

ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЛАЗМЕННОГО ПОКРЫТИЯ ПОЛИУРЕТАНА НА РОСТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛЕНОК

© 2019 г. И.А. Морозов*, А.С. Каменецких**, А.Ю. Беляев*, М.Г. Щербань***, Л.М. Лемкина****, Д.В. Ерошенко*****, В.П. Коробов*****

*Институт механики сплошных сред УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 1

**Институт электрофизики УрО РАН, 620016, Екатеринбург, ул. Амундсена, 106

***Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

****Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

*****Институт технической химии УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 3

E-mail: ilya.morozov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2019 г.

После доработки 05.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Одним из возможных материалов для создания биомедицинских изделий являются эластичные полиуретаны. Плазменная обработка является перспективным методом модификации тех или иных свойств их поверхности. Однако деформационные повреждения модифицированного слоя упругой подложки могут привести к различным нежелательным последствиям. В работе исследованы два отличающихся жесткостью упругих полиуретана. Материалы обрабатывали плазменной имплантацией ионов азота (энергия 1 и 3 кэВ). Показано, что в результате обработки изменяются рельеф и гидрофобность поверхности, что ведет к снижению адгезии как грамположительных (стафилококк), так и грамотрицательных (кишечная палочка) бактерий. Циклическая одноосная деформация является причиной образования на обработанных поверхностях поперечных трещин и продольных складок. Такие изменения провоцируют рост бактерий до величин, превышающих их количество на необработанных материалах. Все изменения поверхности (влияние обработки, повреждение) имеют корреляцию как со свойствами исходной подложки, так и режимом обработки. Основным фактором, повлиявшим на бактериальную адгезию явились изменения структуры рельефа.

Ключевые слова: полиуретаны, плазма, медицинские полимеры, деформация, бактерии.

DOI: 10.1134/S000630291903013X

Модификация поверхности жестких материалов (металлы, керамика, пластмассы) плазменными методами позволяет достичь, в зависимости от поставленных целей, существенных изменений свойств необработанной поверхности: повышение износостойкости, твердости, сопротивления коррозии, изменение смачиваемости и адгезии с определенными материалами, улучшение биомедицинских характеристик. Данным проблемам посвящено огромное количество прикладных и фундаментальных работ. Ведутся исследования и мягких полимеров [1–3]. Однако в этом случае преимущества покрытия оказываются не столь очевидными, так как внешняя деформация может привести к повреждению покрытия [4,5].

Среди полимеров широкое применение в различных отраслях нашли полиуретаны благодаря

широкому диапазону их термомеханических свойств — от твердых пластиков до мягких эластомеров. В частности, полиуретановые эластомеры используются в биомедицинских целях для изготовления грудных имплантов [6], межфаланговых протезов [7], катетеров [8].

Плазменная обработка существенно образом изменяет физико-химические и механические свойства поверхности полимеров, а также их шероховатость [9]. Особенностью плазменной обработки мягких материалов является формирование выраженной складчатой текстуры рельефа [10,11]. Эти изменения связаны с внутренними напряжениями, возникающими в модифицированном слое, жесткость которого превышает жесткость подложки [12].

Уникальные свойства обработанных плазмой поверхностей могут быть использованы для создания биомедицинских изделий с улучшенными антибактериальными свойствами. Различные виды бактерий способны присоединяться и размножаться на биомедицинских полимерах, что приводит к серьезным внутрибольничным инфекциям [13,14]. Считается, что на адгезию бактерий к любой поверхности влияют как топография, так и физико-химические свойства поверхности материала. Например, неровности материала в пределах размеров бактериальной клетки обычно способствуют бактериальной адгезии и образованию биопленок [15]. Однако известно, что и снижение шероховатости может приводить к аналогичному увеличению числа сорбированных клеток [16]. Повышение гидрофобности поверхности обычно связано с повышением бактериальной адгезии [17,18]: показано, что гидрофильные материалы более устойчивы к бактериальной колонизации по сравнению с гидрофобными [19, 20].

