

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИДИМЕТИЛСИЛОКСАНА МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ*

Р.М. Якушев, *Институт технической химии УрО РАН*

Т.И. Карпунина, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Д.Э. Якушева, *Институт технической химии УрО РАН*

Д.М. Кисельков, *Институт технической химии УрО РАН*

И.А. Борисова, *Институт технической химии УрО РАН*

И.А. Касаткин, *Институт технической химии УрО РАН*

Разработаны методы и подходы к антибактериальной обработке полидиметилсилоксана (ПДМС). Антибактериальный эффект отмечен после активирования поверхности силиконового каучука методами ионно-лучевой обработки и химического травления. Поверхность изделий и синтезированных образцов из силиконового каучука модифицировалась путем прививки акриловой кислоты, нанесения хемосорбированного слоя наночастиц оксида цинка, комплексообразования соединений цинка с привитыми аминофункциональными группами, прививки перфторированных углеводородных радикалов, нанесением субмикронных частиц оксида цинка химическим осаждением из газовой фазы. Культивируемые биопленки *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* анализировались фотометрическими методами, методом спектроскопии ИК НПВО, а также оптической и сканирующей электронной микроскопии. Все исследованные образцы обладали антибактериальным действием, однако наиболее выраженный эффект наблюдался в случае присутствия в поверхностном слое соединений цинка и фтора.

Ключевые слова: полидиметилсилоксан, ионно-лучевая обработка, травление, оксид цинка, прививка, акриловая кислота, антибактериальные функциональные группы, биопленки, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*.

Госпитальные инфекции (ГИ) являются современной проблемой здравоохранения, имеющей существенную социальную, медицинскую и экономическую значимость [1–3]. Актуальность данной проблемы обусловлена не только распространенностью ГИ, но и широким спектром

возбудителей с постоянно растущим уровнем антибиотикорезистентности, существенным увеличением затрат на лечение ГИ и высокой летальностью.

Поиск и изучение средств, способных предотвратить образование биопленок, по-прежнему остается актуальной зада-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края (грант № 14-03-96013).

чей. Так, в обзоре [4], основное внимание сфокусировано на невымываемых водой (или физиологическими жидкостями) антимикробных реагентах, иммобилизованных на поверхности медицинского изделия: азотсодержащих соединениях, производных хитозана, ферментах и пептидах. При этом отмечено, что иммобилизация ферментов и пептидов отличается высокой стоимостью, сложными технологиями и малой жизнеспособностью закрепленного слоя.

В результате развития нанотехнологий создаются различные наноструктурные материалы с антибактериальными свойствами. В подавляющем большинстве это композиты и покрытия, содержащие наночастицы металлов и их оксидов. Основные достижения в области синтеза, иммобилизации и применения антибактериальных наночастиц изложены в обзоре [5].

Перспективность использования импульсной ионно-лучевой обработки полимерных материалов для медицинских целей не вызывает никаких сомнений. Например, в работах [6, 7] для достижения антибактериального эффекта поверхность силиконового каучука была подвергнута воздействию плазмы аргона. Образовавшиеся на поверхности кислородсодержащие функциональные группы способствовали хемосорбции фторалкилтрихлорсиланов.

В данной работе в качестве объекта исследования был выбран силиконовый каучук (ПДМС), который нашел широкое применение в медицине. Исследовалось образование биопленок после экспозиции с бактериальными культурами *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, наиболее часто являющихся причиной микробной контаминации изделий медицинского назначения. В статье представлены основные результаты, относящиеся к последним двум видам микроорганизмов. Для проведения экспериментов по культивированию биопленки использовались образцы медицинского катетера из силиконового каучука и полученный в лабораторных условиях ПДМС.

В целом, можно разделить все разработанные в рамках проекта методы поверхностной модификации ПДМС на две группы. К первой группе относятся методы изменения химической структуры поверхностного слоя после воздействия пучка ускоренных ионов. Схемы преобразования поверхности ПДМС представлены на рис. 1.

Для активирования поверхности образцы ПДМС помещались в вакуумную камеру ионно-лучевой установки (разработка Института электрофизики УрО РАН) и обрабатывались ионами азота в импульсно-периодическом режиме.

