

FILME SUBȚIRI DE ACOPERIRE A IMPLANTURILOR, CU ELIBERARE PRELUNGITĂ DE MEDICAMENT

THIN FILMS WITH PROLONGED DRUG RELEASE FOR COATING IMPLANTS

Laura Floroian

Universitatea Transilvania din Brașov

Autor corespondent: Laura Floroian, e-mail lauraf@unitbv.ro

Abstract:

Introduction: Local drug delivery is an effective and promising procedure to prevent microbial adhesion to the surface of an implant and the formation of microbial biofilms. In this way, a high concentration of the drug can be achieved at the right site, which ultimately reduces the total duration of antibiotic treatment.

The main objective of the study: To produce and evaluate the behavior of new thin films for implant coatings, containing drug embedded in a bioglass and biocompatible polymer matrix.

Results and discussions: New bioactive glass-polymer-antibiotic composites were produced by matrix-assisted pulsed laser evaporation, deposited in uniform thin films on 316L stainless steel substrates, of the type used in implants. The synthesized structures were analyzed from a structural, compositional, bioactivity and antimicrobial effect point of view, using advanced and complementary methods. The obtained films have average thicknesses of ~ 500 nm and consist of a fairly smooth, dense and homogeneous matrix, on which isolated and merged spheroidal particles with an irregular distribution were grown. Energy dispersive X-ray spectroscopy identifies the formation of biological apatite after 42 days of immersion of the samples in simulated human fluid, a proof of the bioactivity of the films. The antibiotic incorporated in the obtained nanostructures undergoes a gradual dissolution in simulated human fluid, thus ensuring a high efficiency of the local treatment. The biocompatibility test used the mammalian cell line MG63 and showed that the obtained nanostructured composite films are non-cytotoxic. The antimicrobial effect of the coatings was tested against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, usually present in implant-associated infections. The studied films showed a strong anti-biofilm activity against these strains.

Conclusions: Thin films of bioglass-PMMA-doxycycline composite deposited on stainless steel substrates have many advantages: they are bioactive, prevent implant degradation and release of harmful metal ions (Cr, Ni, Cu) into the body. At the same time, their dissolution in human body fluids is accompanied by a prolonged release of active drug molecules, an ideal circumstance for the prevention of local infections.

Rezumat:

Introducere: Eliberarea locală a medicamentelor reprezintă o procedură eficientă și promițătoare de prevenire a aderenței microbilor la suprafața unui implant și formarea de biofilme microbiene. În acest mod se poate obține o concentrație mare de medicament la locul potrivit, care reduce în cele din urmă durata totală a tratamentului cu antibiotice.

Obiectivul principal al studiului: Realizarea și evaluarea comportamentului pentru noi filme subțiri de acoperire a implanturilor, ce conțin medicament înglobat într-o matrice de biosticlă și polimer biocompatibil.

Rezultate și discuții: Au fost realizate noi compozite bioactive din sticlă-polimer-antibiotic prin evaporare cu laser pulsant, asistată de o matrice, depuse în filme subțiri uniforme pe substraturi din oțel inoxidabil 316L, de tipul celor utilizate în implanturi. Structurile sintetizate au fost analizate din punct de vedere structural, compozițional, al bioactivității și al efectului antimicrobian, prin metode avansate și complementare.

Filmele obținute au grosimi medii de ~ 500 nm și constau dintr-o matrice destul de netedă, densă și omogenă, pe care au fost crescute particule sferoidale izolate și îmbinate cu o distribuție neregulată.

Spectroscopia cu raze X cu dispersie de energie identifică formarea de apatită biologică după 42 de zile de imersie a probelor în fluid uman simulat, o dovadă a bioactivității filmelor.

Antibioticul încorporat în nanostructurile obținute suferă o dizolvare treptată în fluid uman simulat, asigurând astfel o eficiență mare a tratamentului local. Testul de biocompatibilitate a utilizat linia celulară de mamifer MG63 și a arătat că filmele compozite nanostructurate obținute sunt necitotoxice. Efectul antimicrobian al acoperirilor a fost testat împotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, prezente de obicei în infecțiile asociate implantului. Filmele studiate au prezentat o activitate anti-biofilm puternică împotriva acestor tulpini.

Concluzii: Filmele subțiri de compozit biosticlă – PMMA- doxiciclină depuse pe substraturi din oțel inoxidabil au o mulțime de avantaje: sunt bioactive, împiedică degradarea implantului și eliberarea ionilor

metalici nocivi (Cr, Ni, Cu) în organism. Totodată, dizolvarea lor în fluidele corpului uman este însoțită de o eliberare prelungită de molecule active de medicament, o circumstanță ideală pentru prevenirea infecțiilor locale.

Key-words: *functional coatings, thin films, antibiotic release, antimicrobial effect*

Cuvinte cheie: *acoperiri funcționale, filme subțiri, eliberare de antibiotice, efect antimicrobian-19*

Introducere

În ultimii ani, progresul tehnicilor chirurgicale a condus la o creștere explozivă a utilizării biomaterialelor pentru dispozitive medicale avansate și implanturi. Unul dintre pericolele majore asociate cu introducerea unui implant în corpul uman este riscul de infecții microbiene. S-a demonstrat că o importanță considerabilă în patogeneza infecțiilor asociate implanturilor medicale o are apariția biofilmelor bacteriene, care prezintă rezistență crescută atât la sistemul imunitar al gazdei, cât și la antibiotice (Haq, 2024; Kadirvelu, 2024).