Плазменная обработка мягкого полимера влияет как на смачиваемость, так и на текстуру рельефа. Кроме этого, в условиях реальной эксплуатации данные материалы подвергаются различного вида нагрузкам, что неизбежно ведет к изменению рельефа, его повреждению. Все эти факторы неоднозначным образом сказываются на адгезии биопленок. В настоящей работе исследовано влияние обработки поверхности эластичного полиуретана плазменной иммерсионной имплантацией ионов азота на адгезию бактерий (стафилококка и кишечной палочки). Обработанные поверхности подвергали одноосному циклическому нагружению, после чего проводили повторное исследование роста бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление материалов. В работе исследовали две полиуретановые композиции (ПУ1 и ПУ2), изготовленные из готовых преполимера и сшивающего агента согласно предписаниям поставщика (ООО «Эластопласт», Пермь, Россия) в соотношении 100:34 (ПУ1) и 100:46 (ПУ2). Преполимер – форполимер уретановый на основе простого полиэфира; сшивающий агент – отвердитель (3,3'-дихлор-4,4'-диаминодифенилметан – МОКА) и пластификатор (полифурит). Компоненты вакуумировали и смешивали при температуре 80°C. Смеси заливали в формы, оставляя верхнюю поверхность свободной, и отверждали в термошкафу (20 ч при температуре 100°C). Толщина полученных пластин – 2 мм, твердость по Шору – 80 и 65, начальный

модуль упругости – 30 и 20 МПа, разрывная деформация – 800 и 1000% для ПУ1 и ПУ2 соответственно.

Плазменная обработка. Образцы обрабатывали плазменной иммерсионной имплантацией ионов азота N_2^+ . Для генерации плазмы в вакуумной камере применяли источник электронов с плазменным катодом на основе тлеющего разряда. Рабочее давление газа – 0,2 Па. Электроны ускорялись до энергии 10 – 20 эВ в области сетки плазменного катода. Электрически изолированный держатель образцов, охлаждаемый проточной водой до температуры 20°C, находился внутри вакуумной камеры на расстоянии 150 мм от сетки источника электронов. Образцы размещали внутри держателя и закрывали металлической сеткой с шагом между натянутыми нитями 10 мм. На держатель подавали напряжение U величиной 1 или 3 кэВ. Ионы извлекались из плазмы и ускорялись в слое катодного падения потенциала вблизи поверхности сетки. Режимы обработки определяли из условия поддержания температуры образцов не выше 50°C. Накопленная доза ионов составила $2 \cdot 10^{16}$ ионов/см². Оценочная толщина полученных покрытий – 25 и 42 нм [11] для $U = 1$ или 3 кэВ соответственно.

Механические испытания. Обработанные плазмой образцы в форме лопаток (размеры рабочей части 25 × 4 мм) подвергали циклической одноосной деформации (испытательная машина Testometric, Великобритания): 10 циклов нагрузки-разгрузки до деформации 50%, скорость деформации 50%/мин.

Смачиваемость. Гидрофильность поверхностей оценивали по краевым углам смачивания дистиллированной водой. Измерения проводили на гониометре DSA-4 (KRÜSS GmbH, Германия) методом лежащей капли. Известно, что эффект от плазменной обработки поверхности с течением времени асимптотически снижается [2,21]. В нашем случае краевые углы измеряли параллельно с исследованием биопленок спустя семь суток после плазменной обработки.

Изучение процесса образования биопленок. Необработанные и обработанные плазмой образцы, в том числе после механических испытаний, стерилизовали ультрафиолетовым облучением в аппарате «Микроцид» (ООО «Электронная медицина», Москва, Россия) по 20 мин с каждой стороны и помещали в стерильные луночные планшеты, в которые вносили по 2 мл посевного материала бактерий *Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165 и *Escherichia coli* ATCC 25992, содержащих 10^7 КоЕ/мл.