Ионная обработка проводилась при различных флюэнсах ионов азота. Для удобства при обсуждении результатов приведены значения количества импульсов, например, 1000 импульсов соответствует $3,7 \cdot 10^{15}$ ион/см². После обработки образцы доставали из вакуумной камеры ионного источника и подвергали воздействию акриловой кислоты (АК).

Микроскопическое исследование показало, что структура поверхностного слоя ПДМС существенно изменилась. Уже после 500 импульсов ионной обработки поверхность покрывается микротрещинами, помимо этого наблюдается «волнистость» поверхности, аналогичная наблюдавшейся ранее микроскладчатости после ИЛО на поверхности полиэтиленовых волокон [8]. В ИК-спектрах нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) обработанных образцов появляется повышенное поглощение в области валентных колебаний карбонильных групп (рис. 2).

Для преобразования карбоксильных групп в аминокислоты использовали известные реакции эпоксидирования карбоксильной группы эпихлоргидрином и дальнейшего аминирования эпоксидной группы этилендиамином.

Комплексно связанные ионы цинка в поверхностный слой ПДМС вводили путем взаимодействия аминокислот с водным раствором соли цинка исходя из способности ионов цинка образовывать координа-

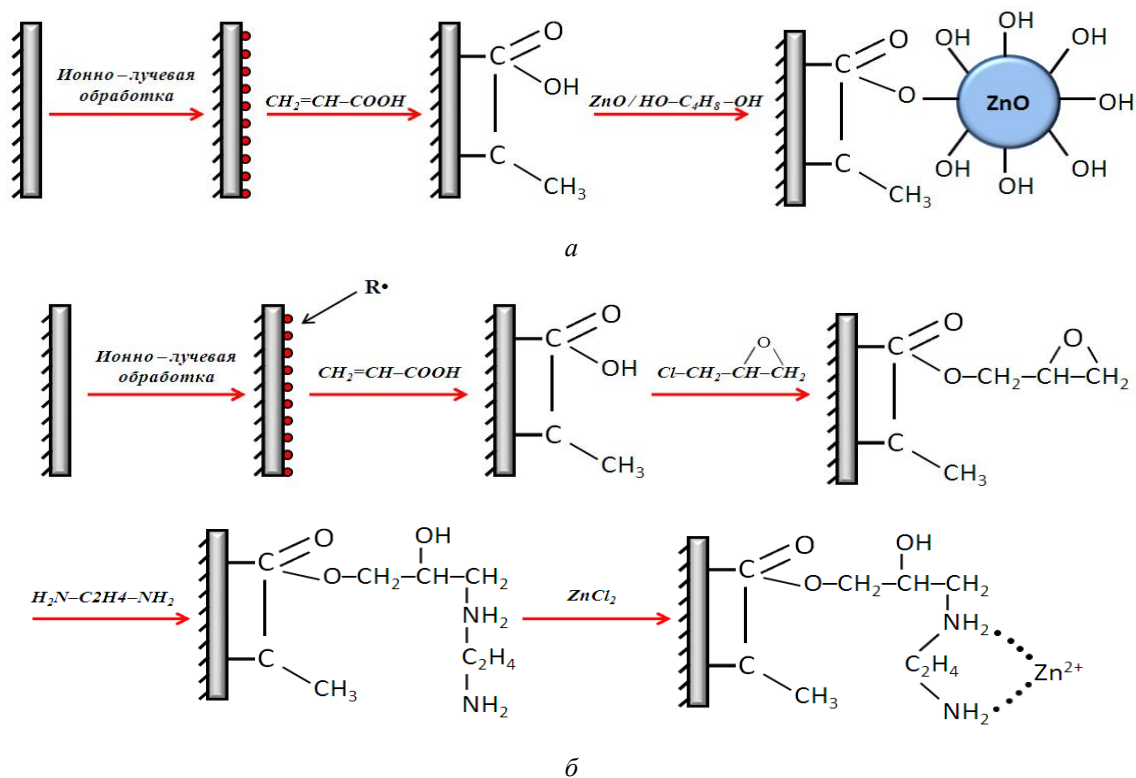


Рис. 1. Методы модифицирования ПДМС после активирования поверхности методом импульсной ионно-лучевой обработки и последующей прививки акриловой кислоты: а) хемосорбция наночастиц ZnO; б) получение комплексно-связанных ионов цинка

