁ⁴, A. GALANDÁKOVÁ⁵, L. CVRČEK⁶, E. KRIEHOVÁ⁷

¹ Ortopedická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

² Katedra fyzikální chemie, Regionální centrum pokročilých materiálů a technologií Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

³ Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství Fakulty chemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze

⁴ Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

⁵ Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

⁶ Ústav materiálového inženýrství Fakulty strojní Českého vysokého učení technického v Praze

⁷ Ústav imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Nano-structuring and nano-silver have been extensively studied for improving the antibacterial ability of implants due to their powerful antibacterial activity; however, there is no clinical application as yet. The aim of the study was to determine the antibacterial, antiadhesive and cytotoxic features of Ti6Al4V modified with nano-texturing and silver nano-particles.

MATERIAL AND METHODS

The nanoparticles were applied on polished and nano-textured Ti6Al4V using sonoreduction. The surface topography, roughness, friction coefficients, hardness and elastic modulus values for prepared top layers were established. The materials were tested for antibacterial and antiadhesion activity using reference bacterial strains (*Staphylococcus epidermidis* CCM 7221, *Staphylococcus aureus* MRSA 4591, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954) and their cytocompatibility.

RESULTS

A strong antibacterial activity of samples treated with nano-texture and/or silver nanoparticles compared to all the tested bacterial strains at 24 hours was proven. This antibacterial activity was diminishing in relation to *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* at 48 and 72 hours but remained very effective against *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. We also demonstrated antibiofilm activity for samples treated with silver nanoparticles and nano-tubes in experiments lasting 24 and 72 hours.

DISCUSSION

Our main findings are in agreement with those reported in recent literature. The implant surfaces treated with nano-texture in combination with silver nanoparticles exhibit strong antibacterial and antibiofilm characteristics. Despite there is conclusive evidence of strong antibacterial functioning, why these implant modifications have not been widely applied in clinical practice remains a question. While many obstacles including legislative procedures required for clinical implementation are more or less known, it should be clearly demonstrated that this surface modification does neither harm the patient nor interfere with the long-term survivorship of the implants before their wide-range clinical application.

CONCLUSIONS

Surface modification of Ti6Al4V with nano-texturing and silver nanoparticles resulted in strong antibacterial and modest antibiofilm effects. Thus, our results confirmed the technological potential of nano-texturing and silver nanoparticles for the improvement of antibacterial properties of implants.

Key words: prosthetic joint infection, anti-infective biomaterials, titanium alloy, silver nanoparticles, nanotubes, prevention of infection.

ÚVOD

Infekce kloubní náhrady (IKN) patří pro obtížnou léčbu, nejistý výsledek i vysoké náklady spojené s terapií k nejproblematictějšímu kapitólám ortopedie. IKN můžeme definovat jako replikaci bakterií, která probíhá na povrchu implantátu nebo v jeho okolí (11). Přítomnost bakterií provokuje lokální či celkovou reakci organismu různé intenzity, přičemž dochází k poškození tkání hostitele. Významnou úlohu v patogenezi IKN sehrává implantát (4). Ať jej vložíme do kteréhokoli kompartmentu (kost, kloub, krevní řečiště atd.), jeho přítomnost se vždy pojí s vyšší pravděpodobností kolonizace bakteriemi. Jedním z důvodů je skutečnost, že povrch materiálu slouží jako optimální „vazebné“ místo, kde dochází ke snadné adhezi mikroorganismů (2). Dalším důvodem je, že implantát působí jako velké cizí těleso, které tlumí lokální imunitní odpověď v okolních tkáních (5, 13), a tím znesnadňuje eradikaci bakterií přirozenou cestou. Základní strategie bakteriálního přežití je spojena s tvorbou biofilmu. Ten umožňuje bakteriím kolonizovat umělé implantáty, přičemž bakterie v biofilmu mají vyšší rezistenci k antimikrobiální léčbě a odolávají efektivně obranným mechanismům hostitele (6).

Proto se věnuje velká pozornost antibakteriálním vlastnostem – úpravám – protetických povrchů. Na toto téma bylo v poslední době napsáno několik přehledových článků, které popisují řadu potenciálně slibných technologií, vhodných k přenosu do klinické praxe (8, 10). Tam se však zatím prosadily pouze galvanicky postříbené povrchy, které se navíc ani nevyrábí sériově, ale převážně na zakázku v tumorózních indikacích (15, 22). Překážky translačního výzkumu, resp. následné implementace do praxe podrobně popisuje Moriarty a spol. (17). Využití implantátů s antibakteriálními a antiadhezivními povrchy by mohlo snížit riziko vzniku IKN v praxi, proto se vývoji těchto povrchů věnuje velká pozornost.

Cílem našeho sdělení je informovat o modifikaci povrchu kovových materiálů, z nichž se vyrábí kloubní náhrady, pomocí nanotubic a nanočástic stříbra a o testování jejich antibakteriálních, antiadhezivních a cytotoxických vlastností.

MATERIÁL A METODIKA

Výroba testovacích terčů

Testovány byly materiály ze skupiny titanových slitin, konkrétně **Ti6Al4V ELI** (ISO 5832-3). Jednoznačnou výhodou této slitiny je možnost nanostrukturovat její povrch bez nutnosti předúpravy povrchu. Pro testování vybraných materiálů byl zvolen rozměr vzorků o průměru 15,0 mm a tloušťce 2,5 mm s jemně soustruženým povrchem (drsnost Ra v rozmezí 0,2–0,8 μ m). Drsnost povrchu odpovídá finální úpravě implantátů v místech, kde nedochází k artikulaci povrchu.