Biofilmul microbial este definit ca o comunitate microbială aderată la substrat și protejată de o matrice polimerică extracelulară, auto-secretată, prezentând un fenotip modificat în ceea ce privește creșterea, expresia genelor și producția de proteine. În acest context, *Staphylococcus aureus* este cel mai frecvent agent patogen care cauzează infecții asociate implanturilor (Zhao, 2024). De asemenea, bacilii Gram negativi contribuie și ei cu un procent important, până la 23%, la acest tip de infecții, unul dintre microorganismele predominante fiind *Escherichia coli* (Macias-Valcayo, 2022). Infecțiile presupun formarea de biofilme care fac ineficientă antibioterapia sistemică și răspunsul imun al gazdei și ar putea duce la infecții cronice, răspândirea celulelor biofilmului către țesuturile neinfectate și în cele din urmă la eșecul implantului (Lin, 2024).

Una dintre cele mai de succes abordări în combaterea infecțiilor asociate biofilmului este prevenirea aderenței sau întârzierea creșterii microorganismelor deja aderente și/sau colonizatoare, prin acoperirea suprafeței implantului cu pelicule bioactive care eliberează medicamente antimicrobiene (Kravanja, 2022; Haq, 2023). Livrarea locală a medicamentelor reprezintă o procedură eficientă și promițătoare de prevenire a aderenței bacteriene la suprafața implantului și formarea de biofilme microbiene. În acest mod se poate obține o concentrație mare de medicament la locul potrivit, care reduce în cele din urmă

durata totală a tratamentului cu antibiotice. Medicamentele pot fi încărcate pe suprafața biomaterialului prin imobilizare chimică (Li, 2024) sau prin aplicarea de acoperiri pasive (Manasa, 2022) care inhibă aderența bacteriană.

Au fost astfel raportate până acum impregnarea directă cu antibiotice și imobilizarea agentului antimicrobian într-o matrice capabilă să se lege la o varietate de suprafețe, precum și fabricarea de acoperiri metalice active antimicrobiene sau nanoparticule încorporate (Cu, Ag) (Guan, 2024; Maddheshiya, 2024).

Eficiența filmelor de poli(stiren-co-metil metacrilat) dopate cu rifampicină, doxiciclină și claritromicină a fost dovedită împotriva formării biofilmului de către tulpinile de *S. aureus* sensibile la meticilină și rezistente la meticilină (Zhao, 2024; Hu, 2022). De menționat că doxiciclina (α -6-deoxi-5-oxitetraclina) este un agent bacteriostatic cu spectru mare, care inhibă sinteza proteinelor, prin blocarea legării aminoacil-ARNt de situsul acceptor ribozomal (Iqbal, 2021).

În studiile noastre anterioare, au fost investigate sinteza filmelor subțiri din biosticlă prin evaporare laser pulsată asistată de matrice (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation - MAPLE) (Flores, 2017) și depunere cu laser pulsată (Pulsed Laser Deposition) a filmelor compozite care conțin polimeri pentru eliberarea controlată a medicamentelor (Negut, 2020).

Lucrarea de față explorează potențialul de aplicare a metodei MAPLE pentru a realiza acoperiri bioactive ale implanturilor, care conțin doxiciclină încorporată într-un sistem sticlă bioactivă - polimer, care să asigure livrarea locală a medicamentelor pentru prevenirea și tratarea infecțiilor asociate implantului.

Materiale și Metode

Plăci din oțel inoxidabil de calitate medicală tip 316L (notat în continuare SS) au fost utilizate ca substraturi pentru depunerea filmelor. Ele conțin 64,26% Fe, 18,51% Cr, 12% Ni, 2,13% Mo, 1,44% Mn, 0,58% Cu, 0,56% Si, 0,0265%

C, 0,0036% S și alte elemente în concentrație mai mică. Au fost investigate plăci din SS simple, dar și acoperite cu nanostructuri care conțin sticlă bioactivă (BG), polimer și antibiotic, pentru determinarea parametrilor fizici și chimici și au fost supuse apoi analizelor biologice.

Înainte de depunere, plăcile SS, cu suprafața de $(1 \times 1) \text{ cm}^2$, au fost prelucrate mecanic, prin lustruire la o rugozitate micrometrică ($R_q = 2\text{--}4 \mu\text{m}$), curățate cu acetonă, etanol și apă deionizată, într-o baie cu ultrasunete X-Tra 30H. O morfologie adecvată a suprafeței asigură o bună aderență celulară și o creștere a osului, în timp ce o rugozitate adecvată asigură o interacțiune os-implant îmbunătățită pe termen lung.

BG aparține sistemului $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$ și prezintă proprietăți de bioactivitate și biocompatibilitate foarte bune. Conține 56,5% SiO_2 , 11% Na_2O , 3% K_2O , 15% CaO , 8,5% MgO , 6% P_2O_5 și a fost fabricată conform unui protocol descris în Refs. (Dimitriadis, 2020).

Poli(metacrilatul de metil) (PMMA) este un polimer inert care prezintă o bună biocompatibilitate cu țesutul uman, capabil să protejeze implantul metalic împotriva proceselor de degradare (Rouein, 2022).

