

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

KATEDRA FYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Perspektivy dezinfekčních účinků nízkoteplotního
plazmatu při paliativní onkologické léčbě**

Autor: Bc. Anna Machková

Vedoucí práce: MUDr. Ing. Vítězslav Kříha, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Děkuji MUDr. Ing. Vítězslavu Kříhovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a především děkuji konzultantovi doc. Ing. Vladimíru Scholtzovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které tuto práci obohatily a poskytnutí potřebného zázemí při realizaci experimentů. Děkuji též své rodině za podporu ve studiu.

Název práce: **Perspektivy dezinfekčních účinků nízkoteplotního plazmatu při paliativní onkologické léčbě**

Autor: Anna Machková

Obor: Fyzika a technika termojaderné fúze (FTTF)

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: MUDr. Ing. Vítězslav Kříha, Ph.D.

Ústav radiační onkologie Nemocnice Na Bulovce

Abstrakt:

Existuje velké množství biomedicínských aplikací netermálního plazmatu, například sterilizace. Pokud je navíc produkováno za atmosferického tlaku lze jej využít i pro další medicínské aplikace, jako je ošetření ran (regenerace tkáně a protizánětlivý efekt), koagulace krve, antibakteriální léčba, podpora buněčné proliferace a další. Je zde též několik studií zabývajících se plazmatem vyvolanou apoptózou a tlumením aktivity nádorových buněk, které potvrzují možnou budoucí aplikaci plazmové terapie u nádorových onemocnění. Toto pole výzkumu – plazmová medicína – je velmi široké a multidisciplinární, zasahuje do fyziky, inženýrství, biologie, medicíny, je staré přibližně pouhé dvě dekády a za posledních pár let zaznamenalo výrazný růst. Stále však není detailně porozuměno všem fyzikálním a biochemickým procesům, které hrají roli v interakci netermálního plazmatu s buňkami a tkáněmi.

V předkládané práci je prezentována literární rešerše v oblasti vlivu netermálního (nerovnovážného, atmosferického) plazmatu a plazmatem ošetřených roztoků na dezinfekci a hojení ran, léčbu nádorových onemocnění, mechanismu jeho účinku a přehled zdrojů netermálního plazmatu využitelných ve zdravotnictví. Následná praktická část obsahuje *in vitro* experimenty s ošetřováním kultur vybraných mikroorganismů, významných z hlediska onkologických ran a infekcí spojených se zdravotní péčí v onkologii, netermálním plazmatem a zkoumání synergického efektu kombinace plazmatu a antiseptických ob vazů.

Klíčová slova: Plazmová medicína, netermální plazma za atmosferického tlaku (CAP), plazmatem aktivované roztoky, reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS)

Title: **Disinfection effect perspectives of non-thermal plasma for paliative therapy in oncology**

Author: Anna Machková

Abstract:

It was recently demonstrated that plasma has sterilizing, blood-coagulation, tissue regenerating, induction of endothelial cell proliferation and anti-inflammatory effects. Non-thermal atmospheric pressure plasma has been proposed as a new tool for various biological and medical applications such as wound healing. Plasma medicine is interdisciplinary field of research requiring close collaboration between physicists, engineers, biologists, biochemists, and medical experts. There are also studies on plasma induced apoptotic and proliferation-inhibitory effect on cancer cells, clarified so far, the possibility of cancer plasma therapy application in the future.

Although many studies has been performed in this field of knowledge and our understanding of the fundamental mechanisms playing important roles in the interaction between low temperature plasma and biological cells and tissues has greatly expanded, much remains to be done to get a through and detailed picture of all the physical and biochemical processes that enter into play.

In this work is presented literary research in the field of influence of non-thermal (nonequilibrium, atmospheric pressure) plasma and plasma treated solutions on wound disinfection and healing, cancer treatment, the mechanism issue of this processes and the overview of plasma sources used in healthcare. The practical part includes the *in vitro* experiments of plasma treatment of microbial samples corresponding to microorganisms which are significant in the term of oncological lesions and research regarding the synergy effect of combination of plasma and antiseptic dressings.

Key words: Plasma medicine, cold atmospheric plasma (CAP), plasma activated solutions, reactive oxygen and nitrogen species (RONS)

Obsah

Úvod a cíle práce.....	8
1 Teoretické základy použití plazmatu v biomedicině.....	10
1.1 Historie využití CAP v biomedicině.....	10
1.2 Základní mechanismus biologického účinku CAP.....	12
2 Plazmatem aktivované roztoky.....	15
2.1 Základní charakteristika.....	15
2.2 Chemické základy.....	17
2.3 Vliv PAM na buňky – role RONS.....	19
3 Zdroje nízkoteplotního plazmatu využitelné ve zdravotnictví.....	23
3.1 Typy zdrojů.....	23
3.1.1 Dielektrický bariérový výboj.....	23
3.1.2 Korónový výboj.....	24
3.1.3 Plazmová tryska.....	25
3.2 Mechanismy působení plazmatu na	26
4 Dezinfekce a ošetřování ran pomocí CAP.....	28
4.1 Vliv CAP na hojení ran.....	28
4.2 Cidní účinky CAP.....	30
4.3 Mikroorganismy významné z hlediska onkologických ran.....	34
5 Praktická část.....	37
5.1 Parametry zdroje CAP.....	37
5.2 Metodické postupy.....	39
5.3 Výsledky a diskuze.....	42
6 Závěr.....	52
Seznam použité literatury.....	53

Úvod a cíle práce

V předložené práci je řešena problematika cidních účinků nízkoteplotního plazmatu na vybrané druhy mikroorganismů a synergický efekt kombinace plazmatu a antiseptických obvazů. Obsahuje úvod do problematiky biomedicínského využití plazmatu s důrazem na plazmovou medicínu. Toto pole výzkumu je velmi široké a multidisciplinární, zasahuje do fyziky, inženýrství, biologie a medicíny. Existuje velké množství aplikací netermálního atmosferického plazmatu v medicíně jako je ošetření ran, koagulace krve, antibakteriální léčba, podpora buněčné proliferace a další. Ukazuje se, že klíčovou roli v interakci plazmatu s buňkami nebo tkáněmi hrají plazmatem generované reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS). Stále však není detailně porozuměno všem fyzikálním a biochemickým procesům, které hrají roli v interakci netermálního plazmatu s buňkami a tkáněmi. Pro vypracování rešerše byly použity různé odborné publikace a shrnuje z nich získané poznatky o mechanismu účinku a možných využitích netermálního atmosferického plazmatu na poli medicíny. V praktické části jsou prezentovány *in vitro* experimenty na kulturách mikroorganismů významných z hlediska onkologických ran a infekcí spojených se zdravotní péčí v onkologii. Na několika druzích speciálních obvazů používaných v onkologii byl zkoumán vliv opracování netermálním plazmatem na jejich cidní účinky. Dále byl pozorován a hodnocen synergický efekt kombinované aplikace antiseptických obvazů a nízkoteplotního plazmatu na bakteriální kultury.