Tvorba nanostruktur

Povrch terčů jsme nejprve mechanicky brousili do drsnosti metalografického papíru P2500 a následně

čistili v ultrazvuku etanolem a destilovanou vodou. Nanostrukturování probíhalo v teflonové cele s pomocnými grafitovými elektrodami, jako referenční jsme použili chloridostříbrnou elektrodu (3 mol/l KCl). Elektrolyt obsahoval 1 mol/l síranu amonného a 0,2 % fluoridu amonného. Při měřeních jsme použili Potenciostat-Galvanostat Jaissle IMP 88 PC-200V s řídicí jednotkou PGU-AUTO Extern. Nanostrukтуры jsme vytvářeli při rychlosti polarizace 100 mV/s na konečný potenciál 20 V nebo 30 V. Po skončení expozice jsme vzorky čistili v ultrazvukové lázni destilovanou vodou a následně 70% etanolem. Čištění probíhalo tak, aby došlo k maximálnímu vymytí zbytků elektrolytu z nanostruktur. Finálně jsme vzorky sušili acetonem. Stav nanostruktur jsme statisticky kontrolovali elektronovým mikroskopem. Určili jsme distribuci průměrů nanotubiček a tloušťku vrstvy. Složení nanostruktur jsme kontrolovali jak fotoelektronovou spektroskopií (XPS), tak elektronově disperzním spektrometrem (EDS).

Nanášení nanočástic stříbra

Pro syntézu nanostrukturální vrstvy stříbra jsme použili dusičnan stříbrný, amoniak (28% vodný roztok) a redukční činidlo (glukózu). Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich a byly použity bez dalšího čištění. Pro přípravu všech vodných roztoků jsme použili deionizovanou vodu.

Vrstvy stříbra na titanových discích jsme připravili pomocí ultrazvukového zařízení Q700 se standardní titanovou sondou 4220 (QSonica LLC, USA). Strukturu a morfologii nanosených vrstev nanočástic stříbra na discích jsme charakterizovali pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Hitachi SU6600 (Hitachi, Japonsko). Kvantifikaci stříbra na povrchu disku jsme prováděli rozkladem připravené nanovrstvy stříbra na mokré cestě v kyselině dusičné (finální koncentrace 6,5 %; Analpure, Analytika Ltd., Czech Republic) a následným měřením koncentrací metodou atomové absorpční spektrometrie s plamenovou ionizací (AAS-FA) na přístroji ContraAA 300 (Analytik Jena AG, Německo) s dvojitém monochromátorem Echelle s vysokým rozlišením (spektrální šířka pásma 2 pm při 200 nm) a zdrojem kontinuálního záření (xenonová lampa). Absorpční linie použitá pro tyto analýzy byla 328,0683 nm.

Vrstvy nanočástic stříbra jsme deponovali pomocí sonochemické redukční metody na titanové slitiny typu Ti6Al4V s leštěným povrchem a slitiny typu Ti6Al4V modifikované nanostrukturou TiO₂. Před depozicí jsme titanové disky Ti6Al4V bez nanostruktur TiO₂ důkladně vyčistili detergentem a omyli deionizovanou vodou. Disky opatřené TiO₂ nanostrukturou jsme před nanášením nanovrstvy omyli destilovanou vodou. Očištěné disky jsme opatrně upevnili vertikálně do plastové kádinky a následně přidali roztoky reakčních látek. Finální postup byl následující: k 1 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,25 mol/l jsme přidali 22,7 ml deionizované vody a 1 ml redukční látky o koncentraci 0,25 mol/l. Po smíchání jsme do reakční směsi ponořili hrot sonikátoru. Hodnota amplitudy sonikátoru byla 30 %, čas sonikace

byl 5 min. Několik sekund po startu sonikace jsme do kádinky s reakční směsí rychle vsťikli 0,3 ml roztoku amoniaku (2,5%). Po ukončení sonikace jsme disky vyjmuli, opláchli v deionizované vodě a sušili volně na vzduchu. Poté jsme disky jednotlivě balili a odeslali k dalšímu zpracování. Kvantifikaci obsahu stříbra v deponovaných vrstvách jsme provedli metodou AAS.

Testované vzorky

K testování antibakteriálních, antiadhezivních a cytotoxických vlastností jsme použili následující povrchy a jejich úpravy:

- 1) nemodifikovaný, leštěný Ti6Al4V,
- 2) leštěný Ti6Al4V s vrstvou nanočástic stříbra nanesených sonoredukci glukózou,
- 3) Ti6Al4V modifikovaný nanotrubičkami 20 V,
- 4) Ti6Al4V modifikovaný nanotrubičkami 20 V s vrstvou nanočástic stříbra nanesených sonoredukci glukózou.

Testování antibakteriální aktivity, včetně zábrany tvorby biofilmu

Studium antibakteriální aktivity a zábrany tvorby biofilmu probíhalo za statických podmínek na povrchu 1 cm² testovaných materiálů sterilizovaných autoklavováním. Ke stanovení jsme používali referenční bakteriální kmeny *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 (kontrolní kmen pro detekci biofilmu a *ica* operonu), *Staphylococcus aureus* MRSA 4591, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Escherichia coli* CCM 3954.

Stanovení antibakteriální aktivity

Postup stanovení antibakteriální aktivity jsme modifikovali podle ISO 22 196 *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*. Pro stanovení antibakteriální aktivity jsme použili ředěné kultivační médium (MH bujón, Himedia), které neumožňuje množení bakterií, ale pouze jejich přežití. Na povrch disků jsme inokulovali příslušnou bakteriální suspenzi o hustotě inokula 10⁵⁻⁶ CFU/ml. Po 24-, 48- a 72hodinové inkubaci při 37 °C ve vlhké komoře jsme disky opláchli fyziologickým roztokem, ve kterém jsme množství přeživších bakterií stanovili kultivačně a přepočítali na počet CFU/cm² po 24, 48 a 72 hodinách působení.

