

8. *Cheng W., Fuh J.Y.H., Nee A.Y.C. et al.* Multi-objective optimization of part building orientation in stereolithography // *Rapid Prototyping Journal*. 1995. Vol. 1. № 4. PP. 12-23.
9. *Kinstlinger I.S., Bastian A., Paulsen S.J. et al.* Open-source selective laser sintering (OpenSLS) of nylon and biocompatible polycaprolactone // *PLoS One*. 2016. Vol. 3. PP. 1-25.
10. *Zhou W.Y., Wang M., Cheung W.L. et al.* Selective Laser Sintering of Poly (L-Lactide) / Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. – Rijeka: InTech, Tissue Engenering, 2010. 524 p. Chapter 9. PP. 179-204.
11. *Hao L., Savalani M.M., Zhang Y. et al.* Selective laser sintering of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites for bioactive implants and tissue scaffold development // *Journal of Engineering in Medicine*. 2006. Vol. 220. № 4. PP. 521-531.
12. *Ciocca L., Fantini M., de Crescenzo F. et al.* Direct metal laser sintering (DMLS) of a customized titanium mesh for prosthetically guided bone regeneration of atrophic maxillary arches // *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2011. Vol. 49. № 11. PP. 1347-1352.
13. *Slotwinski J.A., Garboczi E.J., Stutzman P.E. et al.* Characterization of metal powders used for additive manufacturing // *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2014. Vol. 119.
14. *Mangano C., Piattelli A., d'Avila S. et al.* Early human bone response to laser metal sintering surface topography: A histologic report // *European Journal of Oral Implantology*. 2010. Vol. 36. № 2. PP. 91-96.
15. *Mangano F., Luongo F., Shibli J.A. et al.* Maxillary overdentures supported by four splinted direct metal laser sintering implants: A 3-year prospective clinical study // *International Journal of Dentistry*. 2014. Vol. 2014. Article ID 252343. 9 p.
16. *Chia H., Wu B.M.* Recent advances in 3D printing of biomaterials // *Journal of Biological Engineering*. 2015. Vol. 9.
17. *Mangano F., Chambrone L., van Noort R. et al.* Direct metal laser sintering titanium dental implants: A review of the current literature // *International Journal of Biomaterials*. 2014. Vol. 2014.
18. *Verma A., Tyagi S., Yang K.* Modeling and optimization of direct metal laser sintering process // *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 2015. Vol. 77. № 5. PP. 847-860.

Сергей Валерьевич Мишинов,
 канд. мед. наук, научный сотрудник,
 врач-нейрохирург,
Вячеслав Владимирович Ступак,
 д-р мед. наук, профессор,
 зав. отделением,
 отделение нейрохирургии № 1,
 ФГБУ «НИИ травматологии
 и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»,
Наталья Владимировна Мамонова,
 канд. техн. наук, руководитель,
 отдел медицинских разработок,
 ООО «Инжиниринговый
 медико-технологический центр»,
Андрей Александрович Панченко,
 технический директор,
Игорь Борисович Красовский,
 генеральный директор,
 ООО «Logeeks»,
Дарья Викторовна Лазурник,
 канд. техн. наук, доцент,
 кафедра «Материаловедение в машиностроении»,
 ФГБОУ ВО «Новосибирский
 государственный технический университет»,
 г. Новосибирск,
 e-mail: smishinov@yandex.ru

Е.О. Филиппова, Н.С. Каланда, В.Ф. Пичугин, А.Н. Алейник, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов

Исследование процесса стерилизации трековых мембран из полиэтилентерефталата с помощью низкотемпературной атмосферной плазмы

Аннотация

В последнее время особый интерес вызывают исследования антимикробного действия низкотемпературной плазмы при атмосферном давлении в качестве метода щадящей стерилизации. В статье представлены результаты определения микробицидной эффективности низкотемпературной плазмы при ее воздействии на трековые мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ), исследуемые в качестве роговичного имплантата в кератопластике. Результаты проведенных экспериментов показали, что плазма обладает стерилизующей способностью в режимах обработки образцов по 30, 60 и 90 с и может применяться для стерилизации мембран, требующих щадящего стерилизационного режима.

