

تأثیر تیمار دو مرحله‌ای پلاسمای فرکانس پایین همراه با هیدروکسی اتیل متاکریلات بر چسبندگی باکتری‌ها بر روی شانت سیلیکونی مایع مغزی نخاعی

میلاد شفیعی زاده^۱

فاطمه ریاحی زانیانی^۲

علیرضا خوش نویسان^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۱۰/۲۸

چکیده

انحراف مایع مغزی نخاعی (CSF) با استفاده از شانت سیلیکونی رایج‌ترین درمان هیدروسفالی است، اما این وسیله به دلیل ماهیت زیست پلیمر آب‌گریز خود، موجب چسبندگی و کلونیزاسیون باکتری‌ها می‌شود. اصلاح سطح توسط تابش پلاسما یکی از بهترین روش‌ها برای پیشگیری از عفونت شانت از طریق افزایش آب‌دوستی سطح است. این مطالعه تأثیر تیمار دو مرحله‌ای پلاسما با فرکانس پایین بر گرافت‌کردن ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA) روی شانت‌های سیلیکونی را ارزیابی کرد. در مرحله نخست، نمونه‌ها با پلاسمای آرگون/اکسیژن تابش داده شدند تا سطح فعال شود و سپس در محلول HEMA غوطه‌ور شدند. در ادامه، کوپلیمریزاسیون پلاسما با آرگون روی سه گروه (A، B و C) به ترتیب به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام شد. زاویه تماس سطح (θ) پس از ۲۴ ساعت طی یک فرآیند برگشت‌پذیر افزایش یافت و تا ۱۶۸ ساعت تقریباً ثابت ماند. کاتترهای گروه A به دلیل اچ شدن سطح سیلیکون طی ۵ دقیقه تابش، بیشترین زبری و آب‌گریزی را نشان دادند. نتایج AFM و اندازه‌گیری θ در گروه C مشابه گروه کنترل بود، زیرا تابش ۱۵ دقیقه‌ای باعث تخریب و اچ مجدد سطح گرافت‌شده با HEMA شده بود. کاتترهای گروه B به دلیل شرایط بهینه گرافت PHEMA، بیشترین آب‌دوستی و صاف‌ترین سطح را داشتند. تصاویر مورفولوژی و شمارش کلونی نشان داد که اندازه کلونی‌ها و میزان چسبندگی باکتری‌ها در سطح گروه B به‌طور قابل توجهی کمتر بود. این پژوهش نشان می‌دهد که تیمار دو مرحله‌ای پلاسما با فرکانس پایین می‌تواند به‌طور مؤثری میزان عفونت شانت سیلیکونی را کاهش دهد.

واژگان کلیدی

شانت سیلیکونی مایع مغزی نخاعی، چسبندگی باکتری، HEMA پلاسما فرکانس پایین، آب‌دوستی

۱. استادیار، گروه جراحی مغز و اعصاب بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. دستیار تخصصی جراحی مغز و اعصاب، گروه جراحی مغز و اعصاب بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳. استاد گروه جراحی مغز و اعصاب بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (نویسنده مسئول):

khoshnevisanalireza@gmail.com

مقدمه

هیدروسفالی یک اختلال نورولوژیک است که با تجمع بیش از حد مایع مغزی نخاعی (CSF) ناشی از ترشح بیش از حد توسط شبکه کوروئید یا انسداد در مسیرهای CSF مشخص می‌شود و منجر به افزایش فشار داخل جمجمه می‌گردد. در میان روش‌های درمانی موجود، کارگذاری شانت CSF همچنان رایج‌ترین و مؤثرترین روش برای مدیریت طولانی‌مدت هیدروسفالی است و بیش از یک دهه است که به‌طور روتین مورد استفاده قرار می‌گیرد. این وسیله به‌طور مداوم CSF اضافی را از بطن‌های مغزی یا سیسترن‌ها به محلی خارج از جمجمه—مانند صفاق یا دهلیز—منتقل می‌کند، جایی که مایع جذب می‌شود.

شانت‌ها به‌طور قابل توجهی عوارض مرتبط با هیدروسفالی—از جمله سردرد، اختلالات بینایی، تشنج و مشکلات تعادلی—را کاهش داده‌اند، اما همچنان با عوارض پس از عمل، به‌ویژه عفونت شانت، همراه هستند. وارد کردن کاتتر بطنی می‌تواند باعث آسیب سلولی، صدمه بافتی و اختلال در سد خونی-مغزی (BBB) شود. این تغییرات موجب نفوذ ماکروفاژهای خونی و چسبندگی اجزای پلاسمایی مانند پلاکت‌ها و پروتئین‌های سرمی به سطح کاتتر شده و یک آشکار التهابی ایجاد می‌کند که در نهایت به انسداد شانت منجر می‌شود.

گونه‌های استافیلوکوک شایع‌ترین عوامل ایجاد عفونت شانت هستند، گرچه میکروارگانیزم‌های دیگری مانند سودوموناس آئروژینوزا، آسینتوباکتر، انتروکوک‌ها و برخی مخمرها نیز گزارش شده‌اند. پس از چسبیدن باکتری‌ها به سطح کاتتر، آن‌ها بیوفilm تشکیل می‌دهند—ساختارهای متراکم و مجتمع که در یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی محصور شده‌اند—و این امر آن‌ها را در برابر دفاع میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌کند. پیشگیری از عفونت شانت همچنان یکی از اولویت‌های اصلی در جراحی مغز و اعصاب است، زیرا این عفونت‌ها به‌طور قابل توجهی موربیدیتی بیمار و هزینه‌های درمانی را افزایش می‌دهند. مدیریت این وضعیت معمولاً نیازمند بستری، خارج کردن شانت، تجویز طولانی‌مدت آنتی‌بیوتیک و در نهایت کاشت شانت جدید است. از آن‌جا که آنتی‌بیوتیک درمانی به‌تنهایی به دلیل تشکیل بیوفilm غالباً کافی نیست، راهبردهایی برای کاهش چسبندگی و کلونیزاسیون باکتری از طریق اصلاح سطح مواد شانت توسعه یافته‌اند.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سطح مواد زیستی—از جمله ترشوندگی، مورفولوژی و توپولوژی—نقش مهمی در تعیین میزان چسبندگی باکتری و زیست‌سازگاری دارند. بسیاری از پلیمرها ذاتاً فاقد ویژگی‌های سطحی مطلوب برای کاربردهای پزشکی هستند و باید بدون تغییر خواص حجمی، سطح آن‌ها اصلاح شود. روش‌های مختلفی برای جلوگیری از عفونت شانت پیشنهاد شده است، از جمله اصلاح سطح با مونومرهای آب‌دوست یا تزریق عوامل ضد میکروبی مانند هپارین و نقره. در میان این‌ها، اصلاح سطح عملی‌تر، کم‌هزینه‌تر و کم‌اختلال‌تر از اصلاح حجمی است.