Testování antiadhezivních vlastností

Zábranu tvorby biofilmu jsme testovali využitím Christensenovy metody. Použité kultivační médium (BHI bujón + glukóza, Himedia) umožnilo množení bakterií a tvorbu extracelulárních polysacharidových substancí důležitých pro tvorbu bakteriálního biofilmu. Na povrchy disků jsme inokulovali bakteriální suspenzi o hustotě inokula 10⁵⁻⁶ CFU/ml. Po 24- a 72hodinové inkubaci při 37 °C ve vlhké komoře jsme z disků důkladným oplachem vodou odstranili volné neadherované bakterie. Vytvořený bakteriální biofilm jsme k povrchu disku fixovali metanolem a nabarvili krystalovou violetí. Po rozpuštění navázaného barviva kyselinou octovou jsme stanovili intenzitu zbarvení změřením optické denzity při 570 nm. *Cut off* hodnotu jsme stanovili jako optickou denzitu

Tab. 1. Kvantifikace produkce biofilmu

Hodnocení	Produkce biofilmu	Kritéria
Negativní	-	OD < <i>Cut off</i>
Slabě pozitivní	+	<i>Cut off</i> < OD < 2 x <i>Cut off</i>
Pozitivní	++	2 x <i>Cut off</i> < OD < 4 x <i>Cut off</i>
Silně pozitivní	+++	OD > 4 x <i>Cut off</i>

Legenda: OD – optická denzita

(OD) negativní kontroly + 3x směrodatnou odchylku 4 měření. Jako negativní kontrolu jsme použili terčík daného materiálu inokulovaný pouze kultivačním médiem bez bakterií. Kontrolní vzorek bez antibakteriální a antibiofilmové aktivity představoval povrch polystyrenu.

Kvantifikaci produkce biofilmu jsme provedli podle kritérií uvedených v tabulce 1.

Stanovení biokompatibility

Biokompatibilitu titanových terčíků, jejichž povrch jsme upravili pomocí nanotrubic a nanočástic stříbra, jsme hodnotili *testem extraktu* dle normy ČSN EN ISO 10993-5. K hodnocení jsme použili buněčnou linii myších fibroblastů Balb/c 3T3 (ECACC No. 86110401), kterou jsme kultivovali v DMEM médiu s obsahem penicilinu (100 U/ml), L-glutaminu (2 mmol/l), streptomycinu (100 mg/l), fetálního telecího séra (5 %) a bovinního séra (5 %).

Princip a metoda stanovení

Buňky se v kultuře neustále dělí a množí. Cytotoxická látka narušuje tento proces, což vede ke snížení počtu živých buněk narostlých v kultuře. K přesnému zjištění množství živých buněk v kultuře se používá fotometrická metoda (MTT test), zavedená standardně k hodnocení buněčné proliferace, životnosti a cytotoxicity (Siewerts, 1995). MTT test je založen na schopnosti živých buněk redukovat tetrazoliové soli na barevné formazanové produkty. Množství vytvořeného barviva stanovené fotometricky při vlnové délce 570 nm a vyjádřené absorbancí je úměrné metabolické aktivitě a počtu buněk v analyzovaném vzorku.

Příprava extraktů a provedení testu

Testované materiály (3 cm²/ml DMEM se sérem) se extrahovaly v Thermomixeru Comfort (24 hodin, 37 °C, 400 otáček/min). Abychom zabránili oteru vzorků o sebe nebo o stěny extrakční nádoby, umístili jsme každý kus vzorku zvlášť do jamky 24jamkové kultivační desky a převrstvili DMEM se sérem. Po extrakci jsme DMEM se sérem (100% extrakt) z několika jamek přepipetovali do jedné zkumavky a připravili extrakty o koncentraci 50 %, 25 % a 10 %, které jsme aplikovali na buňky. Po inkubaci (24 hodin, 37 °C, 5% CO₂) jsme buňky opláchli sterilním fosfátovým pufrém (PBS) a poté jsme aplikovali 100 µl čerstvého DMEM bez séra a 10 µl roztoku 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT; 5 mg/ml; PBS). Po inkubaci (3 hodiny, 37 °C; 5 % CO₂) jsme médium s MTT odsáli a do jamek aplikovali 200 µl dimethylsulfoxidu (DMSO)

s 1% amoniakem. Po protřepání jsme měřili absorbanci při 570 nm. Jako negativní kontrolu jsme použili extrakt polystyrenu a jako kontrolu pozitivní 1% Triton X100.

Vyhodnocení

Stupeň cytotoxicity jsme hodnotili na základě životnosti buněk, kterou jsme vypočítali z průměrných hodnot absorbance (A) naměřených pro vzorek a kontrolu buněk (buněk v nepřítomnosti vzorku) po odečtení A blanku (alkalizovaný DMSO):