Ca și antibiotic, am selectat pentru acest studiu Doxycyclina (Doxy), un antibiotic aparținând grupului tetraciclinei. Se știe că Doxy este stabil la temperatura corpului și solubil în apă, capabil să asigure difuzia din purtător, este activ împotriva celor mai comuni patogeni bacterieni implicați în infecțiile osoase și ale țesuturilor moi și este eliberat local la concentrații de până la zece ori concentrația inhibitorie minimă pentru agenții patogeni în cauză. Capsulele Doxy utilizate în experimentele noastre au fost disponibile comercial și au conținut 100 mg hiclat fiecare.

O matrice constând într-o soluție de 0,6g PMMA dizolvat în 19,3mL cloroform cu adăugarea a 0,08g BG și 0,11g Doxy hiclat a fost utilizată ca țintă înghețată în depunerea MAPLE, conform unui protocol descris în Ref. (Negut, 2020). Metoda MAPLE este utilizată în cazul polimerilor și substanțelor delicate deoarece reproduce cu fidelitate proprietățile și funcționalitatea materiilor prime, fără descompunere fotochimică și deteriorare sub acțiunea directă a impulsurilor laser UV intense. Toate experimentele au fost efectuate folosind o

sursă laser excimer KrF^* ($\lambda=248 \text{ nm}$, $\tau_{\text{FWHM}} \leq 25 \text{ ns}$) care a operat la o fluentă de $0,55 \text{ J/cm}^2$ și o rată de repetiție de 5 Hz. Pentru creșterea unui film subțire au fost aplicate 5.000 de impulsuri laser ulterioare. Pentru a obține un strat uniform și pentru a evita perforarea, ținta și substratul au fost rotite continuu cu 50 rpm, în timp ce presiunea din interiorul camerei de depunere a fost stabilită la $2 \times 10^{-2} \text{ mbar}$. În timpul depunerii, ținta a fost menținută la temperatura azotului lichid.

Caracterizarea fizico-chimică a straturilor subțiri depuse se face apoi prin metode specifice, complementare.

Caracterizarea morfologică a fost efectuată prin microscopie electronică cu scanare (SEM) utilizând un microscop electronic Philips XL30, care funcționează la tensiuni de accelerație de 20 kV, în vid înalt, în regim de electroni secundari.

Grosimea acoperirii și topografia au fost monitorizate și estimate prin profilometrie, folosind un Stylus profiler XP2 de la Ambios Technology, la viteza de 0,01 mm/sec, distanță de lucru de 1 mm pentru măsurarea grosimii și distanță de lucru de 5 mm pentru măsurarea rugozității. Pentru statistici, am efectuat măsurători pe trei probe identice.

Compoziția chimică a fost stabilită în urma studiilor de spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (EDS), care au fost efectuate pe toate specițiile folosind un detector SiLi (model EDAX Inc.) operat la 20 kV, în trei exemplare, pe suprafețe relativ mari de $(250 \times 250) \mu\text{m}^2$.

Structura chimică a acoperirilor a fost investigată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Spectrele FTIR au fost achiziționate în modul de absorbantă, cu un FTIR-8400S (Shimadzu Corp, Kyoto, Japonia), care funcționează în intervalul $7800\text{--}350 \text{ cm}^{-1}$, cu rezoluție spectrală de $0,4 \text{ cm}^{-1}$ și raport S/N 20000:1.

Pentru evaluarea cantității de antibiotic eliberat s-a folosit spectroscopia de absorbție UV-VIS. Cu ajutorul unui spectrofotometru GBC Cintra10e UV-VIS-NIR (190-1200)nm s-a analizat fluidul uman simulat (SBF) în care au fost imersate mostrele. SBF are o compoziție ionică aproape identică cu cea a plasmii sanguine și se prepară după formula lui Kokubo (Fernandes, 2021), prin amestecarea reactivilor corespunzători (Tabelul 1).

Ioni	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Concentrația în SBF	142	5	1,5	2,5	147,8	1	0,5	4,2
Concentrația în sânge	142	5	1,5	2,5	103	1	0,5	27

Tabelul 1 Concentrațiile ionice ale SBF față de sângele plasmatic

Două plăci de control, de SS neacoperit și SS acoperit cu film subțire BG-PMMA-Doxy au fost scufundate în 25mL de SBF, în recipiente sterile din polietilenă, au fost ținute la o temperatură de 37°C folosind un incubator microbiologic Binder și suprafața lor a fost investigată după diferiți timpi de imersie prin FTIR. Toate măsurătorile au fost efectuate în trei exemplare, în conformitate cu standardul ISO/FDIS 23317:2007(E).

Rezistența la coroziune în SBF a probelor utilizate ca acoperiri pentru implanturi sau proteze a fost evaluată prin metode electrochimice datorită sensibilității lor ridicate, cu un Autolab PGSTAT 100Eco Chimie controlat de software-ul Nova, într-o configurație cu trei electrozi cu electrod de referință Ag/AgCl și fir de platină ca și contra-electrod. Influența fluidelor fiziologice asupra substraturilor goale SS și BG-PMMA-Doxy/SS a fost studiată prin voltametrie liniară de baleiaj (LSV), care poate caracteriza mecanismele de coroziune și poate prezice ratele de coroziune. Există o relație liniară între vitezele de dizolvare sau coroziune a metalului și curentul de coroziune, prin urmare aceștia sunt parametri importanți care pot fi găsiți prin LSV. Graficele au fost înregistrate între -1,50 V și -0,25 V cu o rată de scanare de 0,1 V/s. Măsurătorile au fost efectuate pentru trei probe din fiecare tip studiat, pentru a obține rezultate fiabile. Au fost deduse valorile medii ale parametrilor de coroziune: potențialul de coroziune (E_{corr}) și curentul de coroziune (i_{corr}).