Введение

Дезинфекция как комплекс мероприятий профилактики инфекций остается актуальной проблемой современного здравоохранения. При несоблюдении режимов дезинфекции изделия медицинского назначения могут являться фактором передачи возбудителей бактериальной и вирусной инфекции, а также патогенных грибов и простейших. Поэтому медицинские инструменты и имплантаты подвергаются стерилизации.

Трековые мембраны (ТМ) из ПЭТФ благодаря необходимой пористой структуре и высокой биосовместимости обладают хорошим потенциалом для применения в офтальмологии при лечении эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы глаза [1]. Перед хирургической операцией имплантаты стерилизуются способами, которые применяются в отечественной практике здравоохранения: паровым методом и методом воздействия ионизирующим излучением. В результате воздействия высокой температуры и давления (паровой метод) или высокоэнергетического облучения на полимерные

имплантаты возможно изменение физико-химических свойств материала, что может сказаться на функциональности, токсичности и безопасности имплантатов. В связи с этим в последнее время все больше внимания уделяется разработке новых методов щадящей стерилизации [2]-[4], в частности антимикробному эффекту низкотемпературной плазмы [2].

Цель рассматриваемой работы – исследование стерилизационного эффекта низкотемпературной атмосферной плазмы при ее воздействии на поверхность трековых мембран из ПЭТФ.

Материалы и методы

Трековые мембраны из полиэтилентерефталата были получены путем облучения полимерной пленки пучком ионов $^{40}\text{Ar}^{+8}$ с максимальной энергией 41 МэВ и последующего химического травления. Травление осуществляли в водном растворе NaOH с 1,5 N концентрацией при температуре 72...82 °С.

Для определения размеров и поверхностной плотности пор в трековых мембранах использовались изображения поверх-

ности мембран, полученные при помощи электронного микроскопа «Hitachi S3400N Type II» (Япония).

Топография поверхности исследовалась на комплексном корреляторе оптических, спектральных и топографических свойств поверхности объектов (АСМ) «Centaur HR» (РФ). Шероховатость поверхности оценивалась с помощью программного обеспечения Gwyddion по параметру, определяющему среднее арифметическое значение отклонений профиля (R_a).

Испытания на стерильность проводили в соответствии с МУ 287-113, ГОСТ ИСО 11737-2-2011, ГОСТ ИСО 11737-1-2012, ГОСТ Р ИСО 14937-2012, ГОСТ Р ИСО 14630-2011. Испытания проводили в асептических условиях, в ламинарной установке «ESCO» AC-2 – 4E1 (Сингапур). В качестве стерилизующего агента использовалась экспериментальная установка атмосферной низкотемпературной плазмы (Томский политехнический университет) с определенными характеристиками. Низкотемпературную атмосферную плазму получали с помощью барьерного разряда. Напряжения разряда составляло 25 кВ, частота – 5 кГц. Плотность мощности составляла 2 Вт/см². Температура поверхности не превышала 40 °С.