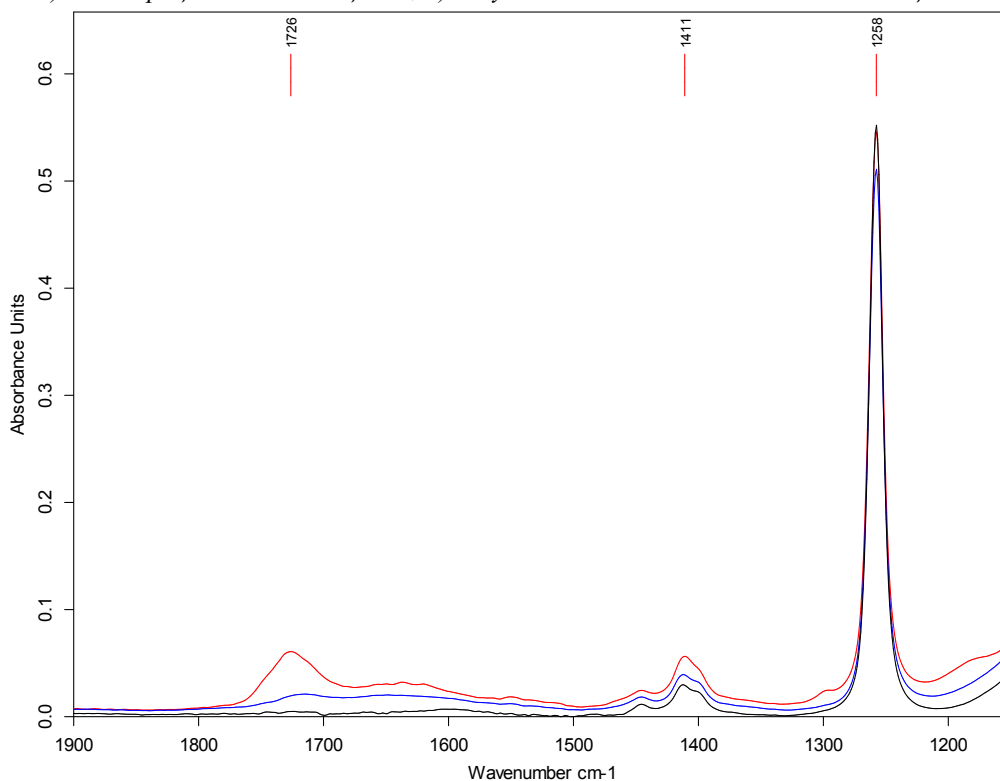


Рис. 2. ИК-спектры НПВО образцов ПДМС: исходного (черный); после ИЛО 1000 имп. (синий); после ИЛО 1000 имп. и обработки АК в течение 90 мин (красный)

ционные связи с азотом молекулы аммиака и других азотсодержащих соединений.

Идея адсорбционной иммобилизации наночастиц оксида цинка на поверхность модифицированного ПДМС осуществлена благодаря наличию на ее поверхности карбоксильных групп. Для этого образцы ПДМС помещали в суспензию наночастиц ZnO, стабилизированных 1,4-бутандиолом, затем тщательно промывали дистиллированной водой.

Введение в структуру макромолекул поверхностного слоя аминогрупп в большей степени снижало пленкообразую-

щую способность *K. pneumoniae*, чем *S. epidermidis* (рис. 3).

Введение в структуру поверхностного слоя комплексных соединений цинка оказало большее влияние на пленкообразующую способность стафилококков по сравнению с клебсиеллами. Более наглядно эффект модифицирования поверхности с точки зрения антиадгезионного эффекта по отношению к стафилококкам был продемонстрирован с помощью изображений, полученных методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) (рис. 4).