Cíle diplomové práce jsou následující:

1. Uvést do problematiky nízkoteplotního plazmatu a jeho zdrojů využitelných ve zdravotnictví.
2. Seznámení se s mikroorganismy významnými z hlediska onkologických ran a infekcí spojených se zdravotní péčí v onkologii.
3. Zkoumání cidních účinků plazmatu na vybrané druhy mikroorganismů.
4. Zkoumání kombinovaných cidních účinků plazmatu a antiseptických obvazů na vybrané druhy mikroorganismů.
5. Diskuze perspektiv uplatnění nízkoteplotního plazmatu v komplexní onkologické léčbě

Prezentovaná práce obsahuje několik kapitol ve kterých je rozebrána problematika biomedicínského využití plazmatu. První kapitola Teoretické základy použití plazmatu v biomedicíně stručně nastiňuje vlastnosti plazmatu a jeho možné aplikace v biomedicíně, krátce pojednává o historii tohoto pole výzkumu a stručně shrnuje mechanismus účinku nízkoteplotního plazmatu na biologické objekty. V kapitole Plazmatem aktivované roztoky je rozebráno získávání, chemická podstata účinku a využití plazmatem aktivovaných roztoků. Třetí kapitola je věnována zdrojům nízkoteplotního plazmatu využitelným ve zdravotnictví a pojednává o různých možnostech produkování plazmatu a jeho parametrech. Poslední kapitola rešerše je věnována Dezinfekci a ošetřování ran pomocí CAP (cold atmospheric plasma, netermální plazma za atmosférického tlaku) a popisuje aktuální poznatky o vlivu plazmatu na hojení ran a dekontaminaci tkání a povrchů, jsou zde nastíněny jeho výhody a mechanismy účinku a též se krátce zmiňuje o několika mikroorganismech významných z hlediska onkologických ran a infekcí spojených se zdravotní péčí v onkologii. Praktická část popisuje uspořádání, metodiku, parametry a výsledky uskutečněných *in vitro* experimentů. V diskuzi a závěru se nachází shrnutí hlavních získaných poznatků, jejich porovnání s odpovídající literaturou a jejich případný význam pro použití v medicínské praxi.

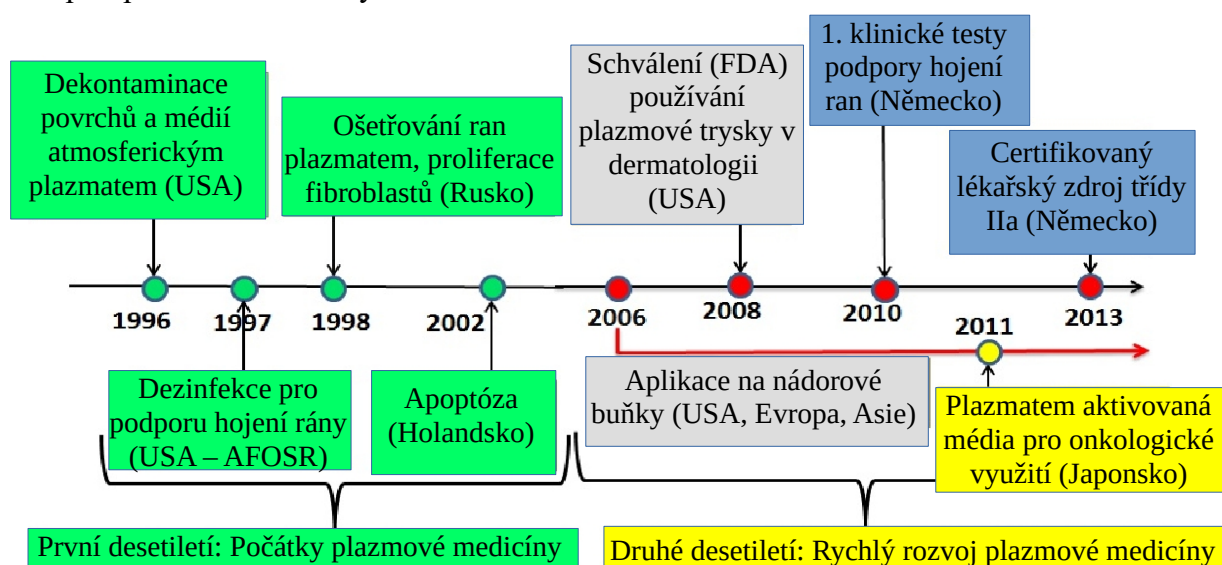
1. Teoretické základy použití plazmatu v biomedicině

Plazma je z fyzikálního pohledu čtvrtým skupenstvím hmoty, obsahuje volné nosiče náboje, čímž získává nové vlastnosti, které u jiných skupenství neznáme, například kolektivně reaguje na elektrické a magnetické pole a samo je vytváří. Existuje mnoho typů dělení plazmatu, podle jeho různých vlastností. (Kulhánek, 2011) Tato práce je zaměřena na nízkoteplotní plazma za atmosferického tlaku. V angličtině je často používána zkratka CAP (cold-atmospheric plasma) označující ionizovaný plyn produkovaný při atmosferickém tlaku. V takovém plazmatu jsou hlavními nosiči energie volné elektrony, jeho makroskopická teplota je tedy poměrně nízká a umožňuje i ošetření teplotně citlivých materiálů. Za posledních několik let zdroje plazmatu za atmosferického tlaku získaly obrovské množství pozornosti díky jejich širokému využití v různých odvětvích biologie a medicíny včetně ošetřování ran (Kuninová a kol., 2017), sterilizace povrchů (Oehmigen a kol., 2010), koagulace krve (Ikehara a kol., 2013), ošetření kořenových kanálů zubů (Jha a kol., 2017), léčby zhoubných novotvarů (Keidar a kol., 2013) a ošetření kůže (Heinlin a kol., 2011).