Исследованию были подвергнуты трековые мембраны из полиэтилентерефталата с диаметром пор 0,55 мкм, размером 2,0 × 2,0 см, толщиной 10 мкм; каждый образец обрабатывался плазмой в течение 30, 60 и 90 с (по 20 шт. на одно время обработки). Общее количество образцов – 80 шт. (60 образцов – после воздействия плазмы, 20 образцов – без воздействия плазмы) для микробиологического исследования и 20 образцов – для физического исследования (15 – после воздействия плазмы; 5 – без воздействия плазмы). Стерильность трековых мембран определялась методом прямого посева (полного погружения) в питательные среды (тиогликолевая среда и бульон Сабуро). Питательные среды готовились в соответствии с инструкцией изготовителя и разливались объемом по 100 мл в стерильные флаконы [5]. Образцы трековых мембран из полиэтилентерефталата асептически переносили сразу после воздействия низкотемпературной атмосферной плазмы – по 5 шт. каждого режима в каждую питательную среду. Испытание повторяли двукратно. После погружения мембран среда слегка перемешивалась, посева инкубировали в течение 14 дней при температуре 30...35 °С на тиогликолевой среде и при температуре 20...25 °С на бульоне Сабуро. Оценка результатов производилась визуальным ежедневным наблюдением: помутнение среды являлось признаком наличия роста микроорганизмов. Контрольные образцы воздействию низкотемпературной атмосферной плазмы не подвергались. Эталоны сравнения служили посев контрольных образцов («положительный контроль») и стерильная питательная среда («отрицательный контроль»).

В ходе определения микробицидной эффективности низкотемпературной атмосферной плазмы была определена биологическая нагрузка ТМ. (Биологическая нагрузка определялась в процессе тестирования микробицидной эффективности ТМ после обработки низкотемпературной атмосферной плазмой.) Мембраны из контрольной группы асептически переносили во флаконы, содержащие по 100 мл стерильного элюента – буферного раствора, после чего флаконы тщательно встряхивали на шейкере «MS 3 basic» (Германия), чтобы удалить микроорганизмы с поверхности ТМ. Полученный смыв пропускали через мембранный фильтр для количественного определения микроорганизмов методом мембранной фильтрации в количестве 20 мл (что соответствовало одному образцу). При этом

использовали прибор вакуумного фильтрования ПВФ-47/НБ (ЗАО «БМТ», г. Владимир) и мембранные фильтры типа МФАС–ОС-2 (с диаметром пор 0,45 мкм). Предварительно для смачивания фильтра в каждую воронку фильтровальной установки вносили 5 мл 0,9%-ного раствора NaCl. По окончании процесса фильтрации мембраны переносили на плотные питательные среды (Сабуро и ГРМ-агар). Чашки с фильтрами переворачивали, посева инкубировали в термостате в течение 5 суток, с ежедневным просмотром. Посевы на ГРМ-агаре инкубировали при температуре 30...35 °С (для выявления аэробных и факультативно-анаэробных бактерий), а на среде Сабуро – при температуре 20...25 °С (для выявления грибов). По окончании инкубации проводили учет результатов. Количество выделенных микробов выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на одну ТМ. По данной методике было проведено 5 опытов и проанализировано 25 образцов ТМ.

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, используя метод посева на дифференциально-диагностические питательные среды и иммерсионный метод микроскопического исследования. Для изучения физиолого-биохимических свойств использовали питательные среды Гисса с глюкозой, сахарозой, лактозой, салицином, маннитом – для изучения способности утилизировать различные углеводы, картофельный агар – для определения фермента амилазы, среду с казеином и питательный бульон с желатином – для определения фермента протеазы. Утилизацию цитрата тестировали на среде Козера, способность восстанавливать нитраты – на бульоне с нитратами. Определение в среде ацетона проводили на среде Кларка, способность продуцировать сероводород – на ГМФ-бульоне, применения индикаторную бумагу, пропитанную уксуснокислым свинцом. Способность вырабатывать индол определяли на среде № 15 с добавлением реактива Ковыча, фермент уреазу – на среде Кристенсена, фермент лецитиназу – на ГМФ-бульоне с яичным желтком, наличие коагулазы определяли в реакции с цитратной кроличьей плазмой.

Каталазную активность выявляли в реакции с пероксидом. Подвижность определяли посевом «укол в столбик» в 0,7%-ный питательный агар и методом «раздавленной капли» при микрокопировании. Оценивали способность роста культуры при 45 °С.