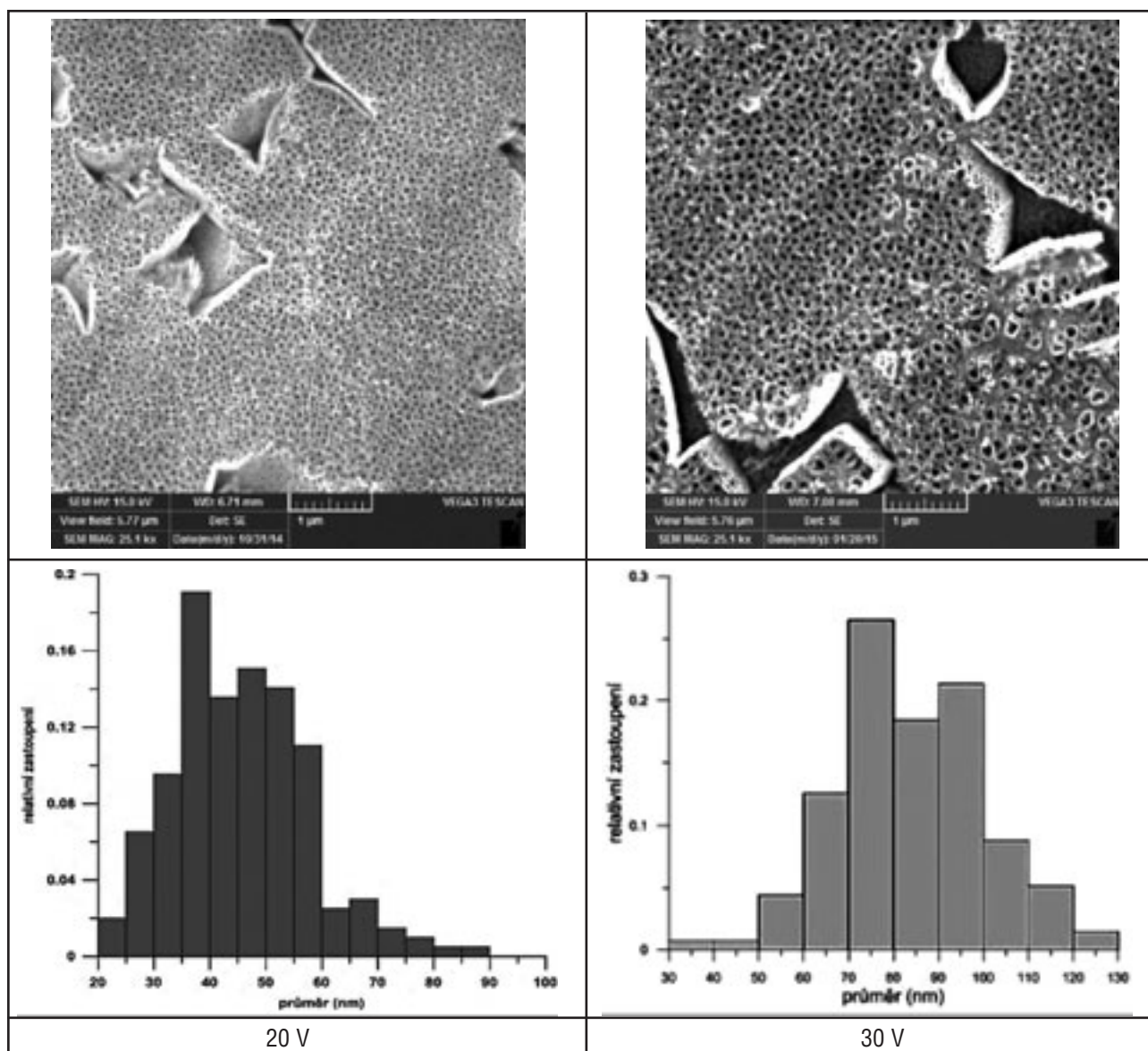
$$\text{Životnost buněk (\%)} = \frac{\text{průměr } A_{\text{vzorek}} - \text{průměr } A_{\text{neg. kontrola}}}{\text{průměr } A_{\text{kontrola buněk}} - \text{průměr } A_{\text{neg. kontrola}}} \times 100$$

Čím nižší je hodnota životnosti buněk (%), tím vyšší je cytotoxický potenciál zkoušeného materiálu. Jestliže životnost buněk zkoušeného materiálu poklesne pod 70 % životnosti negativní kontroly, je látka potenciálně cytotoxická.

VÝSLEDKY

Charakterizace nanostruktur

Anodickou oxidací jsme připravili povrchy pokryté tubulární nanostrukturou. Kromě ní je možné pozorovat na povrchu vyleptané mikrometrové oblasti, které odpovídají beta fázi v mikrostruktuře slitiny Ti6Al4V (obr. 1). Tato fáze obsahuje vyšší koncentraci vanadu a je za podmínek nanostrukturování méně korozně odolná. Plocha po vyleptané beta fázi zabírá cca 11 % povrchu a je nezávislá na podmínkách nanostrukturování. Stav nanostruktur a histogramy průměrů nanotrubek pro jednotlivé experimentální podmínky, respektive hodnoty finálního potenciálu, uvádíme na obrázku 1. Z výsledků je patrné, že s rostoucím potenciálem roste průměr nanotrubek a zároveň se zvyšuje rozpětí průměrů. Tloušťka vrstvy nanostruktur se pohybovala od 500 nm pro potenciál 20 V až po cca 700 nm pro 30 V.



Obr. 1. Nanostrukturovaný povrch slitiny Ti6Al4V ELI a histogramy vnitřních průměrů nanotrubiček (konečný potenciál 20 V a 30 V).

Charakterizace nanočástic stříbra

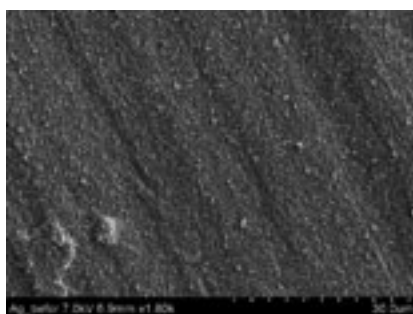
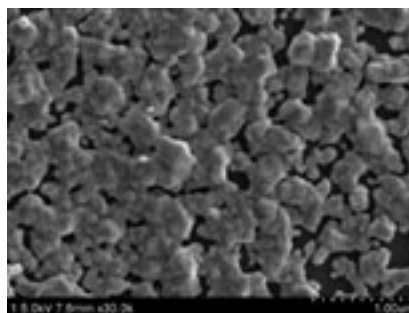
Za použití sonochemické redukční metody byly úspěšně připraveny nanostrukturní vrstvy částic stříbra na obou typech použitých slitin, tedy na leštěné slitině Ti6Al4V a na slitině modifikované nanostrukturou TiO₂ o menším průměru nanotubic (připravené při konečném potenciálu 20 V), což je patrné na snímcích z elektronového mikroskopu (obr. 2 a 3). Velikost částic stříbra deponovaných na povrchu obou titanových disků se pohybovala v rozmezí od 50 do 150 nm. Nicméně lepších charakteristik dosahovala vrstva částic stříbra deponovaná na povrchu nanotubic TiO₂, jak je patrné při porovnání obrázků 2 a 3. Současně jsme také metodou AAS stanovili vyšší obsah stříbra v případě depozice na povrchu nanotubic TiO₂ při porovnání s obsahem stříbra ve vrstvě na leštěném disku bez nanostruktury (tab. 2). Slitiny opatřené na povrchu nanostrukturou TiO₂ se tedy jeví jako vhodnější pro depozici nanočástic stříbra.