1.1 Historie využití CAP v biomedicině

V polovině devadesátých let výsledky výzkumu Laroussiho a kol. (1996) ukázaly, že CAP lze použít k inaktivaci bakterií. Na základě slibných výsledků byl výzkum v tomto směru několik dalších let sponzorován US Air Force Office of Scientific Research. Výsledky získané z tohoto výzkumného programu byly publikovány v literatuře a nově objevenou možností aplikace CAP v biologii a medicíně přilákaly pozornost okruhu fyziků věnujících se plazmatu. Původním záměrem US Air Force Office of Scientific Research byla aplikace CAP na ošetřování ran zraněných vojáků a sterilizaci/dezinfekci biotických a abiotických povrchů. Na začátku třetího tisíciletí byl výzkum rozšířen i na eukariotické buňky, kde při aplikaci malých dávek CAP bylo pozorováno zvýšení fagocytózy, zrychlení proliferace fibroblastů (pojivová tkáň, často využívané jako modelové buňky pro *in vitro* experimenty), možnost oddělení savčích buněk bez způsobení nekrózy a pro vyšší dávky vedla k apoptóze (Shekhter a kol., 1998; Stoffels a kol., 2002). Výše popsané přelomové

objevy ukázaly, že plazma může šetrně interagovat s buňkami (prokaryotickými i eukaryotickými) a způsobovat různý výsledný efekt v závislosti na parametrech jeho aplikace. Tyto počáteční úspěchy vzbudily velký zájem mnoha laboratoří všude po světě a na konci první dekády 21. století byla vznikla kolem této disciplíny globální vědecká komunita. Vzniklé odvětví je dnes známo jako plazmová medicína a zahrnuje několik různých aplikací CAP v biologii a medicíně, například (Laroussi, 2018): Sterilizace, dezinfekce a dekontaminace, ošetření ran za pomoci plazmatu, plazmové zubní lékařství, využití pro léčbu nádorových onemocnění – plazmová onkologie, plazmová farmakologie a ošetřování implantátů plazmatem pro lepší biokompatibilitu. Na začátku 21. století bylo též schváleno několik zdrojů CAP pro kosmetické a medicínské účely (více viz. Kapitola o zdrojích CAP). Některá z těchto zařízení začala být komerčně vyráběna a pár z nich jsou k dispozici na klinikách. Na obrázku 1 je vidět časová osa s hlavními milníky ve vývoji na poli plazmové medicíny.



Obr. 1 – Časová osa znázorňující důležité milníky na poli použití CAP v biomedicínských aplikacích. (Laroussi, 2018)

Jak je vidět z obrázku 1, biomedicínské aplikace CAP začaly experimenty s inaktivováním bakterií na biotických a abiotických površích a médiích. Bakteriální kontaminace je problémem například v oblasti zdravotní péče, konkrétně jsou to třeba nozokomiální nákazy způsobené kmeny bakterií rezistentních na antibiotika, zhoršujících hojení chronických ran (například onkologických nebo diabetických) hospitalizovaných pacientů.

CAP je považováno za novou metodu, která by mohla být úspěšně použita při řešení těchto problémů. Naopak jednou z nejnovějších aplikací, kterým je aktuálně věnováno hodně pozornosti je využití plazmatu k selektivnímu ničení nádorových buněk.

1.2 Základní mechanismus biologického účinku CAP

V CAP hrají klíčovou roli elektrony, které interagují s atomy a molekulami pracovního plynu a způsobují excitace, disociace a ionizace. Plazma v sobě zahrnuje mnoho různých bioaktivních vlivů – částice (elektrony, ionty), fotony, reaktivní formy (například volné radikály) a pole (například elektrostatické pole, teplo). Jak tyto jednotlivé složky interagují s živou hmotou je nyní předmětem výzkumu a kvůli komplexitě těchto procesů stále nejsou zcela pochopeny.

Nabitě částice lze najít hlavně v aktivní zóně výboje, proto hrají roli především v případě aplikace plazmatu, kdy je ošetřovaný vzorek součástí elektrického obvodu zdroje. V případě kdy plazma pouze bezprostředně působí na buňku, je kvazineutrální a jeho celkový náboje je tedy nulový (Sysolyatina a kol., 2014). Nabitě částice mohou způsobit protržení vnější bakteriální membrány a hrají tak zásadní roli v inaktivaci mikroorganismů (Dobrynin a kol., 2009). Existují dvě vysvětlení jakým způsobem k tomuto dochází, chemické (přes poškození membránových proteinů) a fyzikální (hromadění nábojů na membráně a jejich odpuzování). Guo a kol. (2015) diskutoval oba inaktivační mechanismy a vyvodil, že probíhají oba současně a vedou k buněčné smrti. Dochází k hromadění náboje na povrchu membrány, následně ke změně konformace proteinů a otevření iontových kanálů, což vede k dalšímu hromadění náboje, zásadnímu poničení membránových proteinů a tvorbě pórů v membráně. Prostřednictvím vzniklých pórů se do buňky dostanou reaktivní formy a naruší funkčnost proteinů a enzymů, což indukuje buněčnou smrt.

Působení CAP může kromě chemických aspektů, působit také poměrně silným elektrickým polem. Intenzita elektrického pole generovaného při ošetřování vzorků oblakem nabitých částic ze zdroje plazmatu (tzn. vzorek není přímo v aktivní zóně výboje) není dostatečná pro působení bakteriální inaktivace. Tento vliv je tedy zanedbatelný, co se týče cidních účinků plazmatu, jedině v případě uspořádání, kdy vzorek funguje jako

jedna z elektrod může elektrické pole významně přispět k bakteriálnímu poškození. Rozsah těchto polí je několik kV/cm a předpokládá se, že hrají roli například v buněčné elektroporaci, která by mohla umožnit větším molekulám pronikat dovnitř buněk.