Исследование культур в окрашенном виде проводили по следующим методам: Граму – для выявления грамотрицательных и грамположительных бактерий; Бурри – для выявления наличия капсул; Ожешко – для выявления спор; Нейссера – для выявления зерен волютинина.

Выявление новобиоцин-резистентности выделенных стафилококков осуществляли диско-диффузным методом (ДДМ), в соответствии с МУК 4.2.1890-04 с использованием агара Мюллера-Хинтона и дисков с новобиоцином, оценивая таким образом зону подавления роста стафилококков: резистентными считали штаммы с диаметром зоны подавления < 10 мм.

Для бактериологического исследования использовали коммерческие среды и реактивы следующих производителей: ЗАО НИЦФ (г. С.-Петербург); ФБУН ГНЦПМиБ (г. Оболенск); ООО НПЦ «Биокомплекс-С» (г. Углич); «HIMEDIA» (Индия). Также использовали среды, приготовленные в лабораторных условиях.

Видовую идентификацию не проводили из-за низкого значения в данном эксперименте.

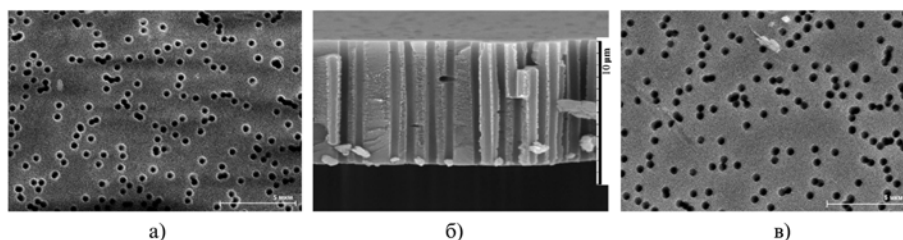


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение поверхности (а) и поперечного сечения (б) исходной трековой мембраны и мембраны после 30-секундного воздействия плазмы (в)

Результаты

На *рис. 1* представлено типичное электронно-микроскопическое изображение элемента поверхности трековой мембраны.

Как видно из *рис. 1а-в*, поры достаточно равномерно распределены по поверхности мембраны. Расчеты, проведенные по данным электронно-микроскопических измерений, показывают средний размер пор, равный 0,5 мкм, и поверхностную плотность пор 5×10^8 пор/см². Сечение элемента мембраны со сквозными порами, представленное на *рис. 1б*, иллюстрирует цилиндрическую форму пор.

Анализ данных, полученных методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), показывает существенную реконструкцию поверхности ТМ в результате воздействия низкотемпературной атмосферной плазмы. Появляются хаотично распределенные мелкие неровности конусообразной формы с высотой более 100 нм и с плотностью 2,43 пиков/мкм² при времени воздействия плазмы 30 с, которая возрастает с ростом времени воздействия плазмы до 90 с. Результаты, приведенные в *табл. 1*, показывают также значительный (в 15 раз) рост шероховатости поверхности R_a с 0,231 до 3,77 мкм, поверхностной энергии (в 4 раза) с 29,95 до 129,64 мДж/м² и гидрофильности поверхности мембран на 54...63% после плазменной обработки. Подробное изложение изменения топографии поверхности исходной пленки ПЭТФ и ТМ после плазменной обработки было представлено авторами ранее в работе [7].

В результате наблюдения микробоцидной эффективности воздействия низкотемпературной плазмы было выявлено помутнение сред (наличие роста микроорганизмов) контрольной группы образцов на первые сутки инкубации. Среды с образцами основной (экспериментальной) группы были прозрачными и оставались интактными на протяжении всего времени инкубации. Наличие роста микроорганизмов обозначали знаком «+», отсутствие роста – знаком «-». Результаты исследования приведены в *табл. 2*.

Данные экспериментальных исследований позволили определить биологическую нагрузку ТМ. В *табл. 3* приведены данные микробиологического анализа смывов с ТМ до воздействия низкотемпературной атмосферной плазмы. Согласно приведенным в *табл. 3* данным, предстерилизационное число на одну мембрану составило $(3,8 \pm 0,6)$ КОЕ.