به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که سیلیکون گرافت‌شده با HEMA سطحی آب‌دوست‌تر نسبت به شبکه‌های پلیمری درهم‌تنیده (IPNs) دارد. روش‌های فیزیکی مختلفی برای اصلاح سطح بیوپلیمرها بررسی شده‌اند، از جمله تخلیه کرونا،

لیزر، پرتو یونی و تابش پلاسما. این روش‌ها ابزارهایی ضروری برای تنظیم ویژگی‌های بیولوژیک و فیزیکوشیمیایی سطوح پلیمری هستند و در ساخت دستگاه‌های پزشکی مانند پروتزهای مفصل، ایمپلنت‌های دندان، استنت‌های عروقی، دریچه‌های قلب مصنوعی، لنزهای داخل چشمی، ایمپلنت‌های قرنیه و کاتترها به‌طور گسترده استفاده می‌شوند.

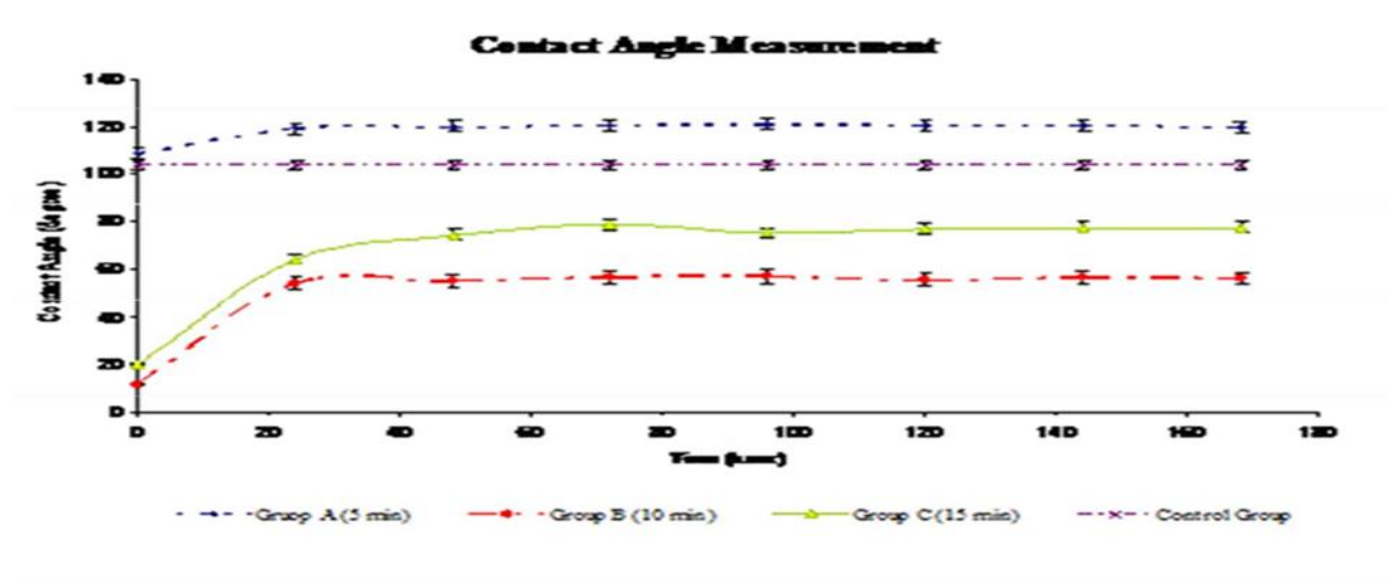
در میان تکنیک‌های اصلاح سطح، گرافت کردن سطح با مونومرهای آب‌دوست—مانند HEMA، اسید اکریلیک و آکریل‌آمید—به‌عنوان روشی بسیار مؤثر برای بهبود خواص سطحی سیلیکون مطرح شده است. تیمار پلاسما مزایای زیادی دارد: قابل اعتماد، تکرارپذیر، نسبتاً ارزان و مناسب برای اشکال مختلف است. این روش فقط لایه سطحی را تغییر می‌دهد بدون آن‌که خواص حجمی ماده را دست‌کاری کند و بسته به نوع گاز پلاسما می‌تواند سطح را آب‌دوست یا آب‌گریز کند. این ویژگی، پلاسما را به یکی از مؤثرترین راهبردها برای کاهش چسبندگی باکتری با افزایش آب‌دوستی سطح شانت سیلیکونی تبدیل می‌کند. فعال‌سازی سطح توسط پلاسما همچنین سایت‌های واکنش‌پذیر ایجاد می‌کند که گرافت شدن مونومرهای بعدی را تسهیل می‌کنند.

سیلیکون‌رابر به‌طور گسترده در بخش‌های مختلف سیستم شانت—از جمله کاتترها، محفظه‌ها و دریچه‌ها—به دلیل بی‌اثر بودن فیزیولوژیک، زیست‌سازگاری بالا، پایداری شیمیایی و سمیت کم استفاده می‌شود. اما به‌علت ماهیت آب‌گریز، سیلیکون به راحتی چسبندگی باکتری و تشکیل بیوفیلم را تسهیل می‌کند. به همین دلیل، از تکنیک‌های اصلاح سطح، به‌ویژه پلاسما، برای بهبود ویژگی‌های سطحی دستگاه‌های سیلیکونی استفاده شده است. پوشش‌های آب‌دوست با زاویه تماس ۴۰ تا ۶۰ درجه—که معمولاً به‌وسیله پلاسمای یک یا دو مرحله‌ای ایجاد می‌شوند—بهترین مقاومت باکتریایی را نشان داده‌اند. روش دو مرحله‌ای پلاسما نسبت به یک مرحله‌ای مزایایی دارد، از جمله زمان تابش کمتر، حذف نیاز به دفع گاز محلول و یکنواختی بهتر سطح.

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تیمار دو مرحله‌ای پلاسما با فرکانس پایین بر گرافت کردن HEMA روی شانت‌های سیلیکونی به‌منظور کاهش چسبندگی و عفونت باکتریایی طراحی شد. کاتترهای سیلیکونی در چهار گروه—سه گروه تیمار شده (A، B و C) و یک گروه کنترل—بررسی شدند. در مرحله اول، فعال‌سازی سطح با پلاسما انجام شد و سپس نمونه‌ها در محلول HEMA قرار گرفتند. در مرحله دوم، کوپلیمریزاسیون پلاسما روی نمونه‌های پیش‌تیمار شده انجام شد. ترشوندگی سطح با اندازه‌گیری زاویه تماس آب ارزیابی شد و AFM برای تحلیل توپولوژی سطح به کار رفت. آزمون‌های میکروبی با استفاده از *Staphylococcus epidermidis* جهت تعیین میزان چسبندگی باکتری انجام شد و SEM برای بررسی مورفولوژی سطح و کلونی‌های باکتریایی استفاده گردید.