На рис. 5 представлены результаты

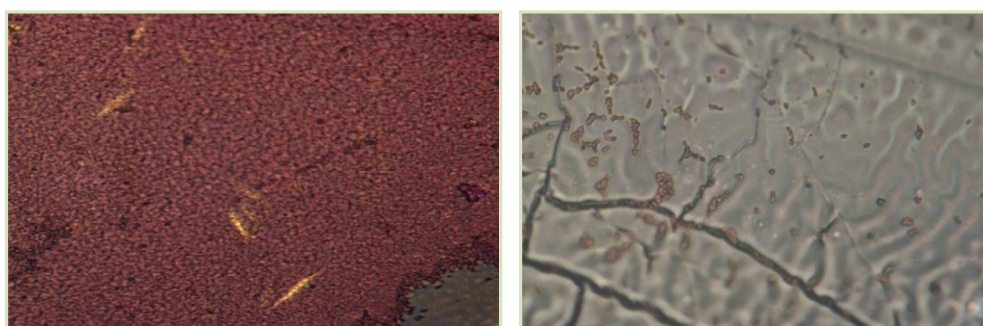


Рис. 3. Формирование биопленок *K. pneumoniae* на поверхности исходного (слева) и модифицированного аминогруппами (справа) образца ПДМС

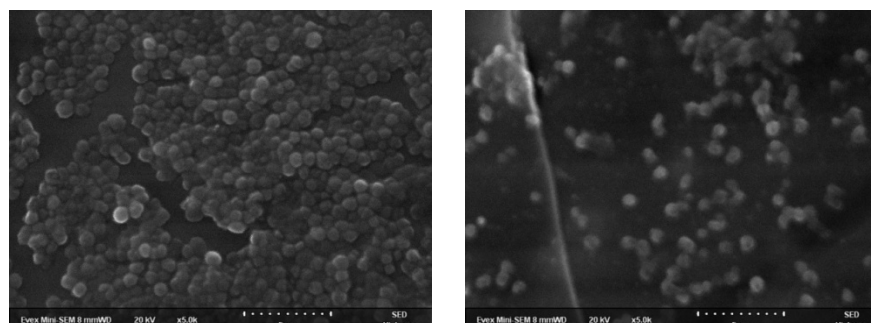


Рис. 4. Биопленка *S. epidermidis* на поверхности исходного ПДМС (слева) и модифицированного комплексно связанным цинком (справа)

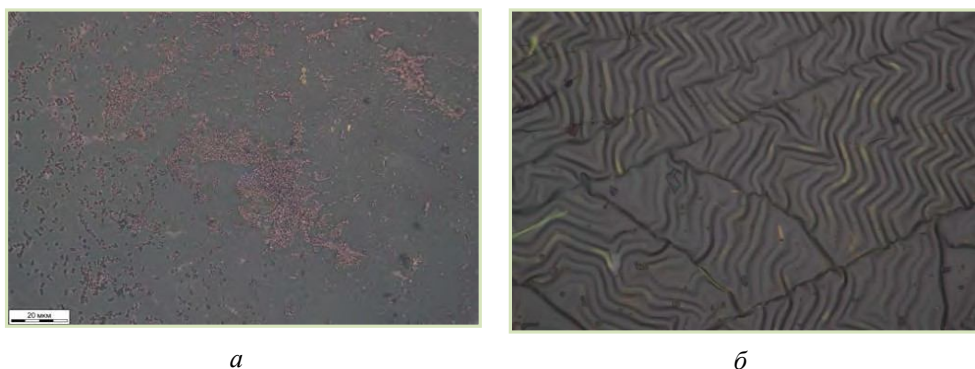


Рис. 5. Поверхность образцов ПДМС после культивирования микроорганизмов *K. pneumoniae*: а) исходный; б) с хемосорбированными наночастицами ZnO

культивирования биопленки *K. pneumoniae* на исходном и модифицированных образцах ПДМС. На исходном образце (рис. 5, а), несмотря на многократное промывание водой, наблюдаются как единичные бактерии, так и адгезированные участки сплошной биопленки размером до 40 мкм. На образце с адсорбированным слоем ZnO зафиксировано небольшое количество единичных бактерий (рис. 5, б), то есть получен выраженный антибактериальный эффект.