Были выделены две группы микроорганизмов: 1) грамположительные палочки размером $(0,6...0,8 \times 1,9...2,8)$ мкм (№ 1), не образующие спор и капсул, не содержащие зерна волютина, ферментирующие лактозу, не ферментирующие глюкозу, сахарозу, салицин, маннит; образующие каталазу; утилизирующие цитрат, не продуцирующие уреазу, лецитиназу, амилазу, протеазу; не редуцирующие нитраты; обладающие низкой протеолитической активностью (расщепляющие белок до ацетона), не растущие при температуре 45 °С; 2) стафилококки диаметром 0,6...0,75 мкм (№ 2), не образующие спор и капсул, не содержащие зерна волютина, ферментирующие лактозу, сахарозу, не ферментирующие глюкозу, маннит салицин, продуцирующие каталазу, уреазу, не продуцирующие коагулазу, чувствительные к новобиоцину (*табл. 4*).

Согласно классификации, представленной в определителе Берджи [6], полученные данные позволяют отнести выделенные культуры к апатогенным микроорганизмам класса *Bacilli* (№ 1) и роду *Staphylococcus* (№ 2), относящимся к группе к коагулазо-негативных, новобиоцин-чувствительных.

Далее планируется определение стерилизующей способности плазмы инокулируемых ТМ тест-штаммами микроорганизмов, для определения стерилизующей дозы.

Заключение

Таким образом, воздействие низкотемпературной атмосферной плазмы на трековые мембраны из полиэтилентерефталата приводит к реконструкции поверхности, заключающейся в изменении ее топографии, росте шероховатости, формировании хаотично распределенных по поверхности деструктив-

Таблица 1

Параметры поверхности ТМ: шероховатость R_a , поверхностная энергия σ_s , угол смачивания θ_w (вода)

Образец ТМ	Исходный	Плазма 30 с	Плазма 60 с	Плазма 90 с
R_a , мкм	0,231 ± 0,052	1,03 ± 0,037	1,97 ± 0,049	3,77 ± 0,99
σ_s , мДж/м ²	29,95 ± 1,43	131,53 ± 4,89	146,04 ± 5,01	129,64 ± 5,22
θ_w	72,8 ± 2,05	33,0 ± 2,13	31,2 ± 1,8	26,6 ± 1,45

Примечание: $X \pm x$, где X – средняя величина; x – стандартное отклонение.

Таблица 2

Результаты контроля стерильности ТМ методом прямого посева

Испытываемые образцы (общее количество – 80 образцов)	Посев на питательную среду	
	Тюогликолевая среда (по 5 образцов на каждый повтор; всего – 10 образцов)	Бульон Сабуро (по 5 образцов на каждый повтор; всего – 10 образцов)
Плазма 30 с (20 образцов)	--	--
Плазма 60 с (20 образцов)	--	--
Плазма 90 с (20 образцов)	--	--
K(+)* (20 образцов)	++	++
K(-)* (без образцов)	--	--

Примечание: *K(+)* – образцы, не подвергшиеся воздействию низкотемпературной атмосферной плазмы; K(-)* – стерильная питательная среда.

Таблица 3

Результаты исследования микробной контаминации ТМ

Образец	Колониеобразующие единицы (КОЕ)*					$(M \pm m)$
	Опыт					
	1	2	3	4	5	
ТМ	8	2	3	1	5	3,8 ± 0,6

Примечание: * Количество КОЕ из расчета на один образец ТМ.

ных областей, увеличении гидрофильности поверхности ТМ.

Предварительные эксперименты показали, что биологическая нагрузка была относительно небольшой и составила $(3,8 \pm 0,6)$ КОЕ на одну трековую мембрану. Вероятные виды загрязняющих микроорганизмов, выделенные с поверхности ТМ, представлены сапрофитной непатогенной микрофлорой.