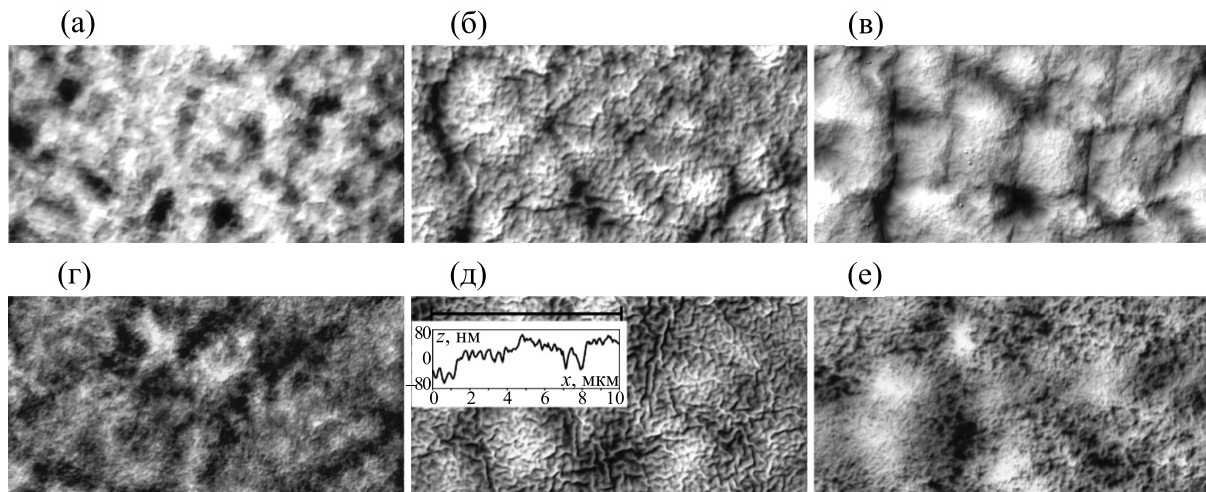


Рис. 1. АСМ-изображения (20×10 мкм) необработанных (а – ПУ1, г – ПУ2) и обработанных (б, в – ПУ1, 1 и 3 кэВ; д, е – ПУ2, 1 и 3 кэВ) поверхностей. Для качественной оценки возникших складок на рис. 1д показан профиль выделенного участка поверхности.

Образцы термостатировали 48 ч при 37°C , после чего отмывали в фосфатном буфере (рН 7,2). Количество жизнеспособных клеток в образовавшихся биопленках определяли окрашиванием образцов водорастворимым тетразолием в системе «Cell Proliferation Assay». Результаты выражали в условных единицах (величина оптической плотности окрашенного раствора при 490 нм, деленная на площадь пластинки). Для статистики эксперименты проведены три раза.

Микроскопия. Информация о микроструктуре поверхности была получена при помощи оптического 3D-видеомикроскопа NiGoX KH-7700 (NiGoX, Япония) и атомно-силового микроскопа Nano-DST (Pacific Nanotechnology, США) в полуконтактном режиме работы, радиус острия зондов < 10 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рельеф поверхности (рис. 1) после плазменной обработки изменяется и зависит как от параметров обработки, так и от подложки. На поверхности образуются складки. Их характеристики определяли, анализируя рельеф z-координаты изображений, полученных на атомно-силовом микроскопе, при помощи спектральной плотности мощности (PSD): $PSD = \Delta/n |\text{fft}(z)|^2$, где fft – преобразование Фурье; n – количество точек изображения с длиной стороны L ; шаг $\Delta = L/n$. Дискретные частоты f принимают значения: $1/L, 2/L, \dots, 0,5n/L$. Среднеквадратичная шероховатость

на интервале частот от f_1 до f_2 вычисляли по

формуле $R_{\text{RMS}} = \sqrt{\int_{f_1}^{f_2} PSD df}$. В частности, при $f_1 = f_2$ получаем оценку амплитуды A длины волны $\lambda = 1/f_1$, а при $f_2 = 1/L$ – среднюю шероховатость в области размером $s = 1/f_1$.

Величина PSD показывает силу сигнала в зависимости от λ , т.е. от расстояния между точками рельефа. Локальные максимумы $PSD(\lambda)$ соответствуют повторяющимся особенностям рельефа и представлены на рис. 2. На графиках есть участки, где для необработанных и обработанных плазмой поверхностей максимумы PSD лежат в окрестности одного значения λ . Это те области рельефа, которые после обработки качественно остались прежними, изменились только размеры локальных неровностей. Особенно это выражено для жесткого материала ПУ1: за исключением $\lambda = 850$ нм (выделенная область на рис. 2а) все особенности обработанного плазмой рельефа подобны необработанному.

Для мягкого материала ПУ2 плазменная обработка вызвала более сильные изменения рельефа: появился целый спектр складок амплитудой $2 \div 3$ нм и длинами волн $800 \div 1800$ нм (выделенная область на рис. 2б).

Влияние на рельеф увеличения энергии обработки с 1 до 3 кэВ зависит от свойств подложки: для материала ПУ1 это отразилось в трех- и четырехкратном увеличении шероховатости (см.