Ко второй группе разработанных методов нанесения антибактериального слоя относятся способы поверхностной модификации ПДМС после активирования химическим травлением. На рис. 6, а представлена последовательность реакций, в результате которых к поверхности прививаются перфторированные углеводородные радикалы. В лунки планшетов с образцами ПДМС вносили по 2 мл суточных бульонных культур и инкубировали при температуре 37 °С до 8 суток.

Были изучены ростовые характеристики бактерий, культивируемых на ис-

ходных и модифицированных образцах ПДМС в мультимодальном планшетном ридере в течение суток с почасовой регистрацией прироста биомассы в инокулямах. Результаты мониторинга для *S. epidermidis* представлены на рис. 7 в виде временных зависимостей оптической плотности суспензии. Динамику роста представителей грамположительных (см. рис. 7) и грамотрицательных таксонов характеризовали некоторые отличия, в частности, эпидермальные стафилококки значительно медленнее адаптировались по сравнению с клебсиеллами.

На рис. 8 приведены изображения исходной и модифицированной поверхности после 8-суточного контакта с бульонными культурами, полученные на оптическом микроскопе Olympus VX-51. На поверхности модифицированных образцов наблюдали снижение интенсивности пленкообразования и стафилококков, и клебсиелл. Площадь биопленок *S. epidermidis* и *K. pneumoniae*, определенная с помощью программного продукта

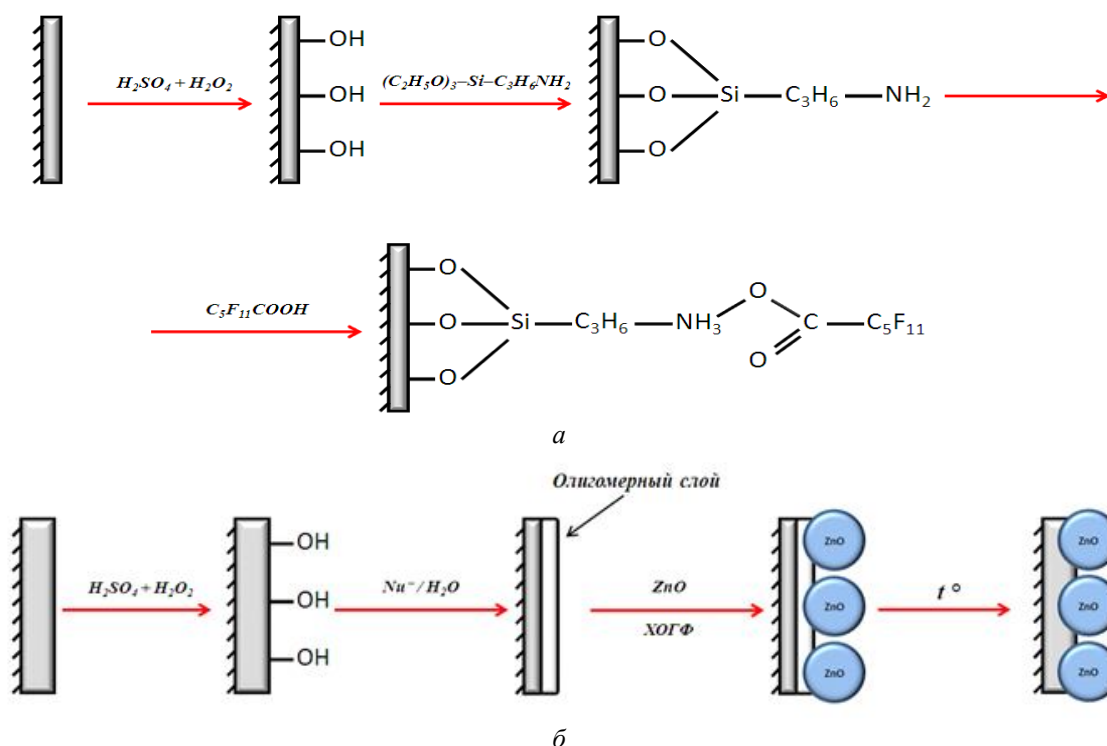


Рис. 6. Методы модифицирования ПДМС после активирования поверхности раствором «пиранья» ($H_2O_2 + H_2SO_4$): а) прививка перфторкапроновой кислоты; б) иммобилизация частиц ZnO методом осаждения из газовой фазы