Některé zdroje plazmatu generují i UV záření, jeho spektrální hustota se však u různých zdrojů plazmatu může lišit, a v závislosti na napájení a pracovním plynu. UV záření u kterého víme, že působí baktericidně je v poměrně úzkém rozmezí vlnových délek a se specifickým výkonem, nicméně i menší dávka způsobuje buněčné poškození. Navíc neproniká do velkých hloubek (řádu μm) takže působí efektivněji v případě malých bakterií ve vegetativním stádiu. Několik různých výzkumných skupin (například Lu a kol., 2008 nebo Jinasova, 2016) při využití různých zdrojů plazmatu potvrdilo, že UV záření nehraje významnou roli v plazmatem způsobené bakteriální inaktivaci.

Při tepelné sterilizaci jsou potřeba poměrně vysoké teploty aby měly požadovanou účinnost. Při sterilizaci za přítomnosti vodní páry (například v autoklávu) je to kolem $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ za vysokého tlaku, u suché sterilizace ještě více, až $170\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nicméně i nižší teploty vyvolávají u většiny bakterií subletální poškození či stresový stav. Teplota plazmatu klesá se vzdáleností od zdroje a průtokem plynu a závisí na použitém zdroji. U některých typů zdrojů je možno počítat i s efektem tepelného šoku, který podle Bauermeistera a kol. (2011) u některých typů bakterií (*E. coli*, *C. albicans*, atd.) hraje roli již od $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ze systematických studií vyplývá, že vliv CAP na buňky je zprostředkován převážně prostřednictvím reaktivních forem kyslíku a dusíku – RONS (reactive oxygen and nitrogen species) (Lu a kol., 2016; Laroussi a kol., 2017). Mezi nejdůležitější představitele patří hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) a hydroxylový anion (OH^{-}), atomární kyslík (O), singletový delta kyslík ($\text{O}_2(^1\Delta)$), superoxidový anion (O_2^{-}), peroxid vodíku (H_2O_2) a oxid dusnatý (NO). Jejich složení a množství obsažené v plazmatu se může lišit v závislosti na použitém pracovním plynu a okolí. RONS jsou známy působením oxidativního stresu v bakteriální buňce, který ovlivňuje všechny biologické makromolekuly a může vést k degradaci cytoplazmatické membrány a DNA. Oxidativní stres je nerovnováha mezi vznikem ROS a antioxidačními mechanismy mikroorganismu. Nemusí být pro buňku nutně letální, ale snižuje její životaschopnost a aktivitu. Hlavními ROS způsobujícími oxidativní stres jsou hydroxylový radikál, superoxid, radikál oxidu dusného a peroxyinitrit, z nichž každý má jinou střední dobu života a reaktivitu. Některé z nich jsou v buňce přítomny přirozeně, jako metabolické produkty a díky ochranným mechanismům produkujícím antioxidanty

nepůsobí za běžných okolností buňce oxidativní stres. Nicméně plazma způsobuje nárůst koncentrace RONS nad fyziologický limit, ochranné mechanismy zde selhávají a může dojít k letálnímu poškození buňky. Předpokládá se, že mechanismus účinku CAP v nádorových buňkách souvisí se zvýšením intracelulární koncentrace ROS, což může vést k zastavení buněčného cyklu v S fázi, dvouvláknovým zlomům v DNA (což je poškození, které umí buňka opravit jen velmi omezeně a je pro ni často letální) a apoptóze. Výzkumy různých skupin ukazují, že RONS generované pomocí CAP reagují s buněčnou membránou a mohou dokonce pronikat do buňky a následně uvnitř reagovat, což může spustit buněčné signalizační kaskády které mohou na vést až k apoptóze rakovinných buněk (Laroussi a kol., 2017). Dřívější studie objevili, že normální buňky jsou odolnější proti plazmatem vyvolanému oxidativnímu stresu než nádorové buňky, díky tomu by mohlo být ošetřování plazmatem cíleno na konkrétní druh buněk (Iseki a kol., 2012; Wang a kol., 2013). Friedman a kolegové (2008) pozorovali, že selektivní efekt působení plazmatu je vysoce závislý na době jeho aplikace, pro krátké časy ošetření nebylo způsobeno žádné poškození kůže. Normální buňky tudíž mohou vydržet mírnou úroveň oxidativního stresu, ovšem do určitého limitu, delší čas expozice nevyhnutelně způsobí jejich těžké poškození. Navíc bylo experimentálně prokázáno, že plazmatem generované RONS mohou pronikat biologickými tkáněmi až do hloubky více než 1 mm a tedy interagovat nejen s buňkami na povrchu, ale i hlubšími strukturami (Duan a kol., 2017).

Interakce všech bioaktivních složek plazmatu s biologickým materiálem je velmi komplexní a složitá, proto jí stále úplně nerozumíme. Navíc jednotlivé fyzikální a chemické procesy indukované plazmatem závisí na mnoha různých parametrech včetně okolních podmínek v laboratoři a povaze biologického vzorku, který je používán. Všechna tato fakta způsobují velké problémy se vzájemným porovnáváním získaných výsledků.