Antibakteriální aktivita

Testované materiály s vrstvou nanočástic stříbra vykazovaly po 24 hodinách působení vysokou antibakteriální aktivitu proti všem testovaným bakteriálním kmenům (graf 1). Po 48hodinovém působení byla antibakteriální aktivita srovnatelná s výsledky po 24hodinovém působení, pouze vzorek (A) s vrstvou nanostříbra ztratil aktivitu proti *Staphylococcus aureus* MRSA a *Enterococcus faecalis*, ale zůstal aktivní proti *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* (graf 2). Po 72hodinovém působení si vysokou antibakteriální aktivitu proti všem kmenům zachoval pouze vzorek F (kombinace nanotubic a nanočástic stříbra). Vzorek A si zachoval aktivitu proti *Escherichia coli* (graf 3).



Obr. 2. Nanočástice stříbra na povrchu leštěného Ti6Al4V disku.

Obr. 3. Nanočástice stříbra na povrchu disku Ti6Al4V modifikovaného nanostrukturou TiO₂ pro 20 V.

Tab. 2. Množství stříbra (μg) na horní ploše disku stanovené metodou AAS

	Množství Ag (μg)	
	kontrola	SONO Ag
Leštěný Ti6Al4V	0	176,45
Ti6Al4V s TiO ₂ nanostrukturou	0	363,65

Legenda: AAS – atomová absorpční spektrometrie

Tab. 3. Biokompatibilita titanových terčíků upravených pomocí nanotubic a nanočástic stříbra

Ředění vzorku	Terčíky			
	Životnost buněk (%)			
	1	2	3	4
(100%)	76,2 ± 2,6	73,0 ± 11,3	70,3 ± 28,2	82,8 ± 19,0
1:1 (50%)	81,5 ± 2,4	77,5 ± 2,4	75,6 ± 19,3	83,3 ± 12,1
1:3 (25%)	81,7 ± 1,9	79,4 ± 0,7	86,5 ± 6,7	90,7 ± 5,0
1:9 (10%)	84,5 ± 3,8	86,7 ± 2,0	86,3 ± 5,1	90,1 ± 3,8

Legenda: Druhy terčíků: 1) nemodifikovaný, leštěný Ti6Al4V, 2) leštěný Ti6Al4V s vrstvou nanočástic stříbra nanosených sonoredukci glukózou, 3) Ti6Al4V modifikovaný nanotubičkami 20 V, 4) Ti6Al4V modifikovaný nanotubičkami 20 V s vrstvou nanočástic stříbra nanosených sonoredukci glukózou

Zábrana tvorby biofilmu

Bakteriální biofilm se v nízké kvantitě tvořil na všech testovaných materiálech, včetně povrchů s prokázanou antibakteriální aktivitou. Po 24 hodinách se biofilm tvořil v nižší kvantitě na vzorcích H (samotná nanostruktura) a F (nanostruktura a nanočástice), (graf 4). O něco nižší antibiofilmový efekt jsme pozorovali při hodnocení po 72 hodinách (graf 5).

Hodnocení biokompatibility

Při hodnocení biokompatibility titanových terčíků jsme použili buněčnou linii myších fibroblastů Balb/c 3T3 jako standardní model používaný pro akreditované zkoušky při testování prostředků zdravotnické techniky. Z výsledků, které uvádíme v tabulce 3, vyplývá, že terčíky modifikované vrstvou nanočástic stříbra nebo nanotubičkami snižují životnost buněk, avšak toto snížení se pohybuje v rozmezí do 30 % negativní kontroly. Podle normy ČSN EN ISO 10993-5, která uvádí, že snížení životnosti buněk o více než 30 % je považováno za cytotoxický účinek, můžeme tyto vzorky jednoznačně hodnotit jako necytotoxické.

DISKUSE

Vyvinuli jsme specifický postup nanášení částic nanostříbra na kovové biomateriály, z nichž se vyrábí kloubní náhrady. Naše studie prokázala

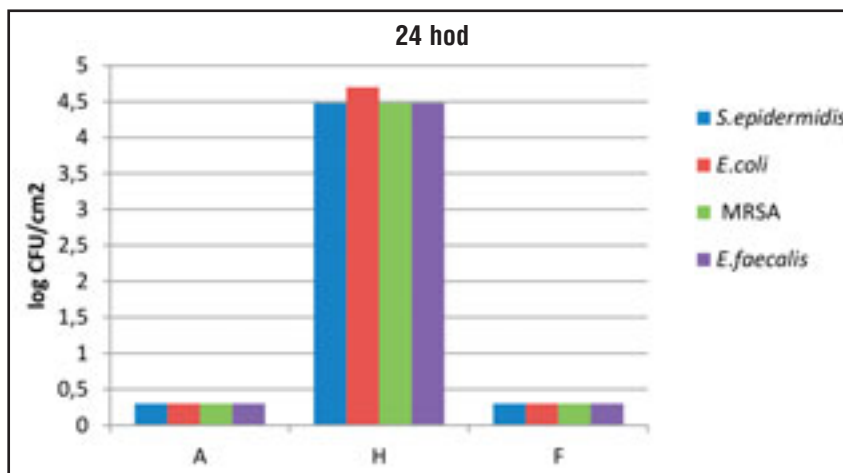
velmi silné antibakteriální chování vrstev nanostříbra, trvající několik dnů. Výborné antibakteriální působení vykazují i povrchy s titanovými nanotrubicemi, resp. kombinace obou povrchových úprav. Co se týče antibiofilmových vlastností, můžeme doložit nižší kvantitu biofilmu na materiálech s modifikovanými povrchy ve srovnání s kontrolou. Nejsilnější působení proti biofilmu vykazovala kombinace nanotrubic s nanostříbrem.