Biocompatibilitatea filmelor obținute depuse pe substraturi SS a fost evaluată *in vitro* pe celule de osteosarcom uman (MG63, ATCC® CRL-1427™), prin investigarea morfologiei și ciclului celular al celulelor care cresc pe aceste filme. Pentru evaluarea microscopică a morfologiei celulare, speciamentele acoperite cu filme subțiri au fost plasate în plăci cu 24 de godeuri, expunând suprafața probei acoperite. 5x10⁵ celule MG63 au fost adăugate în Mediul Eagle Modificat Dulbecco (DMEM) suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% aminoacizi esențiali. Plăcile au fost menținute timp de 24 de ore la 37°C în 5% CO₂. După 24 de ore, probele au fost colorate cu iodură de propidiu (PI), vizualizate imediat în fluo-

rescență cu microscopul Leica DFC450C și fotografiate.

Pentru analiza ciclului celular, celulele MG63 au fost cultivate în mediu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, New York, SUA) suplimentat cu ser bovin inactivat termic 10% și penicilină/streptomicina și incubate la 37°C în 5% CO₂ timp de 24 ore. Apoi, monostraturile au fost recoltate, spălate cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), fixate în etanol rece 70% și incubate peste noapte la -20°C. Fiecare probă a fost spălată în PBS, tratată cu 100 μg/mL RN-ază A timp de 15 minute, colorată cu 10 μg/mL PI prin incubare la 3°C timp de 1 oră. Apoi, achiziția evenimentelor a fost efectuată cu un citometru în flux Epics Beckman Coulter. Datele obținute au fost analizate folosind software-ul FlowJo și exprimate ca fracții de celule în diferite faze ale ciclului celular.

Activitatea anti-biofilm a probelor obținute a fost investigată folosind tulpini de *S. aureus* ATCC 6538 și *E. coli* ATCC 8739. Probele testate au fost sterilizate prin expunere la UV timp de 30 de minute. După sterilizare UV, o cantitate de 20μl de suspensie microbiană de densitate 0,5 McFarland, preparată din culturi proaspete dezvoltate pe agar de soia triptică (TSA), a fost distribuită pe suprafața tratată a probelor și incubată la 37°C, în atmosferă umedă, timp de 5min., 1 h, 2 h și 24 h. După fiecare perioadă de incubare, probele au fost suspendate în 5 mL de soluție salină sterilă și agitate puternic pentru a resuspenda bacteriile aderente. Apoi s-au efectuat diluții în serie de zece ori din suspensia recuperată și numerele de celule viabile au fost determinate și exprimate ca unități formatoare de colonii (CFU)/ml.

Rezultate

Morfologia suprafeței acoperirilor BG-PMMA-Doxy, înainte și după imersarea lor timp de 80 de zile în SBF, este ilustrată în Fig. 1. Filmele constau dintr-o matrice destul de netedă, densă și omogenă, pe care au fost crescute particule sferoidale izolate și îmbinate cu o distribuție neregulată. Particulele prezente pe suprafață au dimensiuni de ordin micrometric și sunt împrăștiate arbitrar.

Măsurătorile grosimii au indicat valori medii de ~ 500 nm pentru filmul subțire inițial și ~ 800 nm după 80 de zile de imersie în SBF (Fig. 2). Valorile medii ale rugozității suprafeței pentru filmele subțiri inițiale au fost: $R_a = 322 \pm 9$ nm și $R_q = 449 \pm 6,5$ nm, iar după imersarea în SBF au devenit: $R_a = 329 \pm 22$ nm și $R_q = 433 \pm 30,43$ nm.

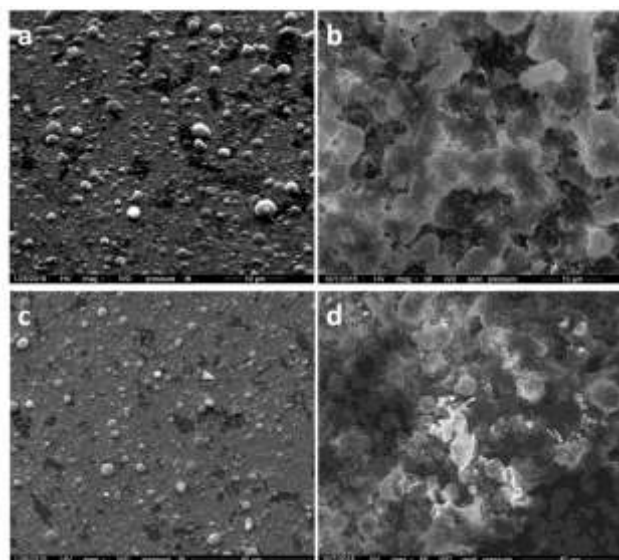


Fig 1. Imagini SEM ale BG-PMMA-Doxy înainte de imersie (a, b) și după 80 de zile de imersie, în SBF (c, d); Imaginile (b și d) sunt detalii pentru (a și, respectiv, c).