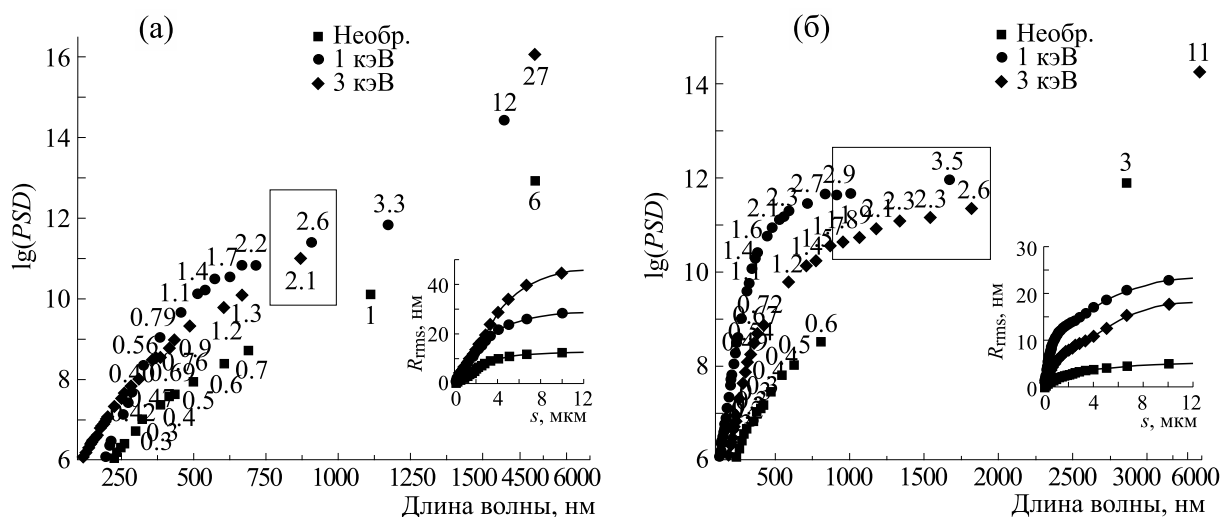


Рис. 2. Структурные свойства рельефа необработанных и обработанных поверхностей: зависимость локальных максимумов спектральной плотности мощности от длины волны: (а) – ПУ1, (б) – ПУ2. Прямоугольниками выделены участки PSD , имеющиеся только на обработанных поверхностях. Значения над маркерами – соответствующие амплитуды в нм. На вставках представлена шероховатость в зависимости от размеров области рассмотрения.

вставку на рис. 2а). Шероховатость ПУ2 увеличилась в два раза, однако в этом случае появилась выраженная структура складок, которая дала резкое увеличение шероховатости на областях размером 1–2 мкм (см. вставку на рис. 2б) – этому же интервалу соответствуют вышеупомянутые складки рельефа обработанной поверхности.

Величины контактного угла смачивания водой и количества жизнеспособных бактерий представлены на рис. 3. В абсолютных цифрах число адсорбированных бактерий стафилококка значительно меньше, чем кишечной палочки. Это связано с различием в гидрофобности их клеточной стенки и поверхностном заряде [22]. Количество клеток стафилококков на поверхности связано в первую очередь со смачиваемостью поверхности и на исследуемых поверхностях существенно не изменяется. Однако наблюдалось незначительное снижение адгезии бактерий стафилококка на материале ПУ2 при увеличении угла смачивания.

Клетки бактерий кишечной палочки более чувствительны к химическому составу подложки, так, на необработанном ПУ2 интенсивность дыхания биопленок кишечной палочки была в полтора раза больше, чем на ПУ1. После обработки полиуретана количество прикрепившихся бактерий резко убывает. Так как угол смачивания существенно не меняется, то в первую очередь это связано со структурными особенностями релье-

фа: возникшая после обработки складчатая поверхность ПУ2 с длиной волны от 1000 до 1500 нм (рис. 2б) затрудняет колонизацию и оказывает дополнительный антибактериальный эффект на кишечную палочку.

В качестве иллюстрации на рис. 4 представлены биопленки кишечной палочки на необработанной (а) и обработанной плазмой поверхности (были исследованы высохшие подложки). В первом случае бактериями покрыта практически вся поверхность, во втором – отдельные участки. Свободная от бактерий поверхность, по сравнению с исходным состоянием (рис. 1), выглядит более гладкой. Она покрыта слоем различных органических соединений, адсорбировавшихся за время роста бактерий.

В результате механической нагрузки на обработанных поверхностях образуются поперечные трещины и складки, сонаправленные с осью деформации (рис. 5). После снятия нагрузки под влиянием остаточных деформаций края трещин оказываются раскрытыми, и на поверхности остаются складки – результат сжатия материала в поперечном направлении. Ширина поперечных трещин составила 250–400 нм; средняя глубина (~25 или 45 нм) совпадает с оценочной толщиной поверхностного слоя.