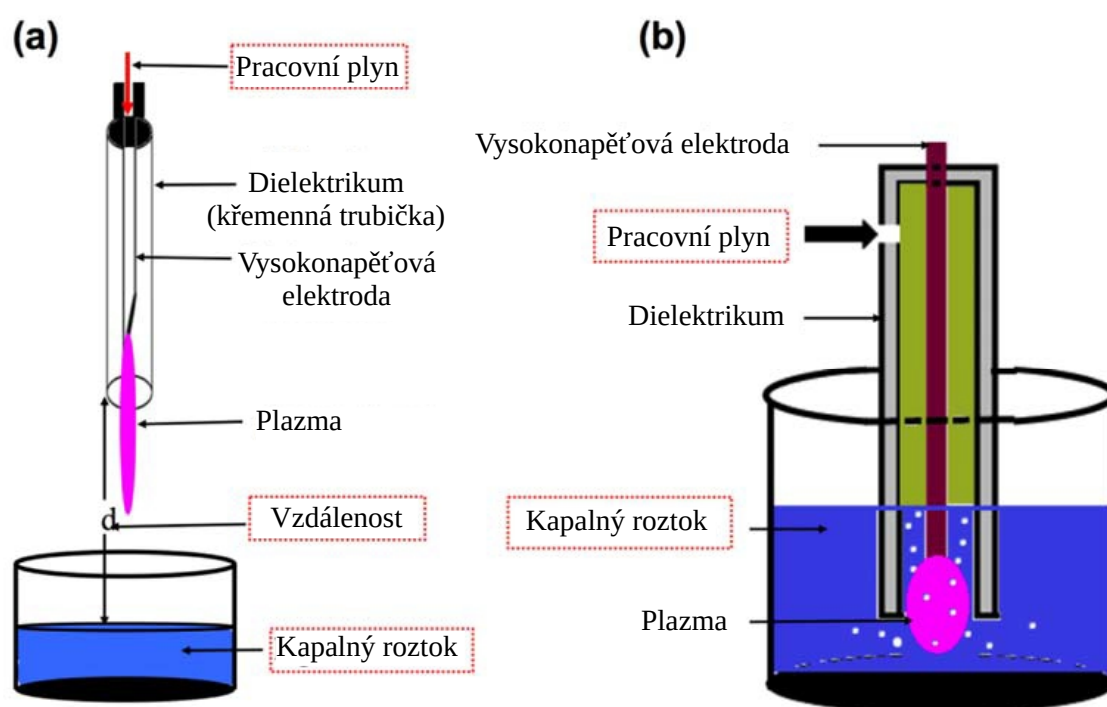
2. Plazmatem aktivované roztoky

V této části budou shrnuty základní poznatky o interakci CAP s tekutými médii. Experiment uskutečněný v rámci této práce, jehož data budou prezentovaná dále, sice nevyužívá plazmatem aktivovaná média, ale vzhledem k tomu, že živné půdy pro bakterie které byly použity, obsahují více než 90 % vody a lidské tělo je tvořeno zhruba ze 70 % vodou (například při modelování interakce ionizujícího záření s živými organismy se jako nejvhodnější jeví nahradit v modelech tkáně vodou) probíhá většina interakcí plazmatu s tkáněmi ve vodném prostředí. Zahrnutí této kapitoly je tedy na místě i přes to, že využití přímo CAP je efektivnější a zahrnuje větší množství krátce žijících RONS.

2.1 Základní charakteristika

Plazmatem aktivované roztoky lze vytvořit z biologických tekutých medií, roztoků, či samotné vody jejich vystavením působení CAP po dobu v řádu minut. Plazmatem generované reaktivní formy molekul a atomů, v těsné blízkosti s tekutinou reagují a vytváří roztoky obsahující reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), které nazýváme plazmatem aktivované medium (PAM) nebo plazmatem aktivovaná voda (PAW). Po ošetření plazmatem mají takto aktivované roztoky bioaktivní roli a jsou obohaceny o dlouho žijící RONS jako je peroxid vodíku (H_2O_2), dusitany (NO_2^-), dusičnany (NO_3^-), peroxinitrity ($ONOO^-$) a organické radikály, které mají dobu života od hodin po několik dní a jsou nyní široce studovány pro jejich rozličné využití v různých biomedicínských aplikacích. Výhodou plazmatem aktivovaných roztoků je možnost je dopravit na místa, kde by přímá generace plazmatu nebyla možná, jako jsou malé orgány a těžko přístupné tělní dutiny. Vykazují velmi slibné výsledky v souvislosti se sterilizací živých tkání, koagulací krve, ničením nádorových buněk, hojení ran, jako dezinfekce pro medicínské vybavení a také jako typ ústní vody při zubních obtížích. Plazmatem aktivované roztoky jsou unikátní tím, že zůstávají stabilní při pokojové teplotě a je možné na ně plazmatem působit déle než při přímém aplikaci, bez nežádoucího poškození zdravé tkáně. Jejich účinnost závisí na mnoha faktorech jako je doba vystavení plazmatu a délka a teplota skladování.

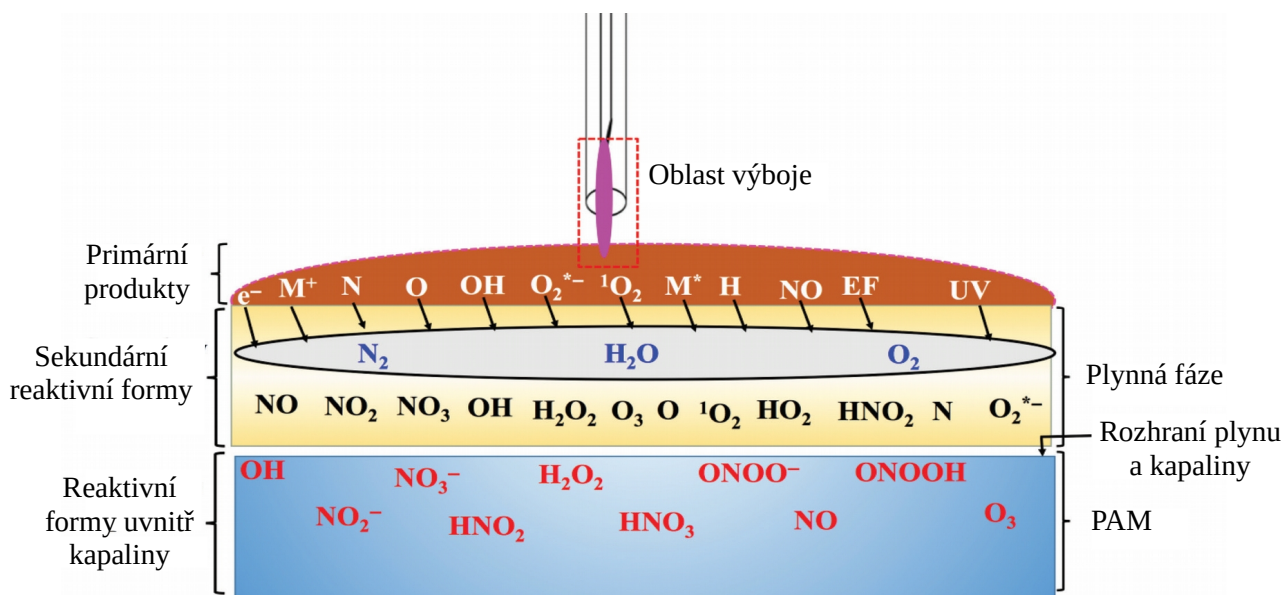
Plazmatem aktivované roztoky odkazují na nepřímou aplikaci plazmatu na biologické cíle. Roztoky získané po přímé aplikaci plazmatu jsou poté přesunuty na ošetřované místo. Schématický diagram přípravy plazmatem aktivovaného roztoku pomocí konvenční plazmové trysky je znázorněn na obrázku 2. Parametry, které mohou měnit charakteristické vlastnosti PAM jsou na obrázku v tečkovaných obdélnících. Hlavní komponentou je pracovní plyn, běžně je používán dusík, kyslík, inertní plyny vodní pára a jejich směsi, který určuje které RONS budou v plazmatu přítomny. Zdá se, že takovýto typ roztoku by mohl být novým slibným nástrojem na poli plazmové medicíny.