Při testování biokompatibilitě materiálů jsme zjistili, že povrchy modifikované vrstvami nanostříbra i titanovými nanotrubicemi sice snižují životnost buněk, ale toto snížení životnosti se pohybuje v rozmezí do 30 % negativní kontroly a dle normy ČSN EN ISO 10993-5 lze tedy tyto materiály jednoznačně hodnotit jako necytotoxické. Kombinace nanotrubic s nanočásticemi stříbra vykazovala nejsilnější působení proti biofilmu a současně nejvyšší biokompatibilitu.

V klinické praxi stále postrádáme implantáty se zvýšenou antibakteriální/antibiofilmovou funkcionalitou. Přes dlouholeté používání moderních preventivních strategií se infekce kloubní náhrady stále drží na špičce časných pooperačních komplikací. V rámci inovací se velké naděje vkládají do synergického působení profylaktického podávání antibiotik s lokálně působící antibakteriální funkcionalitou (12). V literatuře byla popsána řada povrchových úprav biomateriálů používaných k výrobě kloubních náhrad (1). Do širokého klinického používání se však většina navržených a preklinicky otestovaných úprav nedostala. Výjimku představují implantáty s povrchovou vrstvou iontů stříbra nanášenou elektrolýzou postupem. Stříbro má velmi silné antibakteriální účinky, první klinické studie s iontovým stříbrem dokládají užitečnost této technologie v prevenci infekce kloubních náhrad v nádorové indikaci (22, 26). Podstatné je i to, že se neprokázal přímý ani nepřímý poškozující efekt postříbření implantátu. Podle jedné recentní práce nedochází k významnějšímu uvolňování stříbra do okolí endoprotézy ani systémově (21).

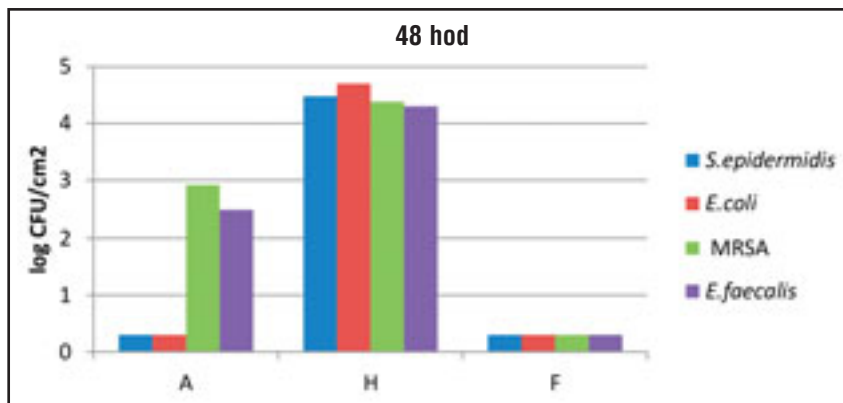
V této souvislosti je důležitá otázka, komu by měly být antibakteriální

Graf 1. Antibakteriální aktivita – počet CFU/cm² izolovaných z povrchu testovaných materiálů



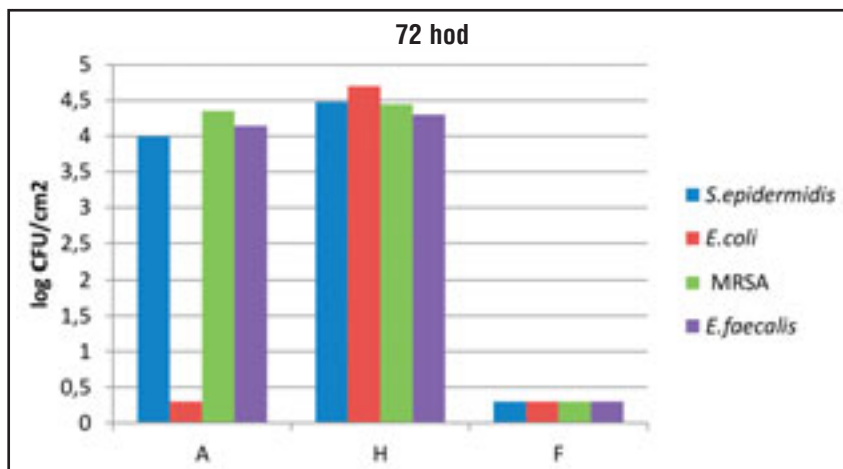
Legenda: Druhy terčiků: A (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, Ti6Al4V); H (samotná nanostruktura 20 V, Ti6Al4V); F (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, 20 V Ti6Al4V)

Graf 2. Antibakteriální aktivita – počet CFU/cm² izolovaných z povrchu testovaných materiálů



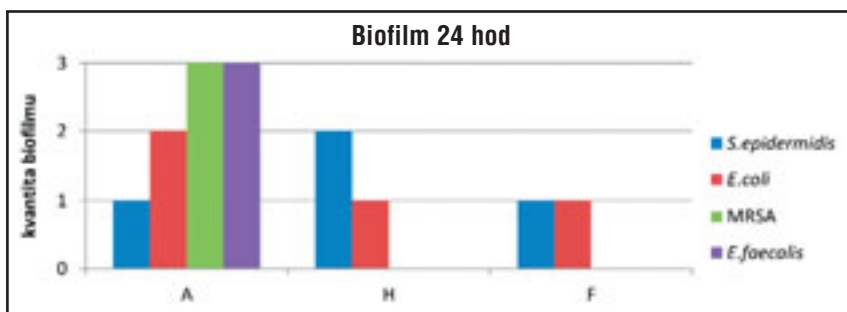
Legenda: Druhy terčiků: A (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, Ti6Al4V); H (samotná nanostruktura 20 V, Ti6Al4V); F (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, 20 V Ti6Al4V)