Нагрузка вызвала увеличение среднеквадратичной шероховатости (см. вставки на рис. 5) по-

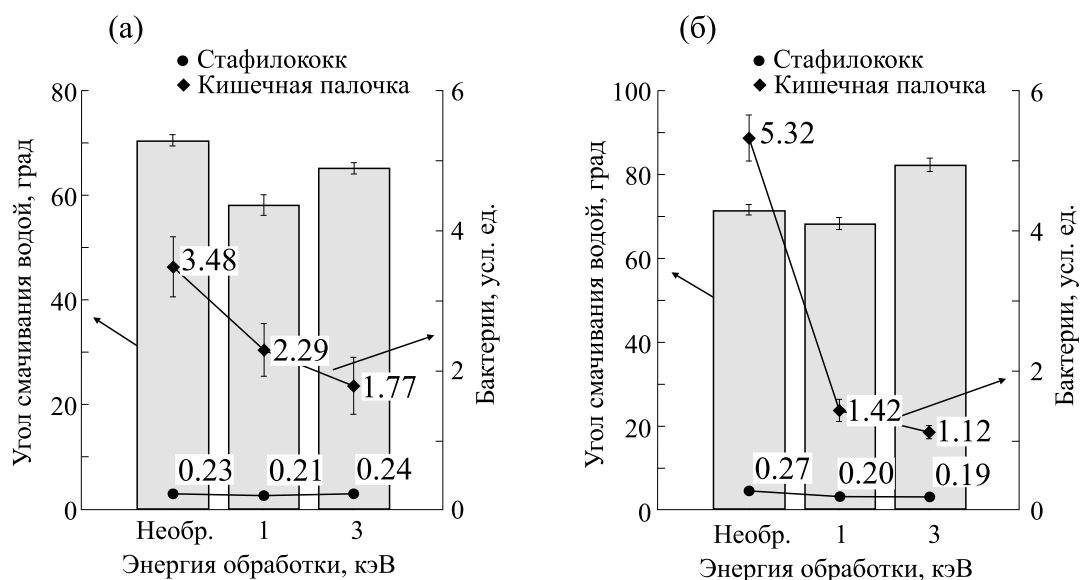


Рис. 3. Смачиваемость и антибактериальные свойства необработанных и обработанных поверхностей ПУ1 (а) и ПУ2 (б).

верхностей (за исключением ПУ1–3 кэВ, где шероховатость незначительно уменьшилась) на величину 20–30 нм.

Исследование роста биопленок на поврежденных поверхностях показало, что бактерии локализируются в местах дефектов покрытия (рис. 6). Удельная площадь биопленки, по сравнению с неповрежденным покрытием, возрастает, во-первых, за счет увеличения площади контакта между бактерией и покрытием. Во-вторых, фактором, увеличивающим бактериальную адгезию,

является открытая в трещинах поверхность необработанного полимера.

Известно, что шероховатость [23] и текстура рельефа [24] существенным образом влияют на способность бактерий закрепляться на поверхности. В нашем случае на увеличение количества кишечной палочки на деформированных поверхностях в первую очередь повлияли протяженные длинные трещины: количество этих бактерий возрастает в полтора раза после приложения нагрузки и существенно не зависит от подложки. Двукратный рост количества стафилококка, за-