Obr. 2 – Schématický diagram znázorňuje dva způsoby přípravy PAM, (a) kdy plazma je generováno mimo ošetřovanou tekutinu a (b) kdy je plazma generováno přímo uvnitř tekutiny. V tečkovaných obdélnících jsou parametry, jejichž změnou lze přizpůsobit charakteristické vlastnosti PAM (není zde uvedena doba působení CAP na roztok a dodaná energie zdroje). (Kaushik a kol., 2018)

2.2 Chemické základy

Dopravit aktivní složky do kapaliny pomocí plazmatu lze dvěma různými způsoby aplikace: vně tekutého prostředí a uvnitř tekutiny. Schématický diagram těchto dvou metod je ukázán na obrázcích 2a a 2b. Pokud je zdroj plazmatu (typicky plazmová tryska, viz. obrázek 4) provozován mimo tekuté prostředí, existují dva způsoby formování aktivních složek, buď přímou interakcí (dotykem) a nebo nepřímou interakcí (bez dotyku) s plazmovým oblakem (Norberg a kol., 2014). V bezdotykových podmínkách je biologický roztok umístěn přímo pod zdroj plazmatu tak, že zde není žádný přímý kontakt mezi viditelnou částí oblaku a povrchem kapaliny. RONS jsou zpočátku generovány v plynné fázi interakcí plazmatu se vzduchem a následně se rozpouští a akumulují v tekutém prostředí. Formování aktivních složek v kapalině může být upraveno změnou určitých parametrů plazmového zpracování, jako je pracovní plyn, průtok plynu, čas působení, vzdálenost mezi tekutinou a plazmatem, typ cílového roztoku a jeho množství, například v souladu se změnou dodané energie. Toto může být více či méně důležité v závislosti na množství různých pufrů a antioxidantů v roztoku (Ghimire a kol., 2017).



Obr. 3 – Schéma formování aktivních složek v mediu aktivovaném pomocí konvenčního plazma jetu. (Kaushik a kol., 2018)

Na obrázku 3 je znázorněn schématický diagram formování aktivních složek plazmatu, tj. reaktivních forem, generovaných v oblasti výboje, v plynné fázi a uvnitř tekutiny, pomocí konvenční plazmové trysky. Kromě efektu elektrického pole (EF) a UV záření mohou být neutrální molekuly plynu (M) excitovány (M^*) nebo ionizovány (M^+) srážkami s energetickými elektrony (e^-) produkovanými během výboje. Primární RONS jako jsou hydroxylové radikály (OH), radikály oxidu dusnatého (NO), radikály superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), atomový kyslík (O), singletový kyslík (1O_2) a excitovaný dusík (N) jsou produkovány přímo v aktivní oblasti výboje díky interakci elektronů s molekulami pracovního plynu nebo okolního vzduchu. Tyto mají poměrně krátkou dobu života a jejich koncentrace v aktivní oblasti výboje je velmi vysoká. Byly použity různé diagnostické techniky pro získání kvalitativní analýzy týkající se těchto forem atomů a molekul vně i uvnitř povrchu tekutiny, například optická emisní spektroskopie, laserem indukovaná fluorescence, UV absorpční spektroskopie, elektronová spinová resonance a kalorimetrické metody (Yue a kol., 2016a,b; Ghimire a kol., 2017). Ve studiích je uvedena koncentrace OH radikálů a atomického kyslíku v okolním prostředí $\approx 1 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ (Dvořák a kol., 2017; Xiong a kol., 2015), ty jsou přeměněny na sekundární/dlouho žijící molekuly jako jsou peroxid vodíku (H_2O_2), dusitany (NO_2), dusičnany (NO_3) a ozon (O_3). RONS generované v plynné fázi mohou přejít do kapalně fáze a rozpustit se v roztoku. H_2O_2 je vysoce rozpustný ve vodě, NO_2 a NO_3 se přeměňují na NO_2^- a NO_3^- . Nicméně chemické procesy okolo formování RONS se liší v závislosti na tom, zda se plazmový oblak dotýká povrchu tekutiny či nikoliv. V přítomnosti plazmového zdroje probíhá velké množství kreačních a destrukčních procesů různých RONS skrze mnoho krátce žijících forem, utvářených během výboje, které se velmi rychle a snadno přeměňují na stabilní formy. Díky dlouhé době života hlavních složek, v tomto případě H_2O_2 , NO, NO_2 , NO_3 a HNO_3 , může být PAM skladován několik dní a lze jej tedy převézt i na vzdálená místa, kde plazmové zdroje nejsou k dispozici. Ačkoli PAM vždy obsahuje podobné složky, má široké pole uplatnění. Například H_2O_2 může, v závislosti na jeho koncentraci, efektivně působit apoptózu nebo nekrózu a může být použit na nádorové buňky (Xiang a kol., 2016). Stejná sloučenina také projevuje bělicí vlastnosti, naznačující její potenciál aktivní složky pro použití v přípravcích na bělení zubů. Byla též použita na sterilizaci a v oblasti zemědělství díky její efektivitě při zabíjení bakterií a plísní (Friedline a kol., 2015). Dále též NO je mnohostranně využitelná molekula s dichotomickou regulační schopností v mnoha