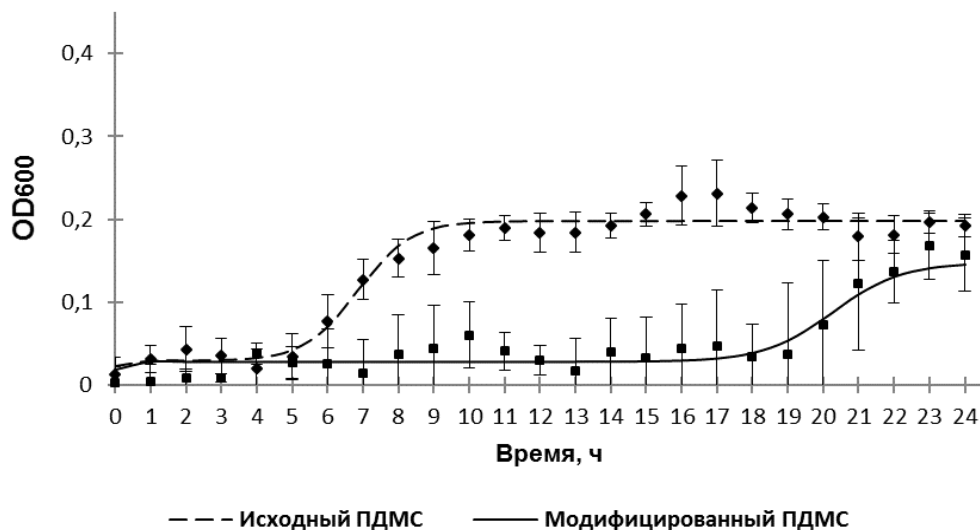


Рис. 7. Динамика роста культуры *S. epidermidis* в течение суток в присутствии образцов полидиметилсилоксана с перфторированными углеводородными радикалами на поверхности

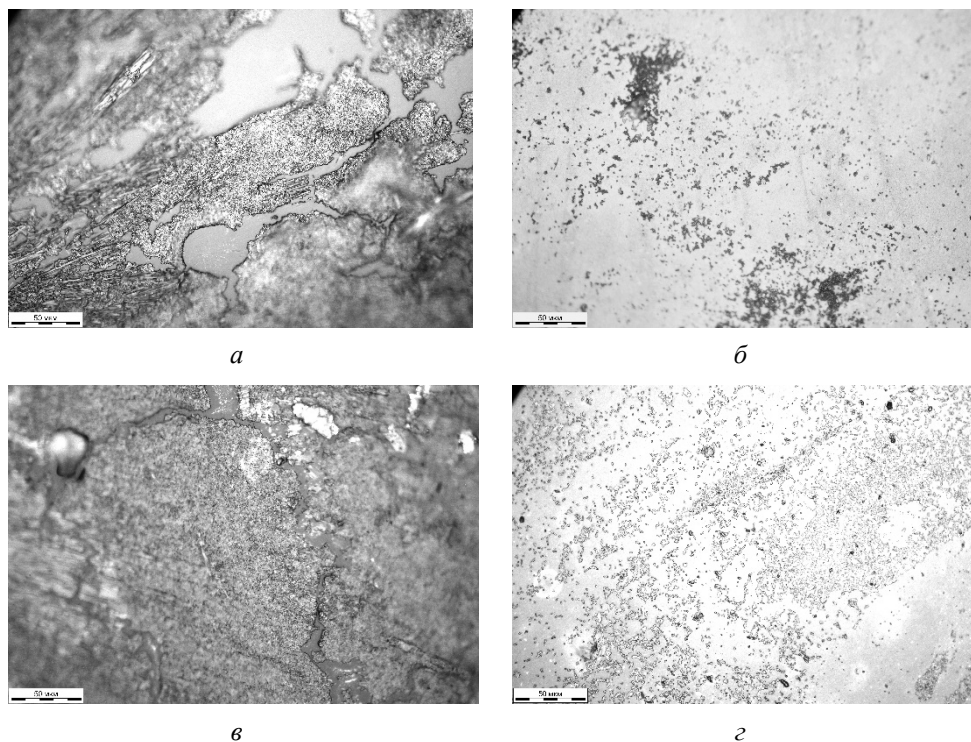


Рис. 8. Биопленки на исходном (а, в) и модифицированном (б, г) образцах ПДМС после 8-суточной инкубации *S. epidermidis* (а, б) и *K. pneumoniae* (в, г)