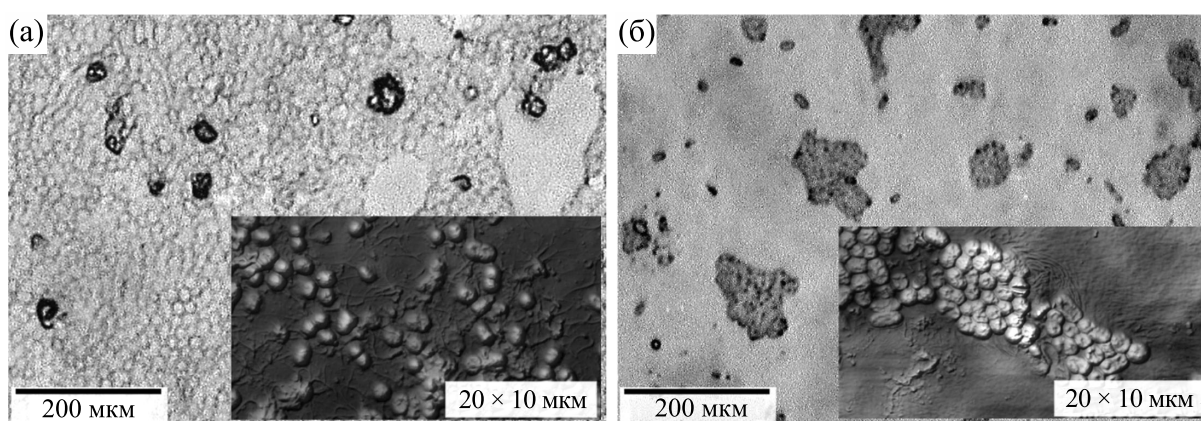


Рис. 4. Кишечная палочка на необработанной (а) и обработанной (б) поверхности ПУ2. Изображения оптической и атомно-силовой микроскопии.

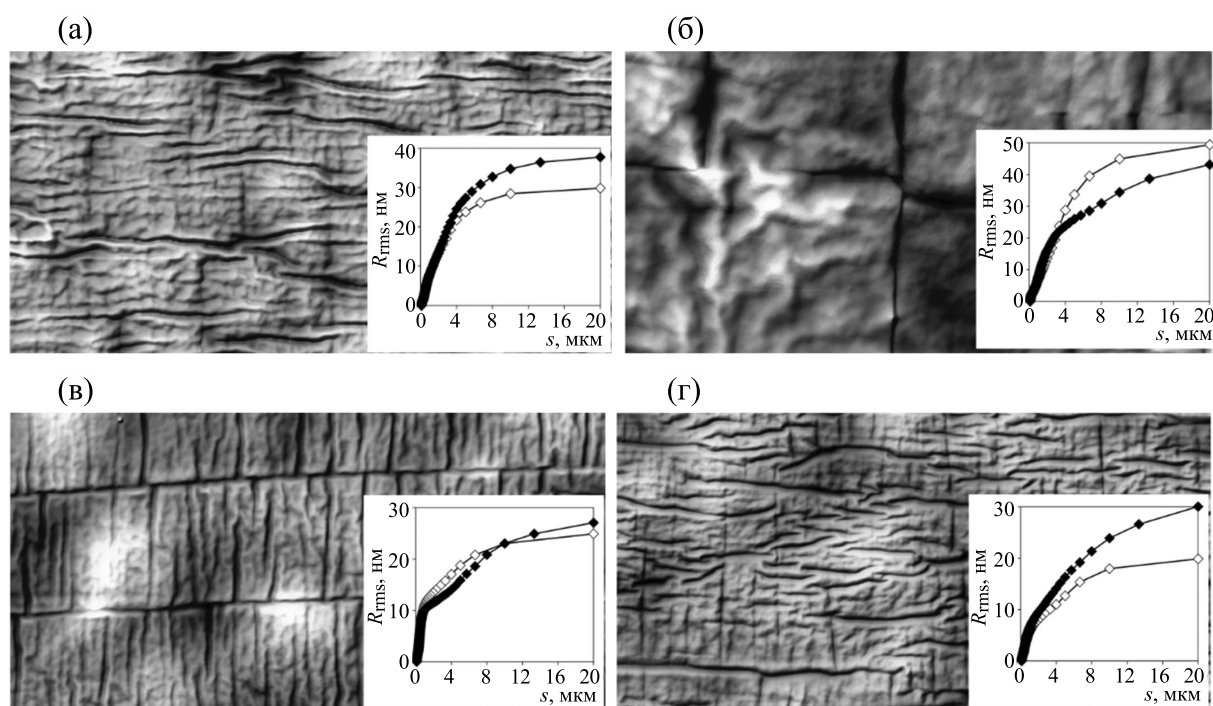


Рис. 5. Изображения (20×10 мкм) обработанных поверхностей после нагрузки: (а) – ПУ1, 1 кэВ; (б) – ПУ1, 3 кэВ; (в) – ПУ2, 1 кэВ; (г) – ПУ2, 3 кэВ; в, г – ПУ2: 1 и 3 кэВ. На вставках показаны шероховатости до (белые ромбы) и после нагружения (черные ромбы).