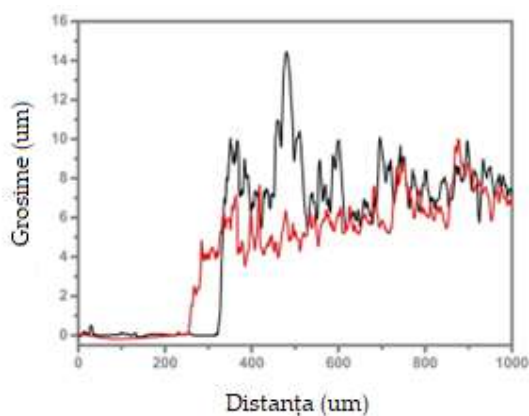


Fig 2. Profilul filmelor inițiale și imersate 80 de zile în SBF.

Rezultatele EDS înregistrate pe BG-PMMA-Doxy după 80 de zile de imersie în SBF arată un raport atomic Ca/P de aproximativ 1,60, în bună conformitate cu Ref. (Copete, 2024), care raportează valori Ca/P în intervalul 1,38-1,93 pentru apatita biologică. Este de menționat că BG-PMMA s-a transformat complet în apatita biologică după 42 de zile de imersie în SBF.

Eliberarea de antibiotic, monitorizată prin FTIR și UV-VIS a dat rezultatele prezentate în continuare.

Spectrele FTIR ale filmelor, proaspăt preparate și după 20 și 80 de zile de imersie în SBF, sunt prezentate în Fig. 3. Spectrul filmului inițial BG-PMMA-Doxy/SS (curba roșie în Fig. 3) are două vârfuri, la 1008 și 982 cm^{-1} , care aparțin structurii BG. Vârfurile de la 1732, 1244 și 1151 cm^{-1} sunt atribuite PMMA-ului (Smith, 2023), în timp ce vârfurile de la 1456, 1275 și 765 cm^{-1} sunt reprezentative pentru Doxy (Farkas, 2022). După 20 și 80 de zile de scufundare în SBF, se pot observa modificări semnificative în spectrul FTIR: o amplitudine mai mică a tuturor vârfurilor în comparație cu cea inițială (curbe albastre și respectiv verzi, în Fig. 3) împreună cu apariția unor noi vârfuri, la 1648, 1045 și 675 cm^{-1} . Aceste vârfuri aparțin hidroxiapatitei carbonatate (CHA), care este similară cu componenta principală a osului (Copete, 2024).

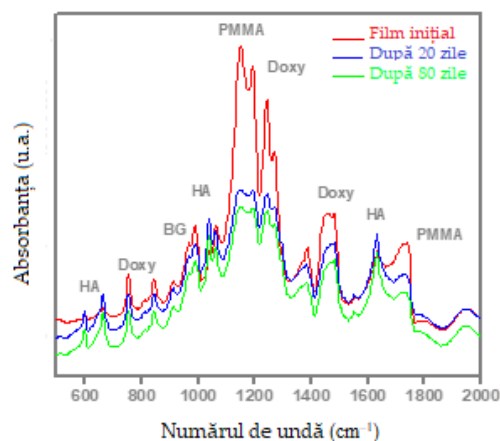


Fig. 3. Spectrele FTIR ale probei inițiale și după 20 și 80 de zile de imersie în SBF.

Astfel, pelicula interacționează cu SBF și apar atât modificări chimice, cât și structurale, indicând descompunerea BG, care cel mai probabil favorizează eliberarea de Doxy în fluidul înconjurător. *In vivo*, se așteaptă ca acest proces să permită livrarea medicamentului chiar la locul implantării și să prevină infecțiile asociate implantului, prin reducerea densității microbilor și a aderenței acestora la suprafața implantului.

SBF care a găzduit probele a fost investigat într-un experiment complementar prin spectroscopie UV-VIS (Fig. 4). Eliberarea de Doxy din compozit în SBF a fost detectată prin măsurarea absorbantei la o lungime de undă de 1172 nm, unde absorbanta Doxy arată un maxim.

Fig. 4 prezintă dinamica eliberării Doxy în SBF. O eliberare rapidă a antibioticului poate fi observată în primele 8 ore după imersia probelor

în SBF, până la atingerea eliberării maxime de Doxy. Apoi, are loc o etapă de eliberare mai lentă, 12% din cantitatea maximă fiind eliberată după 2 zile de imersiune. Din acest moment, procesul devine aproape staționar, la un nivel de aproximativ 20%. După 50 de zile, Doxy este încă eliberat din filme, confirmând ipoteza noastră că nanostructura BG-PMMA-Doxy asigură o eliberare prelungită a medicamentului.

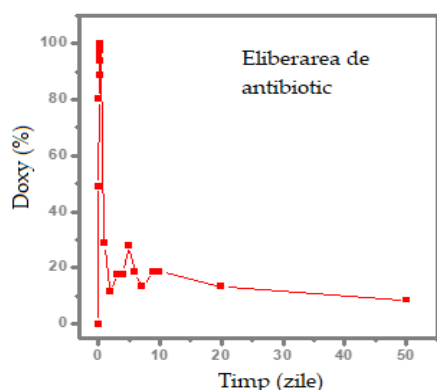


Fig 4. Eliberarea Doxy în SBF.

Această evoluție este dovada dizolvării treptate a BG în SBF, proces care controlează eliberarea moleculelor de antibiotic din matrice. În același timp, ea susține o eficiență ridicată a tratamentului local față de cel oral, ca urmare a depozitării prelungite a medicamentului în structura depusă.