Graf 3. Antibakteriální aktivita – počet CFU/cm² izolovaných z povrchu testovaných materiálů



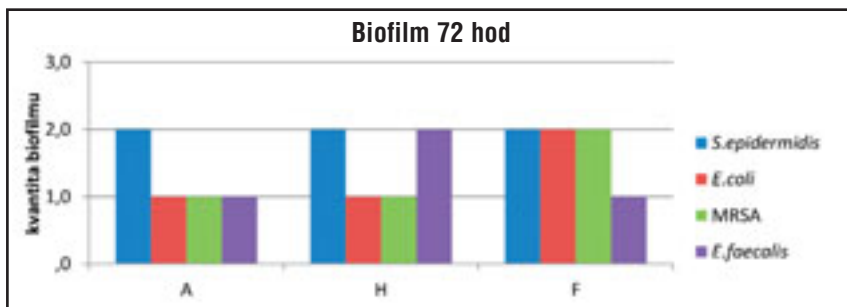
Legenda: Druhy terčiků: A (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, Ti6Al4V); H (samotná nanostruktura 20 V, Ti6Al4V); F (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, 20 V Ti6Al4V)

Graf 4. Semikvantitativní hodnocení produkce biofilmu



Legenda: Druhy terčiků: A (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, Ti6Al4V); H (samotná nanostruktura 20 V, Ti6Al4V); F (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, 20 V Ti6Al4V)

Graf 5. Semikvantitativní hodnocení produkce biofilmu



Legenda: Druhy terčiků: A (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, Ti6Al4V); H (samotná nanostruktura 20 V, Ti6Al4V); F (vrstva Ag nanočástice, sonoredukce glukózou, 20 V Ti6Al4V)

implantáty indikovány. Na jedné straně jistě existuje možnost plošného nasazení bez ohledu na riziko vzniku infekce kloubní náhrady (podobně jako profylaktické podávání ATB či prevence TEN). Tento přístup by však „znehodnotil“ preventivní užitek antibakteriálních implantátů, protože u většiny pacientů bychom vlastně nebyli schopni benefit prokázat. Došlo by k prodražení operací a při plošné indikaci lze očekávat i určitý počet komplikací spojených s lokálním, případně systémovým uvolněním stříbra. Nelze ani vyloučit vznik rezistence na antibakteriální opatření (v tomto případě na stříbro), (18). Na protilehlé straně spektra leží použití těchto protéz pouze u pacientů s vysokým rizikem infekce kloubní náhrady. Jako příklad se obvykle uvádí pacienti s nádorovým onemocněním (24), ostatní vhodní pacienti by mohli být identifikováni podle „kalkulačky“ rizika infekce kloubní náhrady.

Co se týče způsobu přípravy vrstev nanočástic na povrchu kovových terčiků, vybrali jsme z 5 potenciálně reálných možností sonochemickou metodu. Vyznačuje se tvorbou relativně homogenní, dostatečně silné a mechanicky odolné vrstvy nanočástic. Podobný postup byl již dříve publikován (23). Předpokládá se, že se z takto upraveného povrchu uvolňují ionty Ag^+ , které působí baktericidně a současně brání adhezi bakterií. Z pohledu prevence vzniku biofilmu je důležité určit typ interakcí, do kterých vrstva tvořená nanočásticemi vstupuje s okolními proteiny (hydrofobní/hydrofilní síly). Důvodem je obava o zachování účinnosti vrstvy stříbra po navázání

proteinů hostitele. Nanostříbro lze kombinovat s dalšími antibakteriálními látkami, jako jsou antibiotika (19) či chitosan (16).

Klinici se nejčastěji obávají argyrózy, která vzniká při uvolňování stříbra do okolí implantátu a může mít i systémové projevy (25). Ani naše řešení neznamená úplnou jistotu, že k argyróze (alespoň mírného stupně) nedojde. Naproti tomu většina studií publikujících dlouhodobé výsledky protéz s postříbeným povrchem systémové známky argyrózy nezjistila (1, 21). Lokální známky argyrózy se studovaly i na zvířecím modelu a nezjistilo se závažné uvolnění stříbra (14).

Nanotrubice titanu mají rovněž velmi dobrý antibakteriální efekt (3, 20). Ercan (7) antibakteriálně testoval, s využitím bakterie *Staphylococcus aureus*, chování nanostruktury vytvořené na tenkých fóliích komerčně čistého titanu (cpTi). Výsledky ukázaly, že vzniklá nanostruktura potlačila tvorbu biofilmu v porovnání s nanotechnologií neupravenými vzorky. Tento pozitivní efekt byl vysvětlen přítomností fluoru ve vrstvě nanotrubíček. Obdobných výsledků

se dosáhlo také na slitině Ti6Al4V, kde nanostrukturované povrchy vykazovaly vyšší baktericidnost než vzorky bez nanovrstvy (3). Publikovány byly práce obecně porovnávající vliv drsnosti povrchu na adhezenci bakterií. Z výsledků plyne, že nanohrubé, nanotexturované a nanotubulární titanové povrchy nepotlačují adhezi bakterií *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kontakt s nanopovrchem však vede k likvidaci vyššího počtu bakterií v porovnání s konvenčně připravenými vzorky (20). Nanostrukturované povrchy jsou velmi slibné i z hlediska podpory proliferace kostních buněk (9).