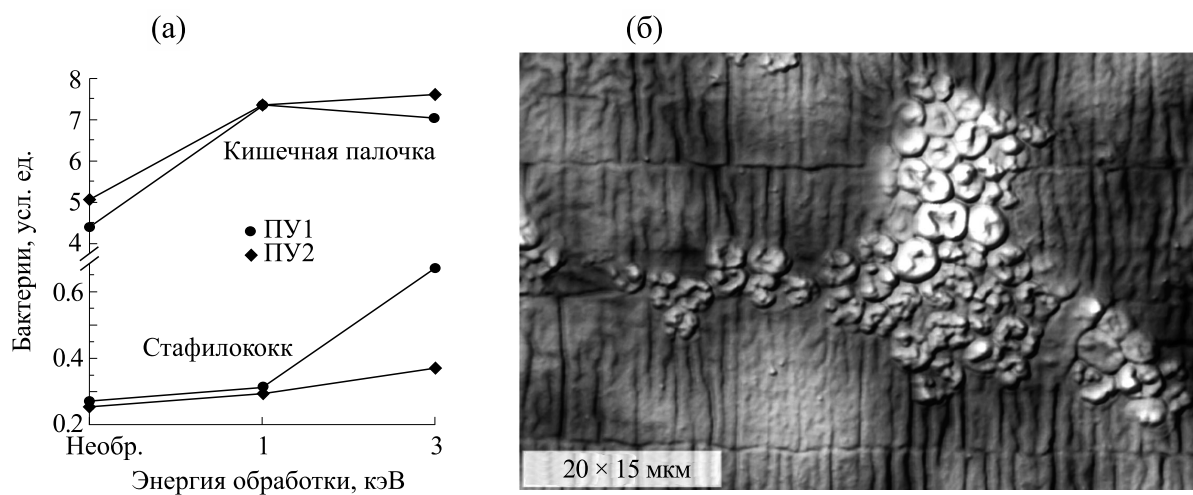


Рис. 6. (а) – Влияние нагрузки на адгезию бактерий: количество жизнеспособных бактерий на обработанных поверхностях после деформации; (б) – кишечная палочка на материале ПУ2 (1 кэВ).

фиксированный на материале ПУ1 при 3 кэВ, связан с разглаживанием поверхности после нагрузки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плазменная модификация поверхностей упругих материалов может иметь перспективы при создании биомедицинских изделий с улучшенными характеристиками. В работе исследовали влияние плазменной иммерсионной имплантации ионов азота (энергия ионов 1 или 3 кэВ) на антибактериальные свойства двух эластичных полиуретанов различной жесткости.

В результате обработки изменяется смачиваемость поверхности, рельеф приобретает складчатую структуру. Образовавшиеся складки поверхности характеризуются спектром длин волн и амплитуд и особенно выражены на более мягком материале.

Изменения поверхности существенным образом повлияли на адгезию бактерий кишечной палочки, чья сорбционная активность на обработанных поверхностях снизилась в два и более раза. В первую очередь это связано с появлением текстуры разветвленных складок, а также с увеличением шероховатости рельефа. Незначительно уменьшилась и адгезия стафилококка (его абсолютное количество на исследуемых подложках до и после плазменной обработки было значительно меньше, чем кишечной палочки), на это повлияло как увеличение гидрофобности, так и особенности рельефа поверхности.

Циклическая одноосная деформация вызвала необратимые изменения плазменного покрытия: на поверхностях появились поперечные трещины и сонаправленные с осью нагружения складки. Это привело к существенному увеличению, по сравнению с необработанным материалом, бактериальной адгезии как кишечной палочки, так и стафилококка. Основным фактором роста бактерий явились протяженные дефекты рельефа – трещины и складки.

Таким образом, вызванные деформацией изменения структуры покрытия нивелируют первоначальный положительный антибактериальный эффект плазменной обработки. Учитывая также то, что при многоцикловых нагрузках трещины прорастают вглубь материала и разрушают мягкую подложку [5], использование подобных материалов в реальных изделиях нежелательно. Выходом из данной ситуации может служить разработ-