În cadrul măsurătorilor de polarizare electrochimică, un set de șase mostre de SS neacoperite (3 exemplare) și acoperite cu filme BG-PMMA-Doxy (3 exemplare) au fost scufundate în 25 mL SBF, în recipiente sterile din polietilenă, la temperatura camerei, și investigate după 0, 7, 14, 21 și 28 de zile.

Analiza LSV inițială arată o rezistență mai bună la coroziune a stratului de nanocompozit pe SS în comparație cu SS neacoperit, caracterizată printr-un curent de coroziune mai mic și un potențial de coroziune mai mare (vezi Tabelul 2).

După 14 și 28 de zile de scufundare în SBF, parametrii măsurați suferă modificări semnificative, adică crește curentul de coroziune și scade potențialul de coroziune. Acest lucru este dovada coroziunii SS în fluidele umane. În același interval de timp, probele de SS acoperite cu filme subțiri de BG-PMMA-Doxy asigură un comportament de protecție a metalului împotriva coroziunii. Parametrii de coroziune se mențin aproape neschimbați față de valorile inițiale și

sunt foarte diferiți în comparație cu probele de SS neacoperit (vezi Tabelul 2).

Proba	Timpul de imersiune (zile)	i_{corr} ($\mu A/cm^2$)	E_{corr} (mV)
SS	0	15,38	-625,45
	14	18,22	-773,91
	28	25,14	-997,38
BG-PMMA-Doxy	0	6,21	-389,02
	14	7,15	-425,18
	28	6,96	-420,03

Tabelul 2 Parametrii de coroziune după diferiți timpi de imersiune

În cadrul testelor de biocompatibilitate *in vitro*, am observat că morfologia și creșterea celulelor MG63 pe filmele subțiri obținute nu au fost afectate, în cazul probei de control (Fig. 5). Rezultatele microscopice au fost interpretate în conformitate cu recomandările ISO 10993-5:2009(E); Partea 5. *Evaluarea biologică a dispozitivelor medicale*. Examinarea nu a evidențiat nicio modificare a morfologiei celulare care ar putea indica celule moarte, cum ar fi celule rotunde, contractate, dovadă a faptului că filmele studiate nu sunt citotoxice.

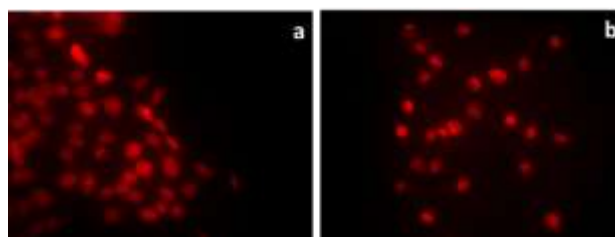


Fig 5. Imagini de microscopie cu fluorescență ale celulelor MG63 crescute pe film subțire de BG-PMMA-Doxy/SS (a) și (b) pe control, timp de 24 de ore (mărire x200).

Analiza microscopică a fost confirmată de testul citometriei în flux a ciclului celular, neavând modificări în distribuția fazelor de creștere (Fig. 6).

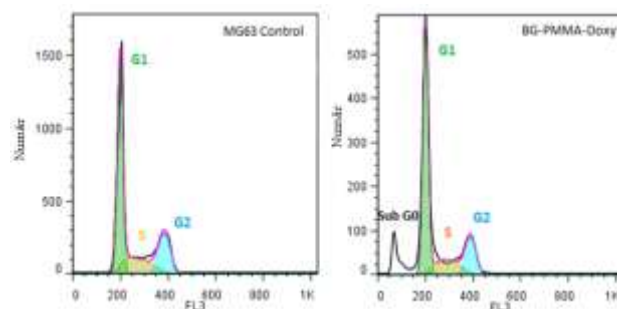


Fig 6. Diagrame de citometrie în flux ale ciclului celular al celulelor MG63 crescute pe filme subțiri BG-PMMA-Doxy.

Activitatea anti-biofilm a filmelor subțiri sintetizate.

Pentru a evalua atât eliberarea rapidă inițială a antibioticului în formă activă, cât și durata acțiunii de protecție a antibioticului, am analizat activitatea antimicrobiană într-un interval temporal variind de la 5 minute la 24 de ore. Probele testate au inhibat creșterea microbiană după 5 minute de contact cu suprafața respectivă. Scăderea numărului de celule viabile este mai mare de pentru *E. coli* și mai mică pentru *S. aureus*. Aceasta demonstrează instalarea rapidă a efectului bacteriostatic al antibioticului, care oprește înmulțirea bacteriilor viabile prezente în inoculul inițial.

În cazul *E. coli*, creșterea microbiană a fost inhibată pe toată durata experimentului, în timp ce în cazul *S. aureus*, scăderea ușoară inițială a numărului de celule viabile observată după 5 minute de contact, a fost urmată de una mai semnificativă după 1 oră de contact, urmată de o ușoară creștere după 2 ore și de o creștere exponențială până la 24 de ore (Fig. 7).

Cu toate acestea, în ambele modele experimentale, densitatea celulară rămâne sub pragul de 10^6 CFU/mL, care este considerată doza minimă de infectare pentru aceste bacterii (Wang, 2021). Sub această limită, mecanismele de apărare antiinfecțioasă a gazdei ar putea fi eficiente în eliminarea bacteriilor colonizatoare, înainte de inițierea unui proces infecțios (Mathew, 2022).