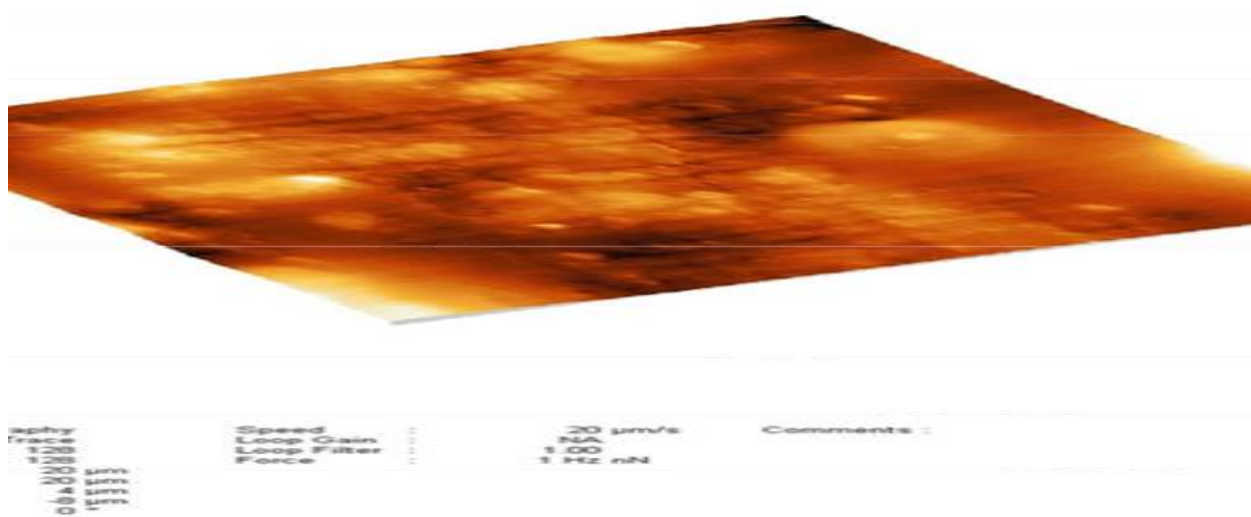
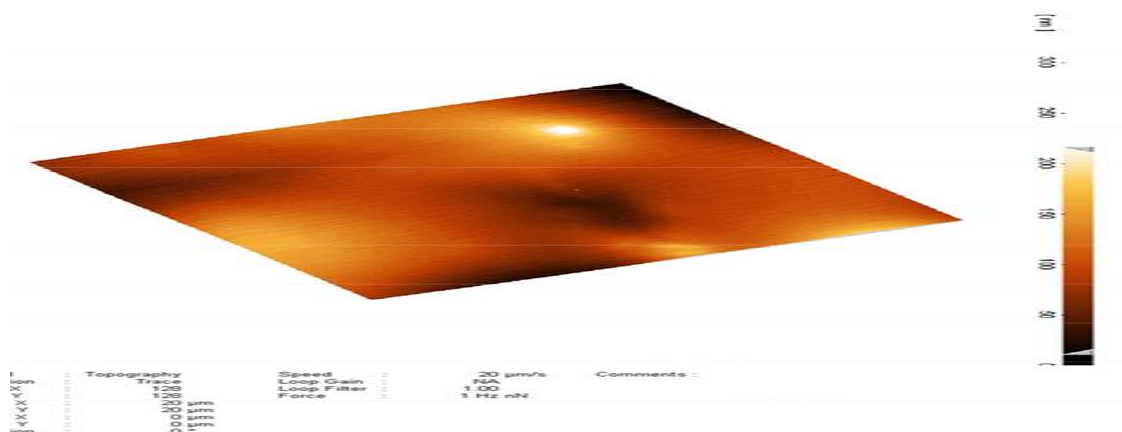
تصاویر و جداول

شکل ۱. وابستگی زاویه تماس سطح کاتترهای اصلاح نشده و اصلاح شده به مدت تابش پلاسما آرگون با فرکانس پایین در مرحله دوم در دمای اتاق



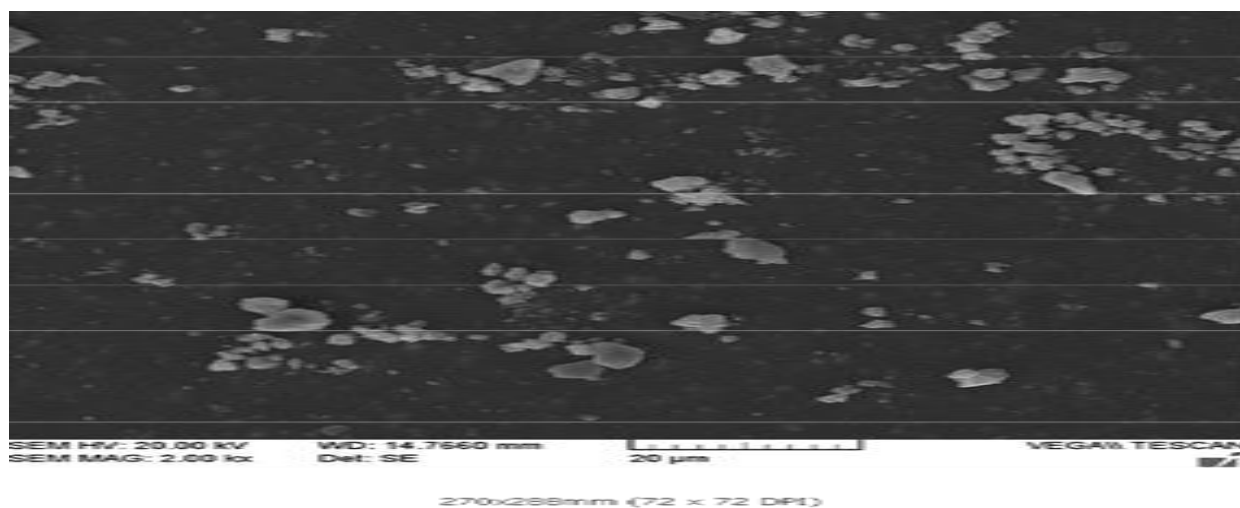
168x183mm (72 x 72 DPI)

شکل ۲. تصاویر سه‌بعدی AFM برای کاتترهای سیلیکونی تیمار شده (تصویر اول – فقط گروه B در دسترس است) و کاتترهای تیمار نشده (تصویر دوم). مساحت اسکن برابر با 20×20 میکرومتر مربع است

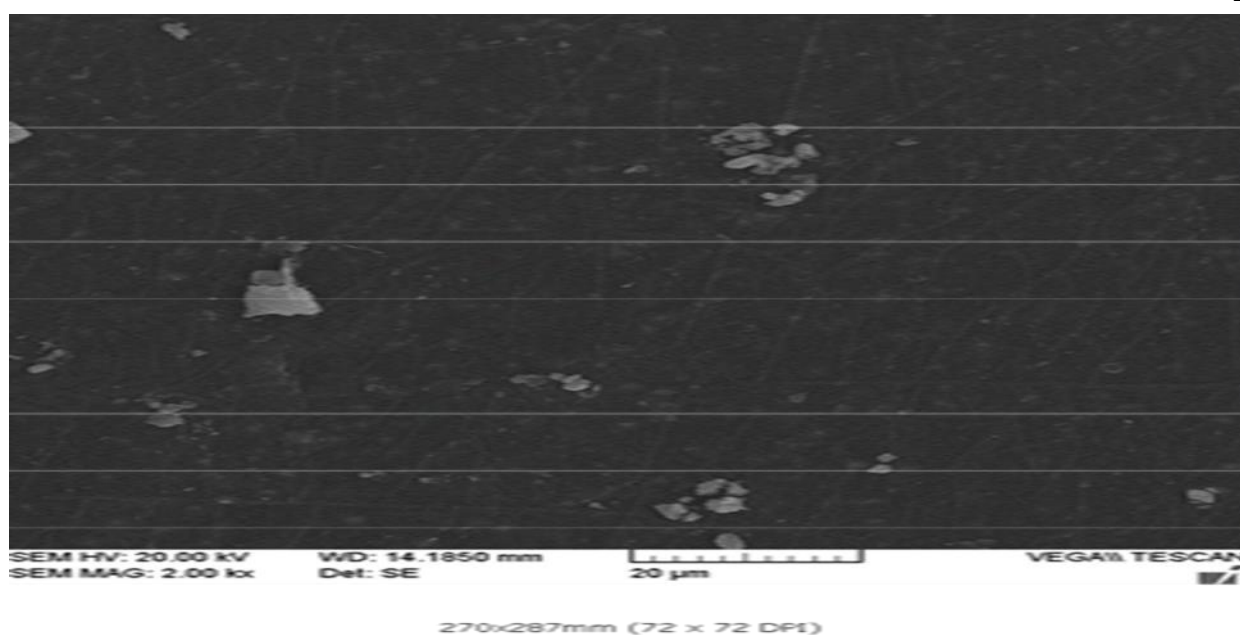


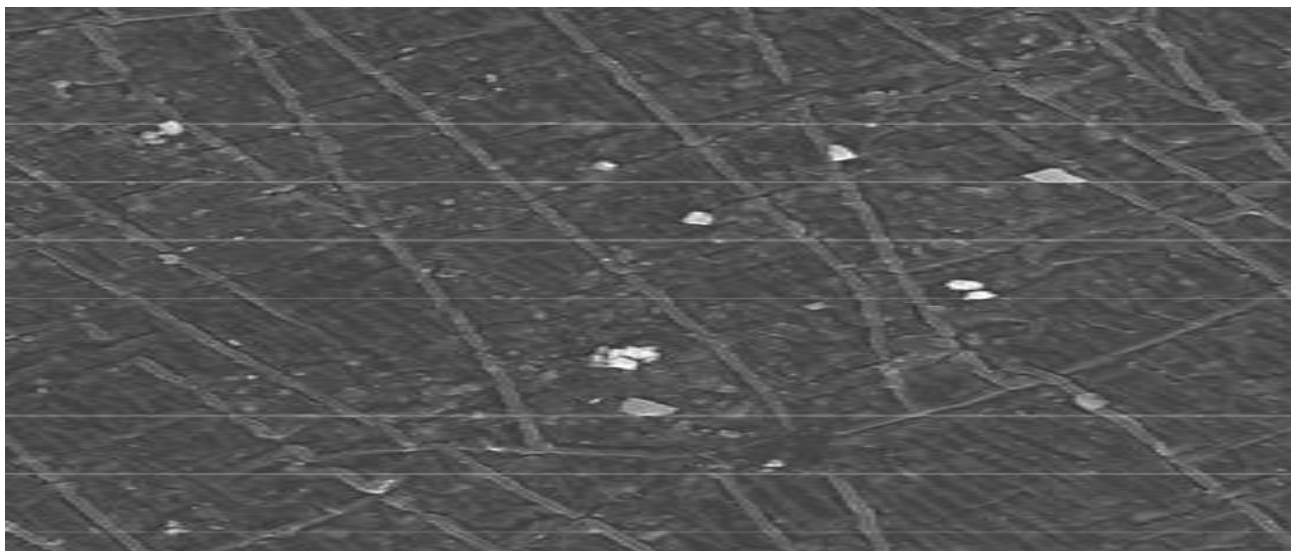
شکل ۳. A تصاویر مورفولوژیک حاصل از SEM از *Staphylococcus epidermidis* بر سطح کاتترهای سیلیکونی تیمار شده و تیمار نشده پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون (بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰ برابر). گروه‌های A، B، C و گروه کنترل به ترتیب نمایش داده شده‌اند.

A

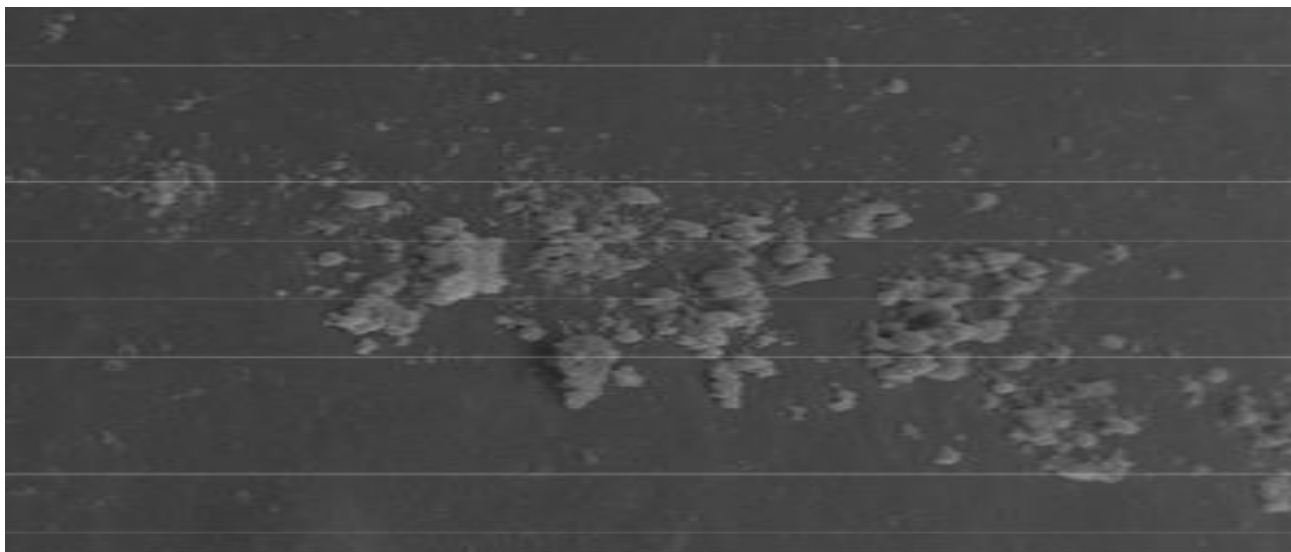


B



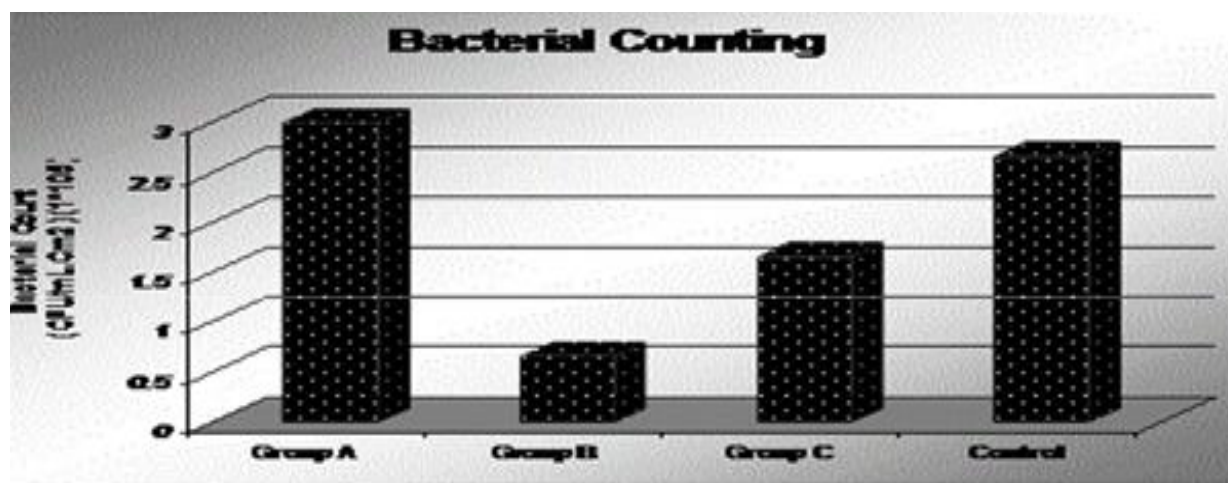


C



D

شکل ۴. منحنی میزان چسبندگی *Staphylococcus epidermidis* بر سطح کاتترها که با روش شمارش کلونی اندازه گیری شده است



183x183 mm (72 x 72 DPI)

جداول

جدول ۱. نتایج حاصل از AFM و اندازه کلونی در نمونه‌ها

Group	A	B	C	Control
Average Roughness (Ra) (nm)	102.0	23.5	49.0	42.1
Root Mean Square Roughness (Rq) (nm)	129.0	30.8	62.8	55.5
Size of Colony (μm)	2.5	0.4	1.0	7.5

جدول ۲. نتایج مربوط به میزان چسبندگی باکتری در نمونه‌ها

$\times 10^5$ (CFU/mL cm^2)	Group A	Group B	Group C	Control
Experiment 1	5	1	2	1
Experiment 2	1	0	2	4
Experiment 3	3	1	1	3
Mean	3	0.666667	1.666667	2.666667
St. Dev.	2	0.57735	0.57735	1.527525

مواد و روش‌ها

کاتترهای سیلیکونی استفاده شده در این مطالعه توسط شرکت Medtronic Neurosurgery (کالیفرنیا، آمریکا) تأمین شدند. مونومر ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA) (Merck, 800588) قبل از استفاده تحت وکیوم دوباره تقطیر شد تا هرگونه بازدارنده باقی‌مانده حذف گردد. سایر مواد شیمیایی و معرف‌های به کار رفته در این پژوهش از نوع تحلیلی (analytical grade) بودند و بدون خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

پوشش سطحی

تیمار پلازما با استفاده از یک ژنراتور فرکانس پایین (LF) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و یک محفظه شیشه‌ای خلأ برای پایداری سازی تخلیه پلازما انجام شد. پوشش‌دهی کاتترهای سیلیکونی با HEMA از طریق فرایند دو مرحله‌ای پلیمریزاسیون پلازما فرکانس پایین صورت گرفت که شامل دو مرحله است:

۱. فعال‌سازی سطح

۲. کوپلیمریزاسیون گرافت پلاسما

مرحله I: فعال سازی سطح

در این مرحله، تمامی کاتترهای سیلیکونی ابتدا تحت پیش تیمار پلاسما قرار گرفتند و سپس در معرض مونومر HEMA قرار گرفتند:

- پیش تیمار پلاسما: کاتترها در کف محفظه^۱ واکنش قرار داده شدند و به مدت ۴۵ دقیقه در پلاسمای فرکانس پایین تولیدشده از مخلوط گازی آرگون و اکسیژن (۵۰:۵۰، حجم/حجم) با توان ۹۰۰ وات قرار گرفتند تا سطح فعال شود.
- غوطه‌وری در مونومر: پس از فعال سازی، سه گروه آزمایشی (A، B و C) به مدت ۴۵ دقیقه در محلول آبی HEMA بدون گاز (۵۰٪ حجم/حجم) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها خارج شده و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شدند.

مرحله II: کوپلیمریزاسیون گرافت پلاسما

پس از خشک شدن، نمونه‌های پیش پوشش داده شده از گروه‌های A، B و C تحت کوپلیمریزاسیون گرافت پلاسما با آرگون در شرایط یکسان (۹۰۰ وات) قرار گرفتند، اما با مدت زمان‌های متفاوت: ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب. پس از تابش، نمونه‌ها با استخراج ساکسلت (Soxhlet) در آب مقطر تصفیه شدند تا مونومرها و هموپلیمرهای واکنش ندادند حذف شوند.

اندازه گیری زاویه تماس ثابت (θ)

زاویه تماس آب ثابت (θ) برای هر نمونه (سه نمونه در هر گروه) با روش قطره نشسته (sessile drop) اندازه گیری شد. یک قطره آب دیونیزه به حجم ۵ میکرولیتر روی سطح نمونه قرار گرفت و زاویه تماس در دمای 23 ± 3 درجه سانتی گراد با استفاده از گونیومتر (G10, Krüss, Hamburg, Germany) مجهز به نرم افزار تصویر برداری تعیین شد. برای هر نمونه، میانگین پنج اندازه گیری در نقاط مختلف سطح ثبت گردید.

برای بررسی بازگشت پذیری ترشوندگی سطح، نمونه‌های تیمار شده در ویال شیشه‌ای در دمای اتاق (رطوبت نسبی ۳۰٪) نگهداری شدند و زاویه تماس به طور دوره‌ای طی یک هفته پایش شد (شکل ۱).

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

توپوگرافی سطح کاتترهای سیلیکونی تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) (Dual Scope 195-200E, DME, دانمارک) بررسی شد. کاتترهای گروه‌های A، B، C و کنترل از محفظه پلاسما خارج، به قطعات ۰.۵ سانتی متری برش داده شده و روی نگهدارنده‌های استیل با چسب دوطرفه نصب شدند. تصویربرداری AFM در حالت تپینگ (tapping mode) با نرخ اسکن ۱ هرتز، اندازه اسکن 20×20 میکرومتر و 128×128 نقطه داده در هر اسکن انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار تحلیل تصویر DME (نسخه ۲.۳) تحلیل گردید. میانگین زبری (Ra) و ریزترین مربع زبری (Rq) محاسبه شده و در جدول ۱ خلاصه شده است.

میکروارگانیزم و آماده‌سازی کشت

برای آزمایش از سویه باکتری *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) که توانایی تشکیل بیوفilm دارد، استفاده شد. ابتدا باکتری روی محیط Tryptic Soy Agar (TSA; Difco Laboratories, Detroit, MI) کشت شد و سپس به Tryptic Soy Broth (TSB) منتقل شد تا در فاز لگاریتمی رشد کند. کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با تکان دادن ۳۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند.

چگالی باکتری به 1.0×10^8 CFU/mL (معادل $OD_{600} = 0.20$) با استفاده از اسپکتروفتومتر تنظیم شد تا تلقیح یکنواخت برای تمامی آزمایش‌ها فراهم شود.

آزمون چسبندگی باکتری

چسبندگی باکتری برای تعیین میزان اتصال میکروبی به سطح کاتترهای تیمار شده و تیمار نشده ارزیابی شد (شکل ۴). چهار نمونه دیسکی از هر گروه با اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه استریل شده و در پلیت‌های ۱۲ چاهک استریل (Corning, NY) قرار گرفتند.

به هر چاهک ۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری (1.0×10^8 CFU/mL) اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان ۱۵۰ rpm انکوبه شدند. باکتری‌های غیرچسبنده با شستشوی سه‌باره هر نمونه با ۱۵ میلی‌لیتر PBS 0.01 M حذف شدند.

سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر PBS منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سونویکیشن (Branson 1510 RMT, 70 W, 42 kHz) شستشو شدند تا باکتری‌های چسبیده جدا شوند. سوسپانسیون‌های به‌دست آمده به صورت رقیق‌سازی سریالی (۱:۱۰، ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰) انجام شد و ۰.۰۵ میلی‌لیتر از هر رقیق شده روی محیط TSA کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلونی‌های باکتری شمارش شدند تا میزان چسبندگی تعیین شود.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای مشاهده کلونی‌ها و مورفولوژی باکتری، تصویربرداری SEM روی کاتترهای تیمار شده و تیمار نشده انجام شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، نمونه‌ها سه‌بار با PBS 0.01 M شسته شده و با گلو تار آلدئید ۲٪ (v/v در PBS) به مدت ۱ ساعت تثبیت شدند.

نمونه‌ها به صورت مرحله‌ای در محلول‌های اتانول با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ v/v، هر مرحله ۱۵ دقیقه) خشک شده، سپس در دسیکاتور خشک و روی پایه‌های فلزی با چسب هادی دوطرفه نصب شدند. پوشش طلا با جریان ۲۰ میلی‌آمپر به مدت ۳ دقیقه توسط Sputter Coater (K450, EMITECH, انگلستان) اعمال شد.

تصاویر SEM با استفاده از VEGA II SEM (TESCAN, جمهوری چک) در ولتاژ ۲۰ kV و بزرگ‌نمایی‌های $2,000\times$ و $25,000\times$ ثبت شد تا مورفولوژی سطح و تجمع باکتری‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

آزمون سیتوتوکسیسیته (Cytotoxicity Assay)

سیتوتوکسیسیته کاترهای سیلیکونی گرافت‌شده با HEMA طبق استاندارد ASTM F813 و با استفاده از سلول‌های فیروبلست L-929 موش (بانک سلولی ملی، مؤسسه پاستور ایران) ارزیابی شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 حاوی ۷۵ IU/mL پنی‌سیلین، ۷۵ $\mu\text{g/mL}$ استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (FBS, Gibco BRL Laboratories) کشت داده شدند و در شرایط ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از رسیدن به تراکم کامل، سلول‌ها با استفاده از اسکرپر سلولی (NUNC, دانمارک) برداشت شدند و تعلیق حاوی 4×10^5 سلول/میلی‌لیتر تهیه گردید. نمونه‌ها با اتانول ۷۰٪ استریل شده، سه بار با آب مقطر استریل شسته و در پلیت‌های ۶ چاهکی پلی‌استایرن (NUNC, دانمارک) قرار گرفتند.

به هر چاهک ۵ میلی‌لیتر تعلیق سلولی اضافه شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی خالی گذاشته شد و چاهک دیگری حاوی لاتکس به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس مورفولوژی و زنده‌مانی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس (TS-100 Nikon, ژاپن) در بزرگ‌نمایی $200\times$ بررسی شد. نتایج

نتایج

ترشوندگی سطح (Surface Wettability)

نتایج اندازه‌گیری زاویه تماس آب ثابت قبل و بعد از تیمار پلاسما در شکل ۱ نشان داده شده است. کاتر سیلیکونی تیمارنشده دارای زاویه تماس بالای $101^\circ \pm 2^\circ$ بود که نشان‌دهنده آب‌گریزی ذاتی آن است. پس از پلیمریزاسیون پلاسما با ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA)، کاهش قابل توجهی در زاویه تماس در تمام گروه‌های تیمارنشده مشاهده شد. به‌طور خاص، زاویه تماس گروه‌های A، B و C به ترتیب $56^\circ \pm 3^\circ$ ، $49^\circ \pm 2^\circ$ و $45^\circ \pm 2^\circ$ بود که نشان می‌دهد طولانی‌تر بودن زمان تابش پلاسما منجر به افزایش آب‌دوستی سطح شده است. با این حال، پس از نگهداری در هوا به مدت ۷ روز، کمی بازگشت آب‌گریزی رخ داد، اما زاویه تماس همچنان بسیار کمتر از نمونه تیمارنشده باقی ماند، که نشان‌دهنده پایداری اصلاح سطح است.

مورفولوژی سطح (تحلیل AFM)

تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) تفاوت‌های مشخصی در توپولوژی سطح بین کاترهای تیمارنشده و تیمارنشده نشان دادند (شکل ۲). سطح سیلیکون اصلاح‌نشده صاف و بدون ویژگی بود، در حالی که نمونه‌های تیمارنشده زبری بیشتری با برجستگی‌ها و فرورفتگی‌های نانومتری داشتند. مقادیر میانگین زبری (R_a) و ریزترین مربع زبری (R_q) از گروه A تا گروه C به‌طور پیوسته افزایش یافت (جدول ۱)، که با طولانی‌تر شدن زمان تابش پلاسما همخوانی

دارد. افزایش زبری سطح نمونه‌های تیمار شده نشان‌دهنده موفقیت در گرافت زنجیره‌های پلیمری HEMA روی زیرلایه سیلیکونی است.

شناسایی شیمیایی سطح (تحلیل FTIR)

طیف‌های FTIR (نشان داده نشده) موفقیت‌آمیز بودن افزودن گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربونیل روی سطح سیلیکون پس از تیمار پلاسما را تأیید کردند. پیک‌های جذبی جدید در 1720 cm^{-1} (کشیدگی C=O) و 3400 cm^{-1} (کشیدگی O-H) در طیف نمونه‌های اصلاح شده ظاهر شدند که با ساختار شیمیایی پلی (HEMA) همخوانی دارد. این نتایج نشان می‌دهد که کوپلیمریزاسیون گرافت پلاسما به‌طور مؤثری گروه‌های قطبی را روی سطح کاتر سیلیکونی وارد کرده و آب‌دوستی سطح و سازگاری بیوالکترونیکی را بهبود بخشیده است.

چسبندگی باکتری و تشکیل بیوفیلم

تعداد سلول‌های *Staphylococcus epidermidis* چسبیده به سطح سیلیکونی تیمار نشده به‌طور معنی‌داری بیشتر از تمام نمونه‌های تیمار شده بود ($p > 0.05$). در میان گروه‌های تیمار شده، گروه C (۱۵ دقیقه تابش پلاسما) کمترین چسبندگی باکتری را داشت که تقریباً ۷۸٪ کاهش نسبت به کنترل را نشان داد. روند مشاهده شده نشان می‌دهد که افزایش آب‌دوستی و زبری سطح ناشی از تابش پلاسما طولانی، چسبندگی میکروبی را کاهش داده است، احتمالاً با تغییر انرژی سطح و محدود کردن کلونیزاسیون باکتری‌ها.

تصاویر SEM (شکل ۳) این یافته‌ها را تأیید کردند. در سطوح تیمار نشده، تجمعات متراکم باکتری و ساختارهای بیوفیلم دیده شد، در حالی که در نمونه‌های گرافت شده با HEMA، تنها سلول‌های باکتری کمی پراکنده مشاهده شد. ساختار مورفولوژیک باکتری‌ها سالم باقی ماند، که نشان می‌دهد کاهش چسبندگی عمدتاً ناشی از اصلاح فیزیکوشیمیایی سطح است نه اثر کشنده باکتریایی.

ارزیابی سیتوتوکسیسیته

نتایج آزمون سیتوتوکسیسیته در شکل ۵ نشان داده شده است. سلول‌های فیروبلاست موش (L-929) مورفولوژی طبیعی و رشد سالمی را هنگام کشت در تماس با کاترهای سیلیکونی گرافت شده با HEMA در تمام گروه‌های تیمار شده نشان دادند. هیچ تفاوت معنی‌داری در مورفولوژی یا زنده‌مانی سلول‌ها بین نمونه‌های تیمار شده و کنترل منفی مشاهده نشد ($p < 0.05$) که نشان‌دهنده غیرسمی بودن سطح‌های اصلاح شده است. در مقابل، کنترل مثبت (لاتکس) باعث گرد شدن و جدا شدن واضح سلول‌ها شد که اعتبار آزمون را تأیید کرد.

به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که پوشش‌های HEMA گرافت شده با پلاسما روی کاترهای سیلیکونی، آب‌دوستی و سازگاری زیستی سطح را افزایش داده و چسبندگی باکتری را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهند.

بحث

تغییر سطح کاتترهای سیلیکونی با استفاده از پلیمریزاسیون پلاسما القا شده با مونومرهای آب‌دوست مانند ۲- هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA) یک روش مؤثر و قابل کنترل برای بهبود ویژگی‌های سطح است، بدون آنکه خواص کلی (bulk) ماده تغییر کند [۱۴، ۱۹، ۲۰]. مطالعه حاضر نشان داد که تیمار پلاسما با فرکانس پایین موفق شد مولکول‌های HEMA را روی سطح سیلیکون گرافت کند، که منجر به افزایش آب‌دوستی، افزایش زبری سطح و کاهش چسبندگی باکتری‌ها شد، در حالی که سازگاری زیستی حفظ گردید.

کاهش زاویه تماس پس از پلیمریزاسیون پلاسما، موفقیت در افزودن گروه‌های عاملی آب‌دوست مانند هیدروکسیل (OH) و کربونیل (C=O) را تأیید می‌کند. یافته‌های مشابهی در مطالعات قبلی گزارش شده است، که در آن پوشش‌های poly(HEMA) گرافت‌شده با پلاسما باعث کاهش آب‌گریزی و بهبود ترشوندگی سطح شدند [۱۵، ۱۶]. بازگشت جزئی آب‌گریزی در طول زمان می‌تواند به بازچینی سطحی یا مهاجرت گروه‌های کم‌انرژی از داخل ماده به سطح نسبت داده شود، که پدیده‌ای شناخته شده در پلیمرهای اصلاح‌شده با پلاسما است [۱۷].

تحلیل AFM نشان داد که زبری سطح با طول زمان تابش پلاسما به‌وضوح افزایش یافته است. افزایش زبری سطح، سطح بیشتری برای جذب پروتئین و رفتار چسبندگی سلولی فراهم می‌کند [۱۸]. ترکیب اصلاحات شیمیایی و توپولوژیکی نقش مهمی در عملکرد بیولوژیکی دستگاه‌های پزشکی مبتنی بر سیلیکون دارد، زیرا هر دو پارامتر به طور مستقیم بر تعامل باکتری‌ها و سلول‌ها تأثیر می‌گذارند.

نتایج چسبندگی باکتری نشان داد که *Staphylococcus epidermidis* به طور چشمگیری روی کاتترهای گرافت‌شده با HEMA کاهش یافته است، به‌ویژه در نمونه‌هایی که طولانی‌تر تحت تابش پلاسما بودند (گروه C). این یافته با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد که افزایش آب‌دوستی سطح باعث کاهش چسبندگی میکروبی می‌شود، زیرا تعاملات هیدروفوبیک بین دیواره سلولی باکتری و زیرلایه کاهش می‌یابد [۱۹، ۲۰]. علاوه بر این، شیب‌های انرژی صاف‌تر و حضور گروه‌های آب‌دوست از تشکیل بیوفیلم‌های پایدار جلوگیری می‌کند، که برای توسعه عفونت در دستگاه‌های پزشکی دائمی حیاتی است.

تصاویر SEM نتایج کمی چسبندگی را تأیید کردند؛ سطوح سیلیکونی تیمارنشده دارای لایه‌های متراکم باکتری بودند، در حالی که سطوح اصلاح‌شده تنها دارای سلول‌های باکتری پراکنده بدون ماتریکس بیوفیلم قابل مشاهده بودند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اصلاح سطح با HEMA گرافت‌شده با پلاسما اثر کشنده باکتریایی ندارد، بلکه محیطی ایجاد می‌کند که برای کلونیزاسیون باکتری نامساعد است.

همچنین، ارزیابی سیتوتوکسیسیته نشان داد که سطوح اصلاح‌شده هیچ اثر منفی بر سلول‌های فیروبلاست موش (L-929) ندارند و سازگاری زیستی پوشش‌های HEMA را تأیید می‌کند. مورفولوژی و تکثیر سلول‌ها با گروه کنترل قابل مقایسه بود، که نشان می‌دهد پلیمریزاسیون پلاسما مواد سمی باقی‌مانده یا تغییر پایداری فیزیکوشیمیایی سیلیکون ایجاد

نکرده است. این یافته با گزارش‌های مطالعات قبلی همسو است که نشان می‌دهند فیلم‌های پلیمری HEMA القا شده با پلاسما توسط سلول‌های پستانداران به خوبی تحمل می‌شوند [۲۱، ۲۲].

به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که عملیات سطحی با کمک پلاسما یک روش ساده، بدون حلال و سازگار با محیط زیست است که قادر به تولید پوشش‌های پایدار آب‌دوست با بهبود سازگاری زیستی و خواص ضدچسبندگی است. این روش می‌تواند به راحتی برای سایر پلیمرهای پزشکی نیز به کار رود و دامنه کاربرد آن را به طیف وسیعی از دستگاه‌های پزشکی شامل کاتترها، شانت‌ها و ایمپلنت‌ها که نیاز به مقاومت در برابر عفونت و سازگاری سطحی دارند، گسترش دهد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تیمار پلاسما دو مرحله‌ای با فرکانس پایین یک روش مؤثر و قابل اعتماد برای اصلاح سطح کاتترهای سیلیکونی است. این تکنیک باعث افزایش آب‌دوستی سطح، بهبود ویژگی‌های توپولوژیکی و کاهش قابل توجه چسبندگی باکتری و تشکیل بیوفیلم می‌شود، بدون آنکه سازگاری زیستی ماده مختل شود.

در مقایسه با تیمارهای تک مرحله‌ای، فرایند پلاسما دو مرحله‌ای امکان کنترل دقیق‌تر گرافت مونومر ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA) را فراهم می‌کند و پوشش‌دهی بهینه و یکنواخت سطح را تضمین می‌کند. همبستگی مشاهده شده بین افزایش آب‌دوستی و کاهش کلونیزاسیون میکروبی نشان‌دهنده نقش حیاتی شیمی سطح در پیشگیری از عفونت‌های مرتبط با دستگاه‌ها است.

علاوه بر این، این روش نسبتاً کم‌هزینه، قابل بازتولید و قابل تطبیق با هندسه‌های مختلف پلیمر است و آن را برای طیف گسترده‌ای از دستگاه‌های پزشکی شامل شانت‌ها، کاتترها و ایمپلنت‌ها مناسب می‌سازد. اگرچه افزایش آب‌دوستی یک عامل کلیدی در کاهش چسبندگی باکتری است، اما تنها عامل تعیین‌کننده پیشگیری از عفونت نیست و ویژگی‌های سطحی دیگر مانند زبری، عملکرد شیمیایی و توپولوژی نیز نقش مهمی دارند.

در مجموع، تیمار دو مرحله‌ای LF پلاسما روی سطح سیلیکون یک استراتژی عملی و مقیاس‌پذیر برای افزایش مقاومت در برابر عفونت و بهبود سازگاری زیستی دستگاه‌های پزشکی پلیمری ارائه می‌دهد و چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای برای افزایش ایمنی بیماران در کاربردهای بالینی فراهم می‌کند.

منابع و مأخذ

1. Malaysian Journal of Medical Sciences. Malaysian Journal of Medical Sciences, 2011; 18(1): 30–37.
2. De Aquino HB, Carelli EF, Borges Neto AG, Pereira CU. Nonfunctional abdominal complications of distal shunt in hydrocephalus treatment: An inflammatory hypothesis? Report of six cases. Child's Nervous System, 2006; 22(10): 1225–1230.
3. Fitch MT, Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: Inflammation after CNS injury increases potential inhibitory molecules. Experimental Neurology, 1997; 148(2): 587–603.

4. Zhong Y, Bellamkonda RV. Biomaterials for the central nervous system. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008; 5(26): 957–975.
5. Choksey MS, Malik IA. Zero tolerance to shunt infections: Is it achievable? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2004; 75(1): 87–91.
6. Choux M, Genitori L, Lang D, Lena G. Shunt implantation: Reducing the incidence of shunt infection. *Journal of Neurosurgery*, 1992; 77(6): 875–880.
7. Bayston R, Bhundia C, Ashraf W. Do hydromer-coated shunts prevent infection? *Journal of Neurosurgery*, 2005; 102(2): 207–212.
8. Kobayakawa S, BD J, Gilmore MS. Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. *Current Eye Research*, 2005; 30(9): 741–745.
9. John RW, Riva-Cambrin J, Wellons JC, Kulkarni AV, William E. Standardized protocol to reduce cerebrospinal fluid shunt infection: Hydrocephalus Clinical Research Network quality improvement initiative. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 2011; 8(1): 22–29.
10. Kestle JR, Garton HJ, Whitehead WE, Drake JM, Kulkarni AV, Cochrane DD. Management of shunt infections: A multicenter pilot study. *Journal of Neurosurgery*, 2006; 105(3): 177–181.
11. Furno F. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevent infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54(6): 1019–1024.
12. Liang X, Wang A, Cao T, Tang H, McAllister JP, Salley SO, Ng KY. Effect of molded silicone/rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006; 76(3): 580–588.
13. Bayston R, Ashraf W, Bhundia C. Mechanism of an antimicrobial biomaterial for use in hydrocephalus shunts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 53(5): 778–782.
14. Salati A, Keshvari H, Karkhaneh A, Taranejoo S. Design and fabrication of artificial skin: Immobilization of chitosan and gelatin on silicone by polyacrylic acid grafted via plasma surface modification. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 2011; 50(10).
15. Cokeliler D, Caner H, Zemek J, Choukourov A, Biederman H, Mutlu M. Plasma polymerization technique to overcome cerebrospinal fluid shunt infections. *Biomedical Materials*, 2007; 2(1): 39–47.
16. Ritz R, Roser F, Morgalla M, Dietz K, Tatagiba M, Will BE. Do antibiotic-impregnated shunts in hydrocephalus therapy reduce the risk of infection? *BMC Infectious Diseases*, 2007; 7: 38.
17. Kan P, Kestle J. Lack of efficacy of antibiotic-impregnated shunts in preventing shunt infection in children. *Child's Nervous System*, 2007; 23(7): 773–777.
18. Lee SH, Kong DS, Seol HJ, Shin HJ. Endoscopic third ventriculostomy in patients with shunt malfunction. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 2011; 49(4): 217–221.
19. Abbasi F, Mirzadeh H, Katbab AA. Bulk and surface modification of silicone rubber for medical applications. *Polymer International*, 2002; 51(8): 882–888.
20. Vladkova TG, Minchev M, Kostadinova A, Altankov G, Dineff P, Keranov I. Topography characterization and initial cell interaction of PDMS surfaces treated with Ar plasma beam. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009; 111(5): 2637–2646.
21. Bilek MM, McKenzie DR. Plasma-modified surfaces for covalent immobilization of functional biomolecules without chemical linkers: A step towards biosensors and the next generation of medical implants. *Biophysical Reviews*, 2010; 2(2): 55–65.

22. Cagavi F, Akalan N, Celik H, Gur D, Guciz B. Effect of hydrophilic coating on microorganism colonization of silicone tubing. *Acta Neurochirurgica*, 2004; 146(6): 603–610.
23. Karkhaneh A, Mirzadeh H, Ghaffariyeh AR. Simultaneous graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto polydimethylsiloxane surface using two-step plasma treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007; 105(4): 2208–2217.
24. Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. The influence of surface properties on *Staphylococcus epidermidis* adhesion to acrylic and silicone. *International Journal of Biomaterials*, 2009; 1–9.
25. Rhodes NP, Wilson DJ, Williams RL. *Biomaterials*, 2007; 28(26): 4561–4570. Wilson DJ, Rhodes NP, Williams RL. *Biomaterials*, 2003; 24(3): 5069–508.
26. Tang H, Cao T, Wang A, Liang X, Salley SO, McAllister JP. Effect of surface modification of silicone on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007; 80(4): 885–894.