oblastech biologie. Jakožto signální molekula aktivuje různé procesy v biologických systémech a též ovlivňuje buněčné rozhodování ohledně smrti buňky, sepnutím apoptotických drah, nebo jejich vypnutím. Deriváty NO, jako dusičnany a dusitany, pomáhají růstu rostlin, čímž rozšiřují možné použití PAM i na zemědělství.

2.3 Vliv PAM na buňky – role RONS

Ve vztahu k dalšímu medicínskému využití je velmi důležité porozumět interakci mezi plazmatem aktivovanými roztoky a buňkami (normálními, zdravými i nádorovými). PAM má i řadu dalších pozitivních vlastností, než je působení buněčného poškození a indukce apoptózy. Velmi zajímavá je jeho izolace chemických efektů (RONS) v aktivovaném mediu odděleně od přímého efektu ostatních činidel v plazmatu, jako jsou například nabitě částice, UV záření nebo teplo. Toto zjištění rozšířilo aplikaci CAP indukované terapie v podobě PAM tam, kde jsou nádorové terapie spojeny s nechtěnými vedlejšími efekty kvůli poškození zdravých tkání. Voda ošetřená nízkou dávkou plazmatu může podporovat růst buněk, zatímco při ošetření velkou dávkou plazmatu tato voda vyvolává apoptózu nebo nekrózu, což znázorňuje závislost způsobeného oxidativního stresu na dávce plazmatu. Vychytávání RONS, pozorované u mnoha kmenů nádorových buněk, má za následek jejich poškození. Schopnost PAM působit buněčným poškozením je závislá na různých faktorech, jako je typ media, hustota buněk v mediu a objem použitého PAM. Pokud medium obsahuje činidla potlačující RONS, například pyruvát, bude protinádorový efekt PAM menší. Nižší hustota buněk a větší objem PAM vedou k vyššímu procentu poškození buněk.

Věří se, že RONS nebo jejich deriváty jsou klíčovými faktory vedoucími k jeho protinádorovému efektu. Krátce žijící RONS produkované plazmatickým výbojem jsou přeměněny na relativně dlouho žijící formy popsané výše, které jsou zodpovědné za vysokou a dlouhotrvající reaktivitu PAM. OH radikály jsou silnými oxidanty, nicméně jsou krátce žijícími ROS a jsou rychle přeměněny na dlouho žijící stabilní formy jako je peroxid vodíku. H_2O_2 je považován za hlavní aktivní složku při PAM vyvolaném poškození buněk (Boehm a kol., 2017) a navíc může volně difundovat přes buněčnou membránu aniž by ji porušil. Nicméně produkty aktivity H_2O_2 , například organické

peroxydy, mohou porušit strukturu membrány a zvýšit její propustnost, což se může stát prvním krokem k buněčnému poškození vyvolanému díky H_2O_2 , který může být následován přílivem extracelulárních reaktivních forem z okolního plazmatem aktivovaného roztoku do buňky. Některé formy obsažené v PAM mají však vzhledem k H_2O_2 kooperativní roli (Adachi a kol., 2015).

NO může snadno procházet buněčnou membránou a membránou organel, snadno se rozpouští ve vodě, způsobuje nárůst intracelulárních ROS a poškození mitochondrií, což v konečném důsledku vede ke spuštění apoptózy. Byly vyvinuty specifické druhy PAM, jako například NO-PAM, kdy se zvyšuje koncentrace NO, probubláváním plynu ve vodě, až na 140 μmol . Rozsáhlá akumulace NO radikálů uvnitř nádorových buněk vyvolává jejich apoptózu (Li a kol., 2017a). Studie se nicméně neshodují co se týče doby života NO, existují výzkumy, kdy ve vodném roztoku byl udržován poločas rozpadu NO až 24h, jiné skupiny tvrdí, že NO je krátce žijící molekula a rychle se v PAM mění na NO_2^- a NO_3^- . NO_2^- je do koncentrace tisíců mikromolů, pro nádorové buňky (glioblastoma) velmi málo toxický, nicméně přidáním NO_2^- k H_2O_2 do media vzniká synergický efekt, který zvyšuje úmrtnost nádorových buněk, stále však není tak silný jako v případě kompletního PAM (Kurake a kol., 2016). Tento experiment dokazuje, že další molekuly obsažené v PAM hrají též nezanedbatelnou roli ve výsledné protinádorové aktivitě. Dále bylo objeveno, že NO_2^- nebo NO radikály a H_2O_2 spolu reagují za vzniku peroxynitritu (ONOO^-), který je toxický a napadá důležité makromolekuly v buňce, což by mohlo vysvětlovat pozorovaný synergický efekt.