Limitace naší studie

Nejzávažnějším omezením studie je *in vitro* povaha testovacího protokolu, který je navíc převážně statický na rozdíl od dynamické klinické situace, kdy vrstvy přijdou opakovaně a dlouhodobě do kontaktu nejen s kloubním výpotkem či tkáňovou tekutinou, ale současně budou zatěžovány tlakem různě tuhého kloubního pouzdra, šlach či svalů v závislosti na konkrétní klinické aplikaci. Tyto biomechanické a biochemické podmínky mohou indukovat nepopsané, a tudíž nepředpokládané poruchy vrstvy a rychlejší odloučení sluků nanočástic stříbra. Naznačený scénář by tak mohl ovlivnit lokální toxicitu materiálu. Antibakteriální a antibiofilmové vlastnosti jsme testovali s vybranými patogeny, tzn. výsledky nelze aplikovat na všechny bakterie potenciálně spouštějící infekci kloubní náhrady.

ZÁVĚR

V naší studii prezentujeme originální postup při tvorbě vrstvy nanočástic stříbra na kovovém substrátu používaném při výrobě implantátů. Tato vrstva vykazuje silné antibakteriální a středně silné antibiofilmové vlastnosti a lze ji považovat za biokompatibilní. Kombinací s dalšími nekovovými antibakteriálními substancemi lze do budoucna snížit obsah nanočástic stříbra na povrchu testovaných biomateriálů při zachování antibakteriální a zlepšení antibiofilmové aktivity.

Literatura

- Alt V. Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics – A clinical review and risk-benefit analysis. *Injury*. 2017;48:599–607.
- Ballay R, Landor I, Růžička F, Melicherčík P, Tomaides J, Jahoda D. [Alloplastic materials and their propensity to bacterial colonisation]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2016;83:163–168.
- Beltran-Partida E, Valdez-Salas B, Escamilla A, Moreno-Ulloa A, Burtseva L, Valdez-Salas E, Alvarez MC, Nedeve N. The promotion of antibacterial effects of Ti6Al4V alloy modified with TiO₂ nanotubes using a superoxidized solution. *J Nanomater*. 2015.
- Busscher HJ, van der Mei HC. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS pathogens*. 2012;8:e1002440.
- Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, Jutte PC, van den Dungen JJ, Zaat SA, Schultz MJ, Grainger DW. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Scie Transl Med*. 2012;4:153rv110.
- Del Pozo JL. Biofilm-related disease. Expert review of anti-infective therapy. 2018;16:51–65.
- Ercan B, Kummer KM, Tarquinio KM, Webster TJ. Decreased *Staphylococcus aureus* biofilm growth on anodized nanotubular titanium and the effect of electrical stimulation. *Acta Biomater*. 2011;7:3003–3012.
- Ferraris S, Spriano S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;61:965–978.
- Fojt J. Ti-6Al-4V alloy surface modification for medical applications. *Appl Surf Sci*. 2012;262:163–167.
- Gallo J, Holinka M, Moucha CS. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci*. 2014;15:13849–13880.
- Gallo J, Juranova J, Svoboda M, Zapletalova J. Excellent AUC for joint fluid cytology in the detection/exclusion of hip and knee prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2017;161:310–319.
- Gallo J, Panacek A., Pucek R., Kriegova E., Hradilova S., Hobza M., Holinka M. Silver nanocoating technology in the prevention of prosthetic joint infection. *Materials*. 2016;9:337.
- Gardner AB, Lee SK, Woods EC, Acharya AP. Biomaterials-based modulation of the immune system. *BioMed Res Int*. 2013;2013:732182.
- Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Günsel A, Kemper FH, Winkelmann W, Von Eiff C. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model – an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials*. 2004;25:5547–5556.
- Harges J, von Eiff C, Streitburger A, Balke M, Budny T, Henrichs MP, Hauschild G, Ahrens H. Reduction of periprosthetic infection with silver-coated megaprotheses in patients with bone sarcoma. *J Surg Oncol*. 2010;101:389–395.
- Mishra SK, Ferreira JM, Kannan S. Mechanically stable antimicrobial chitosan-PVA-silver nanocomposite coatings deposited on titanium implants. *Carbohydr Polym*. 2015;121:37–48.
- Moriarty TF, Grainger DW, Richards RG. Challenges in linking preclinical anti-microbial research strategies with clinical outcomes for device-associated infections. *Eur Cell Mater*. 2014;28:112–128; discussion 128.
- Panacek A, Kvitek L, Smekalova M, Vecerova R, Kolar M, Roderova M, Dycka F, Sebel M, Pucek R, Tomanec O, Zboril R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol*. 2018;13:65–71.
- Panacek A, Smekalova M, Kilianova M, Pucek R, Bogdanova K, Vecerova R, Kolar M, Havrdova M, Plaza GA, Chojniak J, Zboril R, Kvitek L. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules*. 2015;21:E26.
- Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010;31:706–713.
- Scoccianti G, Frenos F, Beltrami G, Campanacci DA, Capanna R. Levels of silver ions in body fluids and clinical results in silver-coated megaprotheses after tumour, trauma or failed arthroplasty. *Injury*. 2016;47(Suppl 4):S11–S16.
- Schmidt-Brackling T, Streitburger A, Gosheger G, Boettner F, Nottrott M, Ahrens H, Dieckmann R, Guder W, Andreou D, Hauschild G, Moellenbeck B, Waldstein W, Harges J. Silver-coated megaprotheses: review of the literature. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2017;27:483–489.
- Soloviev M, Gedanken A. Coating a stainless steel plate with silver nanoparticles by the sonochemical method. *Ultrason Sonochem*. 2011;18:356–362.
- Včelák J, Matějovský Z Jr., Kofránek I, Kubeš R, Lesenský J. [Periprosthetic infection of the knee megaprosthesis following a resection of malignant tumours around the knee]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2017;84:46–51.
- Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3941–3965.
- Wafa H, Grimer RJ, Reddy K, Jeys L, Abudu A, Carter SR, Tillman RM. Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: case-control study. *Bone Joint J*. 2015;97-B:252–257.

Korespondující autor:

prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP a FNOL
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz