

WPLÝW POLIURETANÓW Z SYNTETYCZNYM POLIHIDROKSYMAŚLANEM NA WZROST MIKROORGANIZMÓW

JOANNA BRZESKA^{1*}, HELENA JANIK², MAREK KOWALCZUK³,
MARIA RUTKOWSKA¹

¹AKADEMIA MORSKA W GDYNIA,
KATEDRA CHEMII I TOWAROWNIAWSTWA PRZEMYSŁOWEGO,
UL. MORSKA 83, 81-225 GDYNIA, POLSKA

²POLITECHNIKA GDAŃSKA, KATEDRA TECHNOLOGII POLIMERÓW,
UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK, POLSKA

³POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. SKŁODOWSKA-CURIE 34, 41-800 ZABRZE, POLSKA

* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań oddziaływania nowych alifatycznych poliuretanów (PUR), otrzymanych z udziałem ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu (a-PHB), na wzrost Staphylococcus aureus, Escherichia coli i Candida albicans wokół próbek polimerów. Strefa zahamowania wzrostu mikroorganizmów oznaczona została także dla handlowego, biomedycznego poliuretanu - ChronoThane T oraz dla czystego rozpuszczalnika, użytego do syntezy poliuretanów (N,N-dimetyloformamidu).

Najbardziej wrażliwym na działanie materiału poliuretanowego w warunkach prowadzenia doświadczenia był szczep Staphylococcus aureus, najmniej zaś - Candida albicans. Wykluczono wpływ czystego rozpuszczalnika na wzrost mikroorganizmów. Natomiast ChronoThane T tylko w niewielkim stopniu ograniczył ich wzrost. Stwierdzono więc, że obecność poli([R,S]-3-hydroksymaślanu w strukturze poliuretanów wpłynęła na ich właściwości biostatyczne.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 73-78]

Wprowadzenie

Poliuretany (PUR) to materiały bardzo często stosowane w medycynie [1-4]. Ich właściwości mogą być łatwo modyfikowane, zatem PUR może być otrzymany, jako tworzywo o cechach odpowiednich zarówno dla degradowalnych, jak i niedegradowalnych implantów [5-7]. Materiał na wszczepy sztuczne może być biostatyczny dzięki użyciu odpowiednich substratów podczas syntezy (chemicznie lub fizycznie związanych z polimerem) albo przez modyfikacje powierzchni (wprowadzając wydzielane lub związane biocydy [8-10] lub antybiotyki [11] lub też pokrywając powierzchnię bakteriostatyczną powłoką [12]).

Jedną z metod otrzymania biokompatybilnych poliuretanów jest użycie w syntezie substratów, naturalnie występujących w organizmie (jak fosfatydylocholina [13]) lub też ulegających degradacji do produktów naturalnych, jak poli([R]-3-hydroksymaślan) (PHB) [14-17].

Produkt degradacji PHB – kwas 3-hydroksymasłowy - należy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, charakteryzujących się właściwościami przeciwbakteryjnymi [18]. Główną przyczyną zahamowania wzrostu bakterii przez kwasy tłuszczowe jest ich wnikanie przez błony komórkowe, a następnie dysocjacja na aniony i kationy w cytoplazmie komórki bakterii.

INFLUENCE OF POLYURETHANES BASED ON SYNTHETIC POLY([R,S]- 3-HYDROXYBUTYRATE) ON MICROORGANISMS GROWTH

JOANNA BRZESKA^{1*}, HELENA JANIK², MAREK KOWALCZUK³,
MARIA RUTKOWSKA¹

¹GDYNIA MARITIME UNIVERSITY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY,
83 MORSKA STREET, 81-225 GDYNIA, POLAND

²GDAŃSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF POLYMER TECHNOLOGY,
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-952 GDAŃSK, POLAND

³POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
34 SKŁODOWSKA-CURIE STREET, 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

Abstract

In the present study the influence of novel aliphatic polyurethanes (PUR), based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB), on growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans in the area around polymer samples has been estimated. For comparison measurement of zone of inhibition was also performed for ChronoThane T – the medical grade aliphatic polyurethane and for pure solvent - N,N-dimethylformamide used in the synthesis of polyurethanes.

Staphylococcus aureus was the most sensitive microorganism to polymer material in conditions of investigation whereas Candida albicans – the most resistant. The influence of pure solvent on microorganisms growth was excluded and ChronoThane T only in small degree restricted bacterial vitality so it was concluded that presence of poly([R,S]-hydroxybutyrate) in polymer structure was responsible for biostatic properties of obtained polyurethanes.

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 73-78]

Introduction

Polyurethanes (PURs) belong to materials which are very often used in medicine [1-4]. Their properties can be easily modified, so PURs can be produced as material with appropriate features for degradable or non-degradable implants [5-7]. Material for artificial grafts can be designed as biostatic by using proper substrates during synthesis (bonded by chemical or physical interactions), or by surface modification (by using of leachable or non-leachable biocides [8-10] or antibiotics [11] or surface covering by bacteriostatic cover [12]).

One of the methods of obtaining biocompatible polyurethanes is using substrates, which naturally exist in human organism (like phosphatidylcholine [13]), or degrade into natural products, like poly([R]-3-hydroxybutyrate) (PHB) [14-17].

Product of PHB degradation - 3-hydroxybutyric acid - belongs to short-chain fatty acids and reveals antibacterial activity [18]. The major mechanism of growth inhibition caused by short-chain fatty acids is its passing by bacteria cells and dissociating into anions and protons in cytoplasm.

Dla utrzymania pH cytoplazmy na odpowiednim poziomie, nadmiar protonów jest usuwany kosztem dużych strat energii komórki bakterii. Ponadto niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe zaburzają przepuszczalność błon komórkowych i transport substancji odżywczych [18].

Syntetycznym odpowiednikiem PHB jest chemicznie otrzymany ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) (a-PHB), którego oligomery są biokompatybilne [19].

Białka ulegają adsorpcji na powierzchni materiału w ciągu kilku sekund od umieszczenia implantu w organizmie żywym. Natychmiast składniki krwi (trombocyty, komórki endotelium i fibroblasty), oraz bakterie i grzyby przyczepiają się do warstwy białkowej i – mimo profilaktyki antybiotykowej – wywołując infekcję miejsca operowanego. Zatem istotna jest zdolność materiału do selektywnej adsorpcji białek i przeciwdziałania adhezji mikroorganizmów.

Mimo, że przy szeroko rozwiniętej profilaktyce antyseptycznej oraz zalecanej przy wszystkich zabiegach i operacjach z wprowadzeniem materiałów syntetycznych antybiotykoterapii profilaktycznej rzadko dochodzi do zakażeń, to jednak zainfekowanie rany pooperacyjnej ciągle może być przyczyną odrzucenia implantu lub wywołać ogólnoustrojową infekcję. Zakażenia protez naczyniowych obejmują 1-5% operowanych chorych [11], zaś 13,2% pacjentów zostaje zainfekowanych podczas cewnikowania [20]. Zakażenie materiału polimerowego nastąpić może wskutek niewłaściwego przechowywania implantu lub niesterylnych warunków operacji. Mikroorganizmy mogą też być przeniesione z zainfekowanych miejsc w organizmie, jak zęby lub gardło.

Do mikroorganizmów, będących najczęstszą przyczyną zakażeń wczesnych, które pojawiają się do kilku tygodni po operacji, należą: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* i *Klebsiella species*. Zakażenia późne (ujawniające się nawet po kilku miesiącach lub latach od zabiegu) wywoływane są najczęściej przez *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas species* i *Staphylococcus epidermidis* [11]. W chirurgii ortopedycznej, ze względu na stosowane tam syntetyczne wszczepy, 55% to zakażenia wywołane przez *Staphylococcus epidermidis*, 10-20% przez *Staphylococcus aureus*, zaś pozostałe przez *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* i grzyby *Candida* [21]. Natomiast infekcje cewników wewnątrznaczyniowych (intravascular catheter-associated infections) wywoływane są przez koagulazoujemne *Staphylococci* (40%), *Staphylococcus aureus* (20%) i grzyby, zwłaszcza przez *Candida albicans* (10%) [22].

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) to bardzo oporny na leki przedstawiciel bakterii Gram-dodatnich. *Staphylococcus aureus* jest często przyczyną infekcji ran pooperacyjnych (20% przypadków sepsy wywołanych jest przez gronkowca złocistego [23]), z powodu łatwego przylegania do powierzchni naturalnych organów, jak i wprowadzonych implantów sztucznych. Jest jedną z nielicznych bakterii, posiadającą receptory rozpoznające i przyczepiające się do fibronektyny [20,23].

Pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*) (bakterie Gram-ujemne) stanowi fizjologiczną florę układu pokarmowego człowieka i zwierząt. Jednakże bakterie *Escherichia coli*, które są nieszkodliwe w jelcicie, mogą powodować schorzenia innych układów. *Escherichia coli* jest najczęstszym bakteryjnym patogenem u człowieka oraz jedną z głównych bakterii wywołujących sepsę ogólnoustrojową (powoduje ok. 15% przypadków sepsy szpitalnej) [23].

Pleśniawka (*Candida albicans*) jest przedstawicielem drożdżaków (przedstawiciel grzybów Gram-dodatnich), które naturalnie bytują w organizmie ludzkim, nie wywołując zakażenia. Jeśli jednak dostaną się do organizmu żywego o obniżonej odporności (spowodowanej ciężką,

For maintaining of constant pH of cytoplasm excess protons must be exported, what is the reason of depletion of cellular energy. What more short-chain fatty acids interfere nutrient transport, damage cytoplasmic membrane and disrupt of outer membrane permeability of bacterial cells [18].

The synthetic alternative of PHB is chemically synthesized atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB), which oligomers are known as biocompatible [19].

It is known that proteins are adsorbed on surface of material only a few seconds after immersion an implant into living organism. Immediately blood elements (thrombocytes, endothelium cells, and fibroblasts), bacteria and fungi are adhered to protein layer, and despite of antibiotic prophylactic, surgery wound infects repeatedly. So, the ability of material to selective protein adsorption and to non-adhesion of microorganism is very important.

Despite of antiseptic prophylactic and antibiotic therapy during surgery with polymeric implanted material, the bacterial or fungal infection still can be a reason of graft refusing or even sepsis of the whole organism. The vessels prosthesis infection appears in 1-5% of medical operations [11] and 13.2 % of patients are infected during catheterization [20]. Polymeric materials can be seeding by no sterility conditions either of implant preserving or during surgery. Microorganisms can also derive from a distant side, like infected tooth or throat.

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* and *Klebsiella species* are the microorganisms which cause the early infection (appearing up to few weeks after surgery). The late infection (appearing after few months or even years after operation) is caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas species* and *Staphylococcus epidermidis* [11]. In orthopedic surgery, because of synthetic grafts, 55% of infections are evoked by *Staphylococcus epidermidis*, 10-20% by *Staphylococcus aureus*, and the rest by *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* and fungi - *Candida sp.* [21]. Intravascular catheter-associated infections are caused by coagulase-negative *Staphylococci* (40%), *Staphylococcus aureus* (20%) and fungi, specially by *Candida albicans* (10%) [22].

Staphylococcus aureus, belonging to gram-positive bacteria, is very often the reason of surgery infection because of adhere ability to natural tissue and synthetic material surface. 20% of hospital sepsis is evoking by *Staphylococcus aureus* [23]. It is also one of not numerous bacteria, which possess fibronectin – recognize receptors what causes that they are especially dangerous [20,23].

Escherichia coli (gram-negative bacteria) naturally exist in alimentary tract, but can infect other systems and tissues. *Escherichia coli* is one of bacterium caused sepsis (15% of hospital sepsis is evoking by it [23]).

Also *Candida albicans* physiologically lives in human organism and can induce an infection only in the case of weaknesses or decreases of natural organism immunology (caused by pregnancy, lack of vitamins, diabetes, AIDS or surgery operation). *Candida albicans* (belongs to gram-positive fungi) can produce toxins and enzymes, destructing the cell walls of living organism. Generally fungi are more resistance on environmental factors than bacteria, because of much complicated eukaryotic fungal cell structure in comparison to prokaryotic bacterial cells [23].

The aim of the present study was to estimate the influence of novel aliphatic polyurethanes, based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), on growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* in the area around polymer samples. For comparison the measurement of zone of inhibition was also performed for ChronoThane T – the medical grade aliphatic polyurethane and for pure solvent.

wiekim podeszłym, niedoborem witamin, lub interwencją chirurgiczną) mogą wywołać infekcję, zwaną potocznie kandydozą. Organizmy te zdolne są do produkcji wielu toksyn, a także enzymów, niszczących ściany komórkowe. Wyjątkowa oporność grzybów na działanie czynników zewnętrznych wynika też ze znacznie bardziej złożonej budowy eukariotycznej komórki grzyba niż prokariotycznej komórki bakterii [23].

Celem pracy było oznaczenie wpływu nowych alifatycznych poliuretanów, zawierających w swej strukturze ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan), na wzrost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* dookoła próbek polimerów. Dla porównania oznaczono też strefę zahamowania wzrostu mikroorganizmów dla handlowego, biomedycznego poliuretanu ChronoThane T oraz dla rozpuszczalnika, użytego w syntezie poliuretanów.

Część doświadczalna

Materiały

Syntezę poliuretanów prowadzono metodą dwuetapową [24,25]. Segment giętki zbudowany jest z poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) (a-PHB, Mn=2000, otrzymany z CMPIW PAN, Zabrze) i polikaprolaktonodiolu (PCL, Mn=1900, Aldrich) lub polioksytetrametylenodiolu (PTMG, Mn=2000, Aldrich). Segment sztywny zaś otrzymano w wyniku reakcji 4,4'-diizocyjanian dicykloheksylometanu (H_{12} MDI, Alfa Aesar) i 1,4-butanodiolu (1,4-BD, Aldrich). Stosunek molowy grup NCO:OH w prepolimeryze wynosił 3,7:1 oraz 2:1. Jako rozpuszczalnika użyto N,N-dimetyloformamidu (DMF, Labscan Ltd). Skład poliuretanów przedstawiono w TABELI 1.

Alifatyczny polieterouretan - ChronoThane T, otrzymany dzięki uprzejmości AdvanSource Biomaterials Corporation w Wilmington, USA, uformowano w folie (przez rozpuszczenie granulatu poliuretanowego w DMF, a następnie odparowanie rozpuszczalnika).

Folie badanych poliuretanów oraz ChronoThane T ogrzewano próżniowo w temp. 50°C przez 20 godz., a następnie po pocięciu na krążki – sterylizowano plazmą generowaną z H_2O_2 w aparacie STERRAD*50 (Johnson & Johnson), przez 45 minut w 50°C. Część próbek sterylizowano bez uprzedniego wygrzewania (w 50°C przez 20 godz.).

Strefa zahamowania wzrostu

Strefę zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół próbek poliuretanów badano dla oznaczenia wpływu badanych polimerów na mikroorganizmy. Do badania wybrano szczepy bakterii i grzyba, typowe dla zakażeń w implantologii, tj. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) oraz *Candida albicans* (pochodzącego z materiału klinicznego).

Trzy sterylne krążki poliuretanu (8 mm² średnicy) umieszczono na podłożu Müller – Hinton Agar, po wcześniejszym rozproszczeniu mikroorganizmów (0,5 McF). Płytkę z krążkami polimeru preinkubowano w temperaturze pokojowej, przez ok. 15 minut, a następnie inkubację kontynuowano w 37°C, przez 24 godziny. Po inkubacji płytki wyjęto z cieplarki. Wynik odczytano, mierząc strefę zahamowania wzrostu kolonii mikroorganizmów od krawędzi krążków.

Dla porównania badanie wykonano również dla ChronoThane T oraz dla krążków bibuły zwilżonych DMF (bezpośrednio po zwilżeniu oraz po odparowaniu rozpuszczalnika).

Experimental

Materials

Synthesis of polyurethane was carried out in a two-step reaction, as reported previously [24,25]. Soft segments were built from atactic, hydroxyterminated poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB, Mn=2000, supplied from CMPIW PAS, Zabrze) and polycaprolactone diol (PCL, Mn=1900, Aldrich) or polyoxytetramethylene diol (PTMG, Mn=2000, Aldrich). Hard segments contained 4,4'-methylene dicyclohexyl diisocyanate (H_{12} MDI, Alfa Aesar) and 1,4-butanediol (1,4-BD, Aldrich). The molar ratio of NCO:OH groups in prepolymer was 3.7:1 and 2:1. N,N-dimethylformamide (DMF, Labscan Ltd) was used as a solvent. Composition of obtained polyurethane is presented in TABLE 1.

Aliphatic polyetherurethane - ChronoThane T, kindly supplied from AdvanSource Biomaterials Corporation in Wilmington, USA, was formed into foil (by dissolving in DMF and then its evaporation).

TABELA 1. Skład poliuretanów.
TABLE 1. Composition of obtained polyurethanes.

PUR	Skład segmentów giętkich / Composition of soft segment	Segmenty sztywne / Hard segment	NCO:OH w prepolimeryze / in prepolymer
PUR-B	23% a-PHB + 77% PCL	H_{12} MDI+1.4-BD	3.7:1
PUR-C	100% a-PHB	H_{12} MDI+1.4-BD	3.7:1
PUR-D	23% a-PHB + 77% PTMG	H_{12} MDI+1.4-BD	2:1
PUR-E	23% a-PHB + 77% PCL	H_{12} MDI+1.4-BD	2:1

Foils of investigated polyurethanes and ChronoThane T were heated at temp. 50°C for 20 h in vacuum dryer, and after cutting into circum samples, they had been plasma (H_2O_2) sterilized in STERRAD*50 apparatus (Johnson & Johnson), for 45 minutes at 50°C. Some polyurethanes samples were sterilized without additional heating (at 50°C for 20 h).

Zone of inhibition measurements

Zone of inhibition measurements [9] were performed on polyurethanes samples, to evaluate their influence on typical for biomaterial infections microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Becton Dickinson Diagnostic), *Escherichia coli* (ATCC 25922, Becton Dickinson Diagnostic) and *Candida albicans* (derivated from clinical material).

Three sterile circle samples of the material (8 mm of diameter) were carefully placed onto the surface of Müller-Hinton agar after the plate was inoculated with microorganisms (0.5 McFarland). Plates with polymer samples were pre-incubated at room temperature for 15 minutes and then were incubated at 37°C for 24 hours. After incubation the plates were removed from incubator and inspected for regions surrounding the polymer samples in which microorganisms growth was absent or reduced. The average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn was determined.

The influence on microorganisms growth around ChronoThane T samples and around paper samples wetted with DMF (with and without evaporation of solvent) was estimated as well.

Wyniki obserwacji strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, mierzone jako odległość między krawędzią próbki poliuretanu, a żywymi koloniami przedstawiono w TABELI 2 i 3.

Badane poliuretany, a także handlowy ChronoThane T nie zawierają w swojej strukturze wymywanych biocydów, zatem nie spodziewano się, że wzrost mikroorganizmów dookoła próbek polimerów zostanie zahamowany.

Dane przedstawione w TABELI 2 wskazują, że *Staphylococcus aureus* jest najbardziej wrażliwym, spośród badanych szczepów, mikroorganizmem na kontakt z próbką poliuretanu. Znacznie mniejsze odsunięcia wokół krążków polimerów, umieszczonych na płytce z wysianym szczepem *Escherichia coli*, wynikają ze złożoności budowy ścian komórkowych komórek bakterii. Zewnętrzną ochronę bakterii gram-ujemnych stanowi wielowarstwowa, złożona ściana komórkowa, gdy tymczasem struktura ściany komórkowej bakterii gram-dodatnich (do których należy *Staphylococcus aureus*) jest znacznie prostsza [23,26]. Wysoka odporność komórek *Candida albicans* na działanie czynników zewnętrznych wynika z ich dimorfizmu (czyli wzrostu w fazie drożdżowej w postaci blastospor lub w fazie nitkowatej) oraz z wydzielania przez komórki grzyba śluzowej otoczki, szczelnie chroniącej komórki.

Aby wykluczyć wpływ rozpuszczalnika na wzrost mikroorganizmów na podłożu Müeller – Hinton Agar umieszczono trzy krążki bibuły (8 mm²) nasączone DMF (badanie powtórzone dla bibuły przed i po odparowaniu rozpuszczalnika). W żadnym wypadku nie zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu *Escherichia coli* and *Candida albicans*, podobnie jak dla *Staphylococcus aureus* [27]. Wskazuje to na brak właściwości biostatycznych czystego DMF.

Jednocześnie oznaczono wpływ zahamowania wzrostu bakterii dookoła próbek poliuretanów przed i po wygrzewaniu w 50°C przez 20 godzin. Biorąc pod uwagę, że mikrostruktura poliuretanów ulega reorganizacji podczas ogrzewania, przypuszcza się, że mobilne łańcuchy segmentów giętkich, wzbogacone w a-PHB (wykazujący prawdopodobne działanie przeciwbakteryjne), przesuwają się na powierzchnię poliuretanu. Zahamowanie wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* wokół poliuretanów PUR-B i PUR-D wynosiło odpowiednio 8 i 10 mm od krawędzi próbek (TABELA 2). Wyniki doświadczenia powtórzonego dla próbek poliuretanów dodatkowo ogrzanych wskazują, że strefy odsunięcia zmniejszyły się do 6 i 8 mm. Podobną zależność zaobserwowano badając zahamowanie wzrostu bakterii *Escherichia coli* (TABELA 2).

Segmenty giętkie zawierające a-PHB, zlokalizowane są prawdopodobnie na powierzchni próbek poliuretanów hamując wzrost mikroorganizmów. W przypadku PUR o niskiej gęstości ruchliwość łańcuchów powinna być wysoka ułatwiając tym samym ich przemieszczanie się na powierzchnię. Potwierdzają to obserwacje strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół próbek polimerów (TABELA 2). Poliuretany z większą zawartością segmentów giętkich (NCO:OH = 2:1 w prepolimerze) – PUR-D i PUR-E – mają większy wpływ na żywotność bakterii i grzybów niż PUR-B i PUR-C (NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze). Poliuretany te mają najmniejszą gęstość, gdy tymczasem PUR-C – największą [28]. Wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* dookoła PUR-C był tylko nieznacznie zahamowany w porównaniu do pozostałych poliuretanów (TABELA 2). Nie zaobserwowano natomiast strefy odsunięcia wokół próbek umieszczonych na płytkach z *Escherichia coli* i *Candida albicans*.

Results and discussion

The observation of zones of microorganism growth inhibition measured as the average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn are shown in TABLE 2 and 3.

No inhibition zone of the microorganisms growth around the polymer samples was expected for PURs and ChronoThane T samples, because they did not contain leachable biocides in their structure. It was surprising that bacterial growth around the polyurethane was inhibited (TABLE 2, 3).

Data shown in TABLE 2 indicate that *Staphylococcus aureus* was the most sensitive microorganism to polymer material in conditions of investigation. Much smaller influence of synthetic material on *Escherichia coli* colony was resulting from the more complicated (than for gram-positive) structure of gram-negative bacteria cells' wall [23,27]. The very high resistance of *Candida albicans* on outside factors was connected with a fungi dimorphism (growth as blastospore or as thread phase) and ability to matrix produce.

For excluding of the pure solvent influence on microorganisms growth the circle tissue-paper samples (8 mm of diameter), wetted previously with DMF (with and without an evaporation of solvent), were immersed in seeded agar plate. No zones of inhibition of *Escherichia coli* and *Candida albicans* microorganisms were observed around paper samples with DMF in all cases. It was in agreement with the results of investigation of *Staphylococcus aureus* growth in contact with that solvent [26]. It is proving the lack of bacterio- and fungistatic properties of pure DMF.

Simultaneously the observations of zones of bacterial growth inhibition around samples of polyurethanes before and after additional vacuum heating at 50°C for 20 hours were performed. Taking under consideration that microstructure of polyurethanes is reorganized during heating, it was stated that possible is that the mobile chains of soft segments, enriched in a-PHB (probably revealing antibacterial activity), had moved to the polymer surface. The inhibition of *Staphylococcus aureus* bacteria growth was observed in 8 and 10 mm from edge of PUR-B and PUR-D samples (TABLE 2). The zone of inhibition decreased to 6 and 8 mm for samples of those polyurethanes, which were additionally heated. The similar observations were done during the estimation of zone of inhibition on *Escherichia coli* bacteria (TABLE 2).

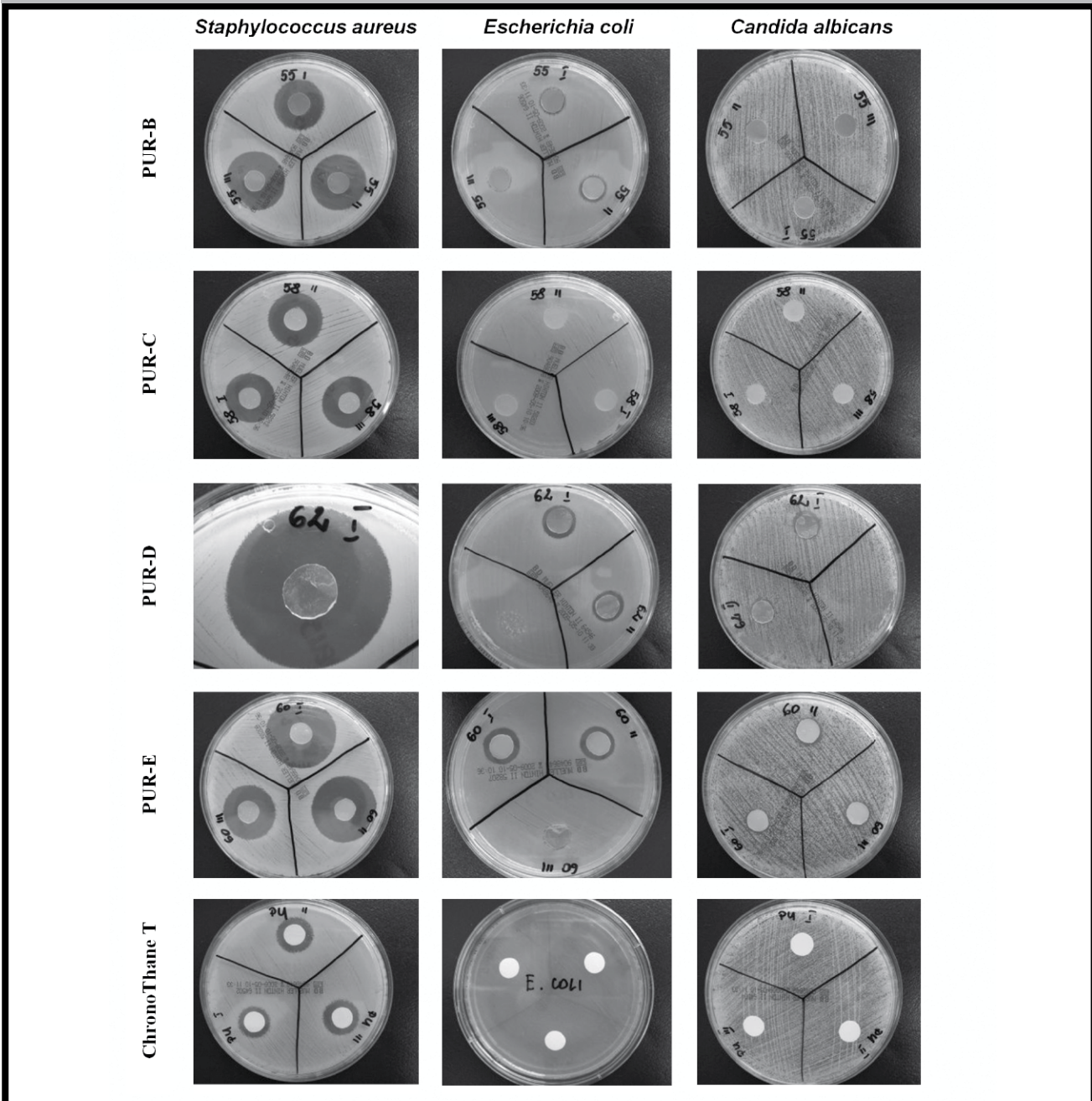
Soft segments of polyurethanes containing a-PHB were probably located on surface of polymer samples what restrained microorganisms growth. In the case of low density PURs mobility of chains was high what facilitated their migration to the sample surface. It was confirmed by observations of zones of microorganisms growth around PURs samples (TABLE 2). Polyurethanes with higher amount of soft segments (NCO:OH = 2:1 in prepolymer) – PUR-D and PUR-E – had the higher influence on bacteria and fungi vitality than PUR-B and PUR-C (NCO:OH = 3.7:1 in prepolymer). Those polymers revealed the smallest density among obtained polyurethanes, whereas the density of PUR-C was the highest [28]. The growth of *Staphylococcus aureus* bacteria around PUR-C samples was slightly inhibited in comparison to other polyurethanes (TABLE 2), and no zone of inhibition was observed around samples on plates inoculated with *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

TABELA 2. Strefa zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, mierzona jako odległość od krawędzi próbki poliuretanu do żywych bakterii i grzybów (\pm odchylenie standardowe).
TABLE 2. Zone of growth inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, measured as the average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn (\pm standard deviation).

PUR	Strefa zahamowania wzrostu / Zone of inhibition [mm]		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
PUR-B	$(8\pm 1.0^* / 6\pm 2.0)^{**}$	$1.5\pm 0.5^* / 0.5\pm 0.1$	0
PUR-C	6 ± 1.0	0	0
PUR-D	$10\pm 2.0^* / 8\pm 1.5$	$2\pm 1.0^* / 1\pm 0.5$	0.5 ± 0.1
PUR-E	7.5 ± 2.5	2 ± 1.0	0.5 ± 0.1
ChronoThane T	2.5 ± 1.0	0	0

* strefa zahamowania wzrostu bakterii oznaczona przed dodatkowym wygrzewaniem ($50^\circ\text{C} / 20$ godz.), ** dane publikowane w [27]
 * zone of growth inhibition of bacteria before additional heating ($50^\circ\text{C} / 20$ h), ** data presented in [27]

TABELA 3. Zdjęcia płytek agarowych z próbkami poliuretanów (ogrzewanych dodatkowo w 50°C przez 20 godz. przed badaniem) z utworzonymi strefami zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* po inkubacji w 37°C przez 24 godz.
TABLE 3. Pictures of plates with the zone inhibition, resulting from contact of polyurethanes samples (additionally heated at 50°C for 20 h before experiment) with agar plates inoculated with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and incubated at 37°C for 24 h.



Oznaczenie wpływu nowych alifatycznych poliuretanów, zawierających w swej strukturze ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan), na wzrost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* dookoła próbek polimerów wskazuje na ich właściwości biostatyczne. *Staphylococcus aureus* jest najbardziej wrażliwym, spośród badanych szczepów, mikroorganizmem na kontakt z próbką poliuretanu. Wiedząc, że kwas 3-hydroksymasłowy należy do kwasów tłuszczowych, charakteryzujących się działaniem przeciwbakteryjnym, stwierdzono, że obecność poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) ma wpływ na zahamowanie wzrostu mikroorganizmów dookoła próbek polimerów. Istotne znaczenie ma także gęstość poliuretanów. Próbkę PUR o małej gęstości wyraźnie wpłynęły na zahamowanie rozwoju bakterii i grzybów. Przypuszcza się, że podczas ogrzewania próbek poliuretanów ich struktura uległa reorganizacji i mobilne segmenty giętkie z poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) migrowały na powierzchnię próbek, co było przyczyną zahamowania rozwoju mikroorganizmów. Wyniki badań nie wskazują jednoznacznie na biobójcze lub biostatyczne właściwości otrzymanych poliuretanów, lecz planowane badania adhezji bakterii do powierzchni poliuretanów mogą pomóc w ich jednoznacznej ocenie.

Biorąc pod uwagę wyniki badań hemokompatybilności otrzymanych poliuretanów z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) oraz ich wpływ na zahamowanie wzrostu mikroorganizmów chorobotwórczych można przyjąć, że jest to materiał, nadający się do dalszych badań nad zastosowaniem w medycynie.

Conclusion

The determination of the influence of novel aliphatic polyurethanes, based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), on growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* indicated on the biostatic properties of these polyurethanes. The microorganisms growth was the most inhibited in the case of *Staphylococcus aureus*. Knowing that 3-hydroxybutyrate belonging to fatty acids, revealed antibacterial activity, it was also concluded that poly([R,S]-hydroxybutyrate) was responsible for the decrease of microorganism growth around polymer samples. Moreover the density of polymers seemed to matter in that case. The polyurethanes with low density revealed the distinct influence on bacteria and fungi vitality. It is possible that during heating of PURs samples the structure was reorganized and mobile segments with poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) migrated to the polymer surface, what was the probably reason of microorganisms growth restrain. The obtained results not clearly suggested the biocidal or biostatic properties of resultant polyurethanes, but the future determination of bacterial adhesion onto polymer surface might help to estimate their bactericidal or bacteriostatic properties.

Taking under consideration the previous results of hemocompatibility estimation of obtained polyurethanes, and their influence on growth of pathogenic microorganisms it could be concluded that PURs with poly([R,S]-hydroxybutyrate) are the promising material for medical application.

Piśmiennictwo

- [1] Masiulanis B.: Biodegradowalne poliuretany dla medycyny. *Elastomery*, 2 (2003) 3.
- [2] Frost M., Meyerhoff M.E.: In Vivo Chemical Sensors: Tackling Biocompatibility. *Analytical Chemistry*, 1 (2006) 7371.
- [3] Balas A., Rajkiewicz M., Grzywa E., Janik H., Lisowska R., Gęsiak M., Wojtyńska E., Polit-Wilson D.: Materiały opatrunkowe stosowane w ortopedii i traumatologii. Cz. II. Qasi-prepolimery uretanowe – chemoreaktywne składniki opatrunków z kompozytów poliuretanowo-tkaninowych. *Polimery*, 10 (2001) 715.
- [4] Gogolewski S.: Biocompatible, biodegradable polyurethane materials with controlled hydrophobic to hydrophilic ratio. *Pat. Int.*, WO 2006/010278 A1.
- [5] Pierce B.F., Brown A.H., Sheares V.V.: Thermoplastic Poly(ester urethane)s with Novel Soft Segments. *Macromolecules*, 41 (2008) 3866.
- [6] Tatai L., Moore T.G., Adhikari R., Malherbe F., Jayasekara R., Griffiths I., Gunatillake P.A.: Thermoplastic biodegradable polyurethanes: The effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. *Biomaterials*, 28 (2007) 5407.
- [7] Aksoy A.E., Hasirci V., Hasirci N.: Surface Modification of Polyurethanes with Covalent Immobilization of Heparin. *Macromolecular Symposia*, 269 (2008) 145.
- [8] Flemming R.G., Capelli C.C., Cooper S.L., Proctor R.A.: Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. *Biomaterials*, 21 (2000) 273.
- [9] Kébir N., Campistron I., Laguerre A., Pilard J.-F., Bunel C., Jouenne T.: Use of telechelic cis-1,4-polyisoprene cationomers in the synthesis of antibacterial ionic polyurethanes and copolyurethanes bearing ammonium groups. *Biomaterials*, 28 (2007) 4200.
- [10] Hetric E.M., Shoensisch M.H.: Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials*, 28 (2007) 1948.
- [11] Pupka A., Abrahamowicz A., Szyber P.: Biomateriały i materiał tkankowy w leczeniu zakażeń protez naczyniowych. *Polimery w Medycynie*, 2 (2005) 41.
- [12] Gray J.E., Norton P.R., Alnoun R., Marolda C.L., Valvano M.A., Griffiths K.: Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane. *Biomaterials*, 24 (2003) 2759.
- [13] Nakaya T., Yujun L.: Recent progress of phospholipids polymers, Designed Monomers and Polymers, 4 (2003) 309.
- [14] Lligadas G., Ronda J.C., Galiá M., Cádiz V.: Poly(ether urethane) Networks from Renewable Resources as Candidate Biomaterials: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules*, 8 (2007) 686.
- [15] Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K.: Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 30 (2009) 2975.

References

- [16] Zhao Q., Cheng G., Li H., Ma X., Zhang L.: Synthesis and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Polymer*, 46 (2005) 10561.
- [17] Foster L.J.R., Tighe B.J., Centrifugally spun polyhydroxybutyrate fibres: accelerated hydrolytic degradation studies. *Polymer Degradation and Stability*, 87 (2005) 1.
- [18] Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P.: Short-chain fatty acids and poly-β-hydroxyalkanoates: (New) Bio-control agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 680.
- [19] Piddubniak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Głowała M., Fiszer-Kieszkowska A., Jedliński Z., Juzwa M., Krawczyk Z., Oligo-3-hydroxybutyrate as potential carriers for drug delivery. *Biomaterials*, 25 (2004) 5271.
- [20] Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2 (2002) 167.
- [21] Bartoszewicz M., Rygiel A.: Biofilm jako podstawowy mechanizm zakażenia miejsca operowanego – metody prewencji w leczeniu miejscowym. *Chirurgia Polska*, 8, 3 (2006) 171.
- [22] Piozzi A., Francolini I., Occhiaperti L., Venditti M., Marconi W.: Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280 (2004) 173.
- [23] Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.: *Mikrobiologia Lekarska*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007.
- [24] Brzeska J., Rutkowska M., Janik H., Dacko P., Kowalczyk M.: Biodegradowalne poliuretany i sposób ich wytwarzania. *Patent Application*, No P385530 (2008).
- [25] Brzeska J., Dacko P., Janeczek H., Kowalczyk M., Janik H., Rutkowska M.: Wpływ syntetycznego poli(3-hydroksymaślanu) na wybrane właściwości nowych, otrzymanych z jego udziałem, poliuretanów do zastosowań medycznych. Cz.II. Poliuretany z cykloalifatycznym diizocyjanianem w segmencie sztywnym. *Polimery*, 1 (2011) 27.
- [26] Grapski J.A., Cooper S.L.: Synthesis and characterization of non-leaching biocidal polyurethanes. *Biomaterials*, 22 (2001) 2239.
- [27] Brzeska J., Janik H., Steinka I., Kukulowicz A., Rutkowska M.: Comparison of disk and tube method for estimation of biostatic properties of polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate). *Joint Proceedings* 23 (2010) 55.
- [28] Brzeska J.: Wpływ syntetycznego poli(3-hydroksymaślanu) na właściwości nowych materiałów poliuretanowych dla celów medycznych. *Ph.D. Thesis* (2010) Gdynia Maritime University.