Dalším důležitým faktorem ve vztahu k PAM je fetální bovinní serum (FBS). Protinádorová kapacita PAM může být regulována kontrolou koncentrace FBS v mediu a teploty skladování. Yan a kolegové (2014) demonstrovali protektivní roli FBS v PAM u buněk U87. Kapacita zabíjení buněk PAM klesala s rostoucí koncentrací FBS. Podobný fenomén byl pozorován i jinými vědeckými skupinami které ukázaly, že přítomnost FBS v PAM fungovala jako vychytávač RONS, proto snižovala protinádorovou aktivitu. Díky vychytávacímu efektu FBS, koncentrace H_2O_2 v PAM rostla lineárně s dobou ošetření media plazmatem, avšak rostla pomaleji pro media s obsahem FBS v porovnání s medii bez FBS. Koncentrace NO_2^- roste lineárně s rostoucí délkou doby působení plazmatu na medium a není ovlivněna přítomností FBS v mediu (Kurake a kol,

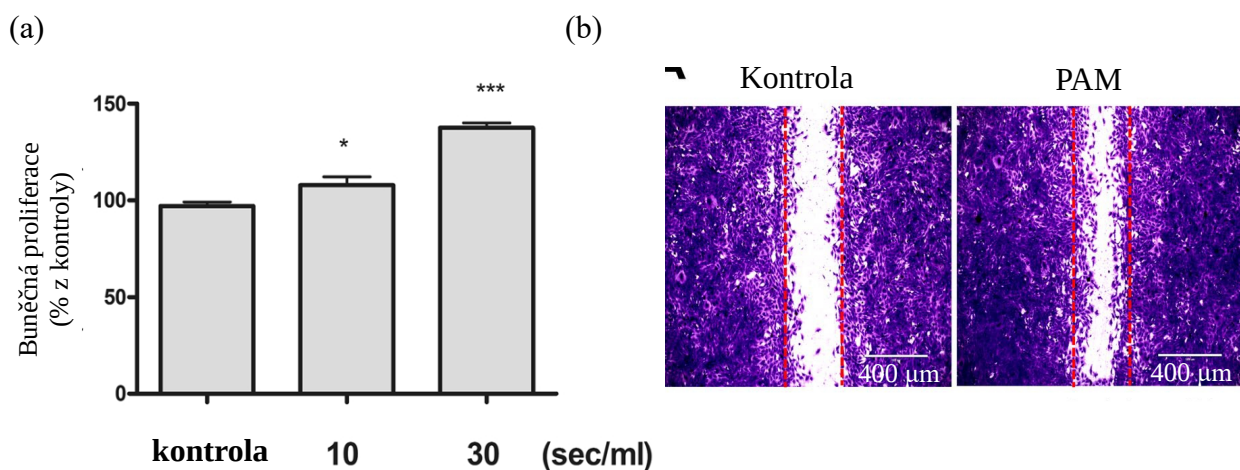
2016). Tyto výsledky naznačují, že FBS má větší vychytávací efekt na ROS, než na RNS, což by mohlo přispívat k nestabilitě PAM během jeho skladování.

Selektivní mechanismus vůči nádorovým buňkám v prostředí PAM, zprostředkovaný díky RONS, může být vysvětlen z hlediska rozdílného statusu nádorových a normálních buněk. Jedno možné vysvětlení jsou vyšší rezervy antioxidantů, které má normální buňka na rozdíl od nádorové, proto jsou normální buňky tolerantnější k exogennímu stresu způsobenému RONS. Naproti tomu nádorové buňky mají specifické metabolické potřeby a více aquaporinů na svém povrchu, než normální zdravé buňky, jsou tedy více bezbranné vůči akumulaci intracelulárních RONS.

Ošetření PAM může být zodpovědné za i za potlačení životaschopnosti mnoha druhů normálních buněk, jako jsou MDCK (canine kidney epithelial cells) buňky a ScaBER buňky, kvůli obsahu peroxidu vodíku (Mohades a kol., 2016a,b), což není žádoucí. Kultivace jaterních nádorových buněk (HepG2) a normálních buněk jater (L02) v mediích ošetřených plazmovou tryskou po různě dlouhé intervaly, ukazuje u monokultur pokles v adhezenci buněk s rostoucí dobou ošetření PAM. Tento vývoj naznačuje, že optimální dávka PAM (10 min ošetření plazmatem) může při společné kultivaci zabít nádorové buňky a těm zdravým způsobit jen lehká poškození. To může být připisováno zvýšené koncentraci H_2O_2 (594 μmol) a NO (29 μmol) při ošetření plazmatem 10 minut.

U lidských bronchiálních, epiteliálních buněk bylo po ošetření plazmatem aktivovaným médiem (s 0,9 % NaCl, kvůli podobnosti se salinem, použitým v in vivo experimentech) prokázáno zvýšení buněčné proliferace a migrace, zásadně ovlivňující proces hojení rány (Ho-Ryun a kol., 2018). Na obrázku 4a je vidět statisticky významné zvýšení buněčné proliferace, vyhodnocené pomocí BrdU testu. Buněčná migrace pozitivně ovlivňuje schopnost rány se hojit. Migrace byla zkoumána pomocí testu seškrábnutím vrstvičky přisedlých buněk. Pod mikroskopem byl vyhodnocen poměr odhalené části škrábnutí u PAM ošetřené a kontrolní skupiny (po 24h) a výsledek je vidět v obrázku 4b. Migrace byla znatelně zvýšena po ošetření plazmatem aktivovaným roztokem.

Na zvířecím modelu byla pak demonstrována schopnost plazmatem aktivovaného salinu (0,9 % NaCl) zlepšovat regeneraci sliznice nosního septa. Bylo pozorováno zvýšení buněčné proliferace, snížení zánětlivých procesů a otoku rány po ošetření plazmatem aktivovaným salinem v porovnání s kontrolní skupinou (Ho-Ryun a kol., 2018).



Obr. 4 – Plazmatem aktivované roztoky zvyšují proliferaci a migraci bronchiálních epitelálních buněk (BEAS-2B). Na diagramu (a) je pozorovatelný staticky významný vzrůst proliferace s rostoucí délkou času ošetření roztoku pomocí CAP. (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). (b) Buňky byly ošetřeny roztokem, vystaveným CAP po dobu 30s a inkubovány 24 hodin. Byl proveden test hojení rány seškrábnutím vrstvy buněk a porovnáním výsledků pro vzorek ošetřený pomocí PAM a kontrolní skupiny. (Ho-Ryun a kol., 2018)

In vivo experimenty jsou velmi důležité, jelikož většinou přinesou méně pozitivní výsledky než *in vitro* experimenty, pravděpodobně kvůli rozličným vychytávacím přítomným v živých tkáních, které neutralizují RONS v PAM. Budoucí práce by měly vést k porozumění velice komplexním procesům iniciovaným RONS, obsaženými v PAM, ve skutečných buňkách a tkáních.

3. Zdroje nízkoteplotního plazmatu využitelné ve zdravotnictví