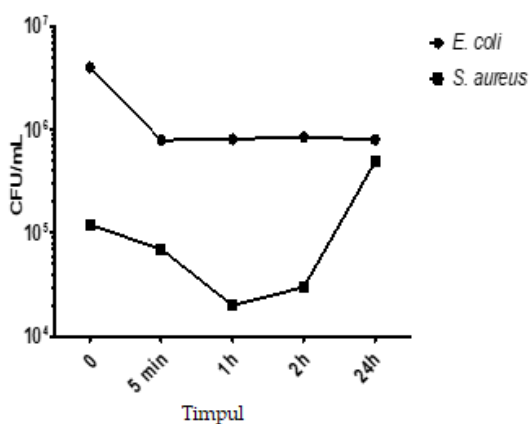


Fig 7. Dinamica creșterii microbiene pe filmele subțiri BG-PMMA-Doxy.

Discuții

Particulele sferoidale vizibile pe partea superioară a filmelor depuse sunt caracteristice proceselor de depunere cu ajutorul laserului și s-au dovedit benefice pentru adeziunea și creșterea celulelor vii.

Parametrii de rugozitate ai suprafeței, R_a și R_q , au fost găsiți destul de similari pentru filmul subțire inițial și pentru cel de după 80 de zile de imersie în SBF. Grosimea mai mare a filmului final se datorează, în opinia noastră, sintezei de CHA pe partea superioară a suprafeței, împreună cu eliberarea de Doxy.

Picurile aparținând fie PMMA, fie Doxy au fost identificate în spectrele FTIR. După scufundarea în SBF, amplitudinea acestor vârfuri este în scădere și apar noi vârfuri, aparținând CHA. Această conversie este însoțită de eliberarea controlată de Doxy în SBF, care inhibă dezvoltarea biofilmelor microbiene. Eliberarea Doxy este maximă după 8 ore, dar se menține încă semnificativă după 50 de zile, ceea ce confirmă rolul de rezervor de medicament al filmelor de acoperire compozite.

După cum se știe, un material are o rezistență mai bună la coroziune ori de câte ori prezintă un curent mai scăzut și un potențial mai mare de coroziune. Analizele LSV permit compararea comportamentului în contact cu fluidele umane al probelor SS goale și celor acoperite cu film subțire de nanocompozit BG-PMMA-Doxy. S-a dovedit că un comportament mult mai potrivit pentru aplicațiile medicale îl au probele acoperite, care fac față la acțiunea foarte corozivă a fluidelor umane.

Lipsa celulelor MG63 moarte, fără morfologie modificată, a dovedit absența citotoxicității filmelor studiate.

Pe de altă parte, dinamica creșterii microbiene a fost diferită pentru cele două tulpini testate: *S. aureus* și *E. coli*. Această diferență poate fi explicată prin variația timpului de generare și a afinităților dintre antibiotic și ținta moleculară în cele două modele experimentale. S-a sugerat că, în prezența anumitor factori de limitare a creșterii, cum ar fi stresul osmotic, bacteriile Gram-negative se adaptează mai lent în comparație cu cele Gram-pozitive, așa cum arată timpul relativ de întârziere și, prin urmare, timpul necesar bacteriilor pentru a se adapta la condiții noi de mediu este diferit.

În consecință, adaptarea rapidă a *S. aureus* la mediul care conține antibiotic, favorizează înmulțirea și consumul mai rapid a antibioticului, explicând creșterea densității *S. aureus* după 2 ore de incubație.

Aceste rezultate demonstrează că filmele subțiri depuse pe implanturile de oțel inox sunt rezistente la colonizarea microbiană și pot fi la originea unei întârzieri semnificative în inițierea și dezvoltarea ulterioară a biofilmului microbian.

Concluzii

Filmele subțiri de compozit BG-PMMA-Doxy sunt depuse pe substraturi din oțel inoxidabil 316L prin tehnica MAPLE. Când sunt în contact cu fluidele corporale, filmele demonstrează capacitatea de a stimula creșterea hidroxiapatitei biologice pe suprafața lor, ceea ce validează bioactivitatea filmului.

Dizolvarea BG în fluidele corpului uman este însoțită de o eliberare prelungită de molecule active de medicament, o circumstanță ideală pentru prevenirea infecțiilor locale.

Atât straturile de polimer, cât și cele de apatită care cresc pe suprafața implantului, la patru săptămâni după introducerea probelor în fluidul corporal simulat, asigură o bună protecție împotriva degradării și eliberării ionilor metalici nocivi (Cr, Ni, Cu) din implant în corp.

Structurile imprimate sunt foarte biocompatibile și rezistente la colonizarea microbiană și induc o întârziere semnificativă în inițierea biofilmului microbian și dezvoltarea lui ulterioară.