ImageScore, составила для модифицированных образцов 23% и 14% от общей площади поверхности соответственно, в сравнении с исходными 40% и 56%.

На рис. 6, б представлена схема получения модифицированного поверхностного слоя с иммобилизованными субмикронными частицами оксида цинка. В результате щелочного травления происхо-

дит частичная деполимеризация макромолекул полидиметилсилоксана, или формирование «закрепленного» на поверхности полимера олигомерного слоя. Такой слой является отличным субстратом для нанесения неорганических частиц, что и было реализовано в данной работе.

Для нанесения на подготовленную поверхность образцов частиц ZnO была соз-

дана оригинальная установка аэрозольного кондиционирования (рис. 9), которая позволяет наносить частицы на поверхность образцов любых размеров и геометрической формы, вести процесс при более низких температурах по сравнению с классическими методиками химического осаждения из газовой фазы. В установку подавалась суспензия наночастиц ZnO в изопропанол, стабилизированная ацетилацетоном. Размер частиц суспензии, определенный методом динамического светорассеяния, составлял 220–250 нм.

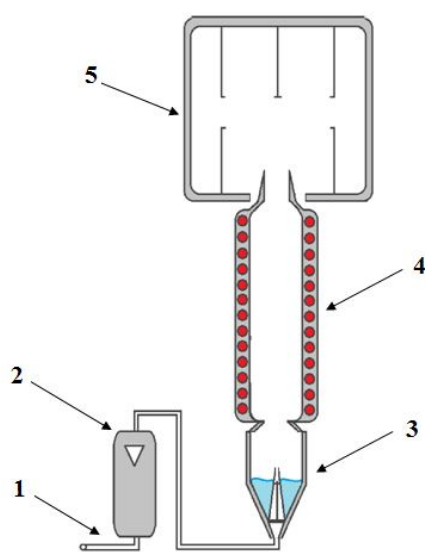


Рис. 9. Схема разработанной установки аэрозольного кондиционирования:
1 – вход газа (сжатый воздух, N₂ и т.д.);
2 – ротаметр; 3 – распылительная камера (d ~ 5 мкм); 4 – испаритель (~ 300 °C);
5 – камера кондиционирования

Пример поверхности с частицами, нанесенными методом осаждения из газовой фазы, приведен на рис. 10.

Рост бактериальных культур *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* на образцах,

содержащих частицы ZnO, несколько замедляется по сравнению с исходным ПДМС. Показатели оптической плотности свидетельствуют об антибактериальном эффекте такого метода модификации, хотя и менее выраженном, чем в случае фторсодержащих поверхностных групп.

Таким образом, полученные в данной работе результаты свидетельствуют о снижении контаминации модифицированной поверхности силиконового каучука бактериями *S. epidermidis* и *K. pneumoniae*. Целесообразно продолжить комплексные исследования с использованием физико-химических способов модификации поверхности полимерных материалов медицинского назначения, направленные на подавление и предупреждение формирования биопленок бактериями – возбудителями инфекций.

Авторский коллектив выражает благодарность канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН Нестеровой Л.Ю. за участие в получении и интерпретации экспериментальных данных и вед. инж. лаб. № 2 ИТХ УрО РАН Лысенко С.Н. за научное консультирование.