ка более устойчивых к деформации несплошных островковых покрытий [25,26].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-48-590057_p_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. A. Panchuk, Z. K. Sadakbaeva, D. V. Bagrov, et al., *Polymer Sci., Ser. A* **52** (8), 794 (2010).
2. P. Alves, S. Pinto, H. C. de Sousa, and M. H. Gil, *J. Appl. Polym. Sci.* **122** (4), 2302 (2011).
3. I.A. Morozov, A.S. Mamaev, I.V. Osorgina, et al., *Mat. Sci. Eng. C – Mater.* **62**, 242 (2016).
4. A. L. Volynskii, D. A. Panchuk, Z. K. Sadakbaeva, et al., *Dokl. Phys. Chem.* **427** (2), 133 (2009).
5. I. A. Morozov, A. S. Mamaev, M. V. Bannikov, et al., *Coatings* **8** (2), 75-1-11 (2018).
6. И. В. Осоргина, С. Е. Порозова, С. А. Плаксин и И. А. Морозов, *Мед. техника*, № **1**, 45 (2016).
7. A. Beliaev, A. Svistkov, R. Iziumov, et al., *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* **123**, Article ID 012001 (2016).
8. I. Kondyurina, G. S. Nechitailo, A. L. Svistkov, et al., *Nucl. Instrum. Meth.* **342**, 39 (2015).
9. M. Stüber, L. Niederberger, F. Danneil, et al., *Adv. Eng. Mater.* **9** (12), 1114 (2007).
10. K. Tsougeni, A. Tserepi, G. Boulousis, et al., *Plasma Process Polym.* **4** (4), 398 (2007).
11. I. A. Morozov, A. S. Mamaev, I. V. Osorgina, et al., *J. Appl. Polym. Sci.* **135** (11), 45983 (2018).
12. R. C. Cammarata, T. M. Trimble, and D. J. Srolovitz, *J. Mater. Res.* **15** (11), 2468 (2000).
13. G. Speranza, G. Gottardi, C. Pederzoli, et al., *Biomaterials* **25**, 2029 (2004).
14. K. Triandafillu, D.J. Balazs, B.O. Aronsson, et al., *Biomaterials* **24**, 1507 (2003).
15. M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, *Eur. Cell Mater.* **8**, 37 (2004).
16. N. Mitik-Dineva, et al., *Biotechnol. J.: Healthcare Nutrition Technology* **3**, 536 (2008).
17. M. G. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, *Acta Biomater.* **6**, 1107 (2010).
18. V. A. Tegoulia and S. L. Cooper, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **24**, 217 (2002).
19. J. D. Patel, M. Ebert, R. Ward, and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res. A* **80A**, 742 (2007).

20. T. Shida, H. Koseki, I. Yoda, et al., *Int. J. Nanomed.* **8**, 3955 (2013).
21. M. R. Sanchis, O. Calvo, O. Fenollar, et al., *Polym. Test.* **27** (1), 75 (2008).
22. P. Gilbert, D. J. Evans, E. Evans, et al., *J. Appl. Bacteriol.* **71** (1), 72 (1991).
23. K. J. Edwards and A. D. Rutenberg, *Chem. Geol.* **180** (1–4), 19 (2001).
24. D. Perera-Costa, J. M. Bruque, M. L. González-Martín, et al., *Langmuir* **30**, 4633 (2014).
25. A. P. Alekhin, G. M. Boleiko, S. A. Gudkova, et al., *Nanotechnologies in Russia* **5**, 696 (2010).
26. I. A. Morozov, A. S. Kamenetskikh, R. I. Izumov, and M. G. Scherban, *J. Phys. Conf. Ser.* **1134**, 012042 (2018).

Damage Effect of Plasma-Treated Polyurethane Surface on Bacterial Adhesion

I.A. Morozov*, **A.S. Kamenetskikh****, **A.Yu. Beliaev***, **M.G. Scherban*****, **L.M. Lemkina******,
D.V. Eroshenko*****, and **V.P. Korobov*******

**Institute of Continuous Media Mechanics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia*

***Institute of Electrophysics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Amundsena 106, Ekaterinburg, 620016 Russia*

**** Perm State University, ul. Bukireva 15, Perm, 614990 Russia*

***** Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia*

******Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Koroleva 3, Perm, 614013 Russia*

Elastic polyurethanes are one of the feasible materials for creating biomedical products. Plasma treatment is a promising method of surface modification. However, external deformation of the elastic substrate could damage the modified layer and provoke various undesirable consequences. In this work, two elastic polyurethanes with different stiffness are studied. The materials are treated with plasma immersion implantation of nitrogen ions (energy is 1 and 3 keV). As a result, the relief and hydrophobicity of the surfaces are changed, which decreased the adhesion of both gram-positive (*Staphylococcus*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. Cyclic uniaxial deformation damages the treated surfaces: transverse cracks and longitudinal folds are formed. These changes increase the bacterial adhesion to the values exceeding their number on the untreated materials. All the features of the modified surfaces are correlated both with the properties of the original substrate and the treatment parameters. The bacterial adhesion is mainly affected by the peculiarities of the relief structure.

Keywords: polyurethanes, plasma, medical polymers, deformation, bacteria