Bibliografie

- [1] Copete H, López E, Baudin C, Synthesis and characterization of B-type carbonated hydroxyapatite materials: Effect of carbonate content on mechanical strength and in vitro degradation, *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2024, 63(4): 255-267.
- [2] Dimitriadis K, Moschovas D, Tulyaganov D, Agathopoulos S, Development of novel bioactive glass-ceramics in the Na₂O/K₂O-CaO-MgO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ system, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2020, 533: 119936.
- [3] Farkas N, Marinceș L, Barabás R, et al., Preparation and Characterization of Doxycycline-Loaded Electrospun PLA/HAP Nanofibers as a Drug Delivery System, *Materials (Basel)*, 2022, 15(6): 2105-2121.
- [4] Fernandes M, Silva L, Nilo Mendes P, et al. degradation kinetics model of Mg-Zn-Mn-Ca alloys in Kokubo solution, *Journal of Materials Research and Technology*, 2021, 11: 887-895.
- [5] Floroian L, Ristoscu C, Candiani G, et al, Antimicrobial thin films based on ayurvedic plants extracts embedded in a bioactive glass matrix, *Applied Surface Science*, 2017, 417: 224-233.
- [6] Guan J, Wang J, Jia F, et al., Layer-by-layer self-assembly coatings on strontium titanate nanotubes with antimicrobial and anti-inflammatory properties to prevent implant-related infections, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2024, 244: 114183.
- [7] Haq I, Khan T, Krukiewicz K, Etiology, pathology, and host-impaired immunity in medical implant-associated infections, *Journal of Infection and Public Health*, 2024, 17: 189-203.
- [8] Haq I, Krukiewicz K, Antimicrobial approaches for medical implants coating to prevent implants associated infections: Insights to develop durable antimicrobial implants, *Applied Surface Science Advances*, 2023, 18: 100532.
- [9] Hu X, Zhang H, Wang Y, et al., Synergistic antibacterial strategy based on photodynamic therapy: Progress and perspectives, *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450: 138129.
- [10] Iqbal D, Ehtisham-ul-Haque S, Ahmad S, et al., Enhanced antibacterial activity of chitosan, guar gum and polyvinyl alcohol blend matrix loaded with amoxicillin and doxycycline hyclate drugs, *Arabian Journal of Chemistry*, 2021, 14: 103156.
- [11] Kadirvelu L, Sivaramalingam S, Jothivel D, et al, A review on antimicrobial strategies in mitigating biofilm-associated infections on medical implants, *Current Research in Microbial Sciences*, 2024, 6: 100231.
- [12] Kravanja K, Finšgar M, A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients, *Materials & Design*, 2022, 217: 110653.
- [13] Li R, Lu R, Yang L, et al, Immobilization of chitosan nano-hydroxyapatite alendronate composite microspheres on polyetheretherketone surface to enhance osseointegration by inhibiting osteoclastogenesis and promoting osteogenesis, *Chinese Chemical Letters*, 2024, 110242.
- [14] Lin Z, Jiang Z, Jia S, Ding X, Analysis of risk factors related to early implant failure: A retrospective study, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2024, 3913.
- [15] Macias-Valcayo A, Aguilera-Correa J, Broncano A, et al, Comparative In Vitro Study of Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility in Gram-Negative Bacilli Isolated from Prosthetic Joint Infections, *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0085122.
- [16] Maddheshiya S, Nara S, Chapter 5 - Nano-based antimicrobial coating strategies over the

- medical device and implants, In Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Next-Generation Antimicrobial Nanocoatings for Medical Devices and Implants, Woodhead Publishing, Solanki P, Mohanan V eds., 2024, 79-99.
- [17] Manasa C, Silva S, Caballero-Aguilar L, et al., Active and passive drug release by self-assembled lubricin (PRG4) anti-fouling coatings, *Journal of Controlled Release*, 2022, 352: 35-46.
- [18] Mathew E, Stewart S, Utomo E, et al., Implantable and long-lasting drug delivery systems for infectious, inflammatory, endocrine, and neurodegenerative diseases, In Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Long-Acting Drug Delivery Systems, Woodhead Publishing, Larrañeta E, Singh T, Donnelly R eds, 2022, 223-248.
- [19] Negut I, Floroian L, Ristoscu C, et al. Functional bioglass—biopolymer double nanostructure for natural antimicrobial drug extracts delivery, *Nanomaterials*, 2020, 10(2): 385-403.
- [20] Rouein Z, Jafari H, Pishbin F, et al., In vitro bioactivity and biocompatibility of magnesium implants coated with poly(methyl methacrylate) - bioactive glass composite, *Materials Today Communications*, 2022, 33: 104872.
- [21] Smith BC, *Infrared Spectroscopy of Polymers X: Polyacrylates*, *Spectroscopy*, 2023, 38: 10–14.
- [22] Wang Y, Teng W, Zhang Z, et al., A trilogy antimicrobial strategy for multiple infections of orthopedic implants throughout their life cycle, *Bioactive Materials*, 2021, 6: 1853-1866.
- [23] Zhao J, Chen L, Ma A, et al., Recent advances in coaxial electrospun nanofibers for wound healing, *Materials Today Bio*, 2024, 29: 101309.
- [24] Zhao R, Du B, Luo Y, et al., Antimicrobial and anti-biofilm activity of a thiazolidinone derivative against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo, *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(3): e0232723.

Contribuția autorilor: conceptualizare LF; designul cercetării: LF, validarea metodologiei: LF; culegerea datelor: LF, analiza datelor și / sau interpretarea datelor: LF; scriere-pregătirea textului inițial LF, revizuire și editare: LF

Surse de finanțare: Această cercetare a fost susținută de granturi ale Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică și Inovare, CNCS/CCCDI - UEFISCDI, număr PN-III-P2-2.1-PED-2020-0489 și PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0871 și de Uniunea Europeană, prin proiectul de fonduri structurale PRO-DD (POS-CCE, O.2.2.1., ID 123, SMIS 2637, ctr. Nr. 11/2009)

Conflicte de interes: autorul nu are conflicte de interes relevante pentru acest articol