Результаты проведенного эксперимента показали, что низкотемпературная атмосферная плазма обладает стерилизующей способностью для видов ожидаемых контаминантов в режимах обработки образцов по 30, 60 и 90 с и может применяться для стерилизации трековых мембран из полиэтилентерефталата, которые требуют щадящего стерилизационного режима.

Далее планируется определение стерилизующей способности плазмы инокулируемых ТМ тест-штаммами микроорганизмов, в том числе вирусов, с учетом их резистентности для определения стерилизующей дозы.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ по ФЦП (соглашение № 14.578.21.0031, уникальный идентификатор RFMEF157814X0031).

Список литературы:

1. Филитпова Е.О., Кривошеина О.И., Запускалов И.В. Интрастромальная имплантация трековых полимерных мембран в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10. № 2. С. 137-139.
2. Алейник А.Н., Байков А.Н., Дамбаев Г.Ц. Особенности взаимодействия неравновесной плазмы с живыми тканями // Вестник науки Сибири. 2012. № 3. С. 44-48.
3. Елистратов А.А. Генерация импульсных объемных разрядов в воздушной среде атмосферного давления для целей стерилизации и обеззараживания / Автореф. дис. канд. техн. наук. – М., 2012. С. 12.
4. Остроухова А.А. Обоснование и оценка эффективности применения плазменной стерилизации в стоматологической клинике / Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2005. С. 7.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII выпуск, ч. 1. – М., 2007.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology // Firmicutes. 2009. Vol. III. P. 1450.
7. Филитпова Е.О., Карпов Д.А., Градобоев А.В., Сохорева В.В., Пичугин В.Ф. Воздействия низкотемпературной плазмы и γ -облучения на поверхностные свойства трековых мембран из полиэтилентерефталата // Перспективные материалы. 2016. № 5. С. 5-17.

Екатерина Олеговна Филитпова,
аспирант, врач-офтальмолог,
кафедра офтальмологии, ГБОУ ВПО «Сибирский
государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
инженер,
кафедра экспериментальной физики,
Физико-технический институт,
ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
Наталья Сергеевна Каланда,
мл. научный сотрудник,
Центральная научно-исследовательская лаборатория,
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
Владимир Федорович Пичугин,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
кафедра экспериментальной физики,
Александр Никонорович Алейник,
канд. техн. наук, доцент,
кафедра прикладной физики,
Физико-технический институт,
ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
Артем Михайлович Гурьев,
д-р фарм. наук, профессор, кафедра фармации ФПК и ППС
(факультет повышения квалификации
и последипломной подготовки специалистов),
руководитель,
Центр внедрения технологий,
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
Михаил Валерьевич Белоусов,
д-р фарм. наук, зав. кафедрой,
кафедра фармации ФПК и ППС
(факультет повышения квалификации
и последипломной подготовки специалистов),
ведущий научный сотрудник,
Центральная научно-исследовательская лаборатория,
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
г. Томск, e-mail: katerinabosix@mail.ru

Таблица 4

Тинкториальные и физиолого-биохимические свойства выделенных культур с ТМ

Культура	Окраска по Граму	Наличие спор	Наличие капсул	Наличие зерен валютина	Подвижность	Ферментация глюкозы	Ферментация маннита	Ферментация лактозы	Ферментация сахарозы	Ферментация салицина	Продукция каталазы	Продукцирование уреазы	Продукцирование лецитиназы	Продукцирование амилазы	Продукцирование протеазы	Образование аммиака	Образование индола	Образование сероводорода	Рост при $t = 45^{\circ}\text{C}$	Редукция нитратов	Утилизация цитрата	Образование ацетона	Устойчивость к новобиоцину	Продукция коагулазы
№ 1 (палочки)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	*	*	
№ 2 (стафилококки)	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-

«+» – положительный тест; «-» – отрицательный тест; «*» – тест не проводился.