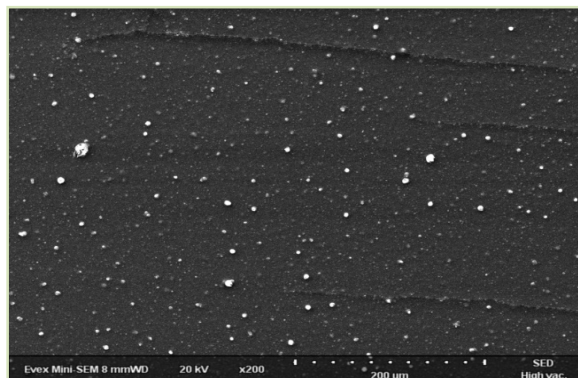


Рис. 10. Микрофотография РЭМ поверхности ПДМС с субмикронными частицами оксида цинка

Библиографический список

1. Зуева Л.П., Семина Н.А. Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики внутрибольничных инфекций. – СПб., 2003. – С. 31–32.
2. Акимкин В.Г. Организационные основы и функциональные направления деятельности врача-эпидемиолога лечебно-профилактического учреждения. – М.: Изд-во РАМН, 2005. – 180 с.
3. Брусина Е.Б., Рычагов И.П. Эпидемиология внутрибольничных гнойно-септических инфекций в хирургии. – Новосибирск: Наука, 2006. – 171 с.
4. Green J.-B. D., Fulghum T., Nordhaus M.A. Review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing // Biointerphases 6(4), December 2011. – P. 13–28.

5. Moritz M., Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles // Chemical Engineering Journal. – 2013. – Vol. 228. – P. 596–613.
6. Kondyurin A., Bilek M. Ion Beam Treatment of Polymers: Application Aspects from Medicine to Space. – Elsevier, 2015. – P. 185–215.
7. Everaert E., van der Mei H., Busscher H.J. Colloids and Surfaces B // Biointerfaces. – 1998. – Vol. 10. – P. 179–190.
8. Yakusheva D.E., Yakushev R.M., Oschepkova T.E., Strelnikov V.N. Properties of ultra high molecular weight polyethylene fibers after ion beam treatment // J. Appl. Polym. Sci. – 2011. – Vol. 122, Is. 3. – P. 1628–1633.

METHODS FOR ANTIMICROBIAL SURFACE MODIFICATION OF MEDICAL GRADE POLYDIMETHYLSILOXANE

R.M. Yakushev¹, T.I. Karpunina², D.E. Yakusheva¹, D.M. Kiselkov¹, I.A. Borisova¹, I.A. Kasatkin¹

¹Institute of Technical Chemistry UB RAS

²Perm State Medical University named after E.A. Wagner

The methods and approaches to antibacterial treatment of polydimethylsiloxane (PDMS) with a view to use in medical devices, such as urinary catheters, and testing in the hospitals of Perm Krai have been developed. The antibacterial effect has been observed as a result of the transformation of the silicone rubber surface activated by ion-beam treatment and chemical etching. The surface of the silicone rubber devices and synthesized samples has been modified by grafting of acrylic acid, application of chemisorption of zinc oxide nanoparticles, chelation of zinc compounds grafted with amino functional groups, grafting of perfluorinated groups, chemical vapor deposition of submicron zinc oxide particles. The biofilms of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* have been analyzed by photometric methods, FTIR spectroscopy, and optical and scanning electron microscopy. It has been shown that all the samples tested have antibacterial activity, however, the most pronounced effect has been observed in the case of the surface layers with introduced zinc and fluorine compounds.

Keywords: polydimethylsiloxane, ion beam treatment, etching, zinc oxide, grafting, acrylic acid, antibacterial functional groups, biofilms, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*.

Сведения об авторах

Карпунина Тамара Исаковна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии, Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера (ПГМА), 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: karpuninapsma@mail.ru

Якушева Дина Эдуардовна, кандидат технических наук, научный сотрудник, ИТХ УрО РАН; e-mail: dinayakusheva@yandex.ru

Кисельков Дмитрий Михайлович, кандидат технических наук, научный сотрудник, ИТХ УрО РАН; e-mail: dkiselkov@yandex.ru

Борисова Ирина Алексеевна, инженер, ИТХ УрО РАН; e-mail: ya.borisova-62@yandex.ru

Касаткин Иван Аркадьевич, аспирант, ИТХ УрО РАН; e-mail: ambersofdawn@gmail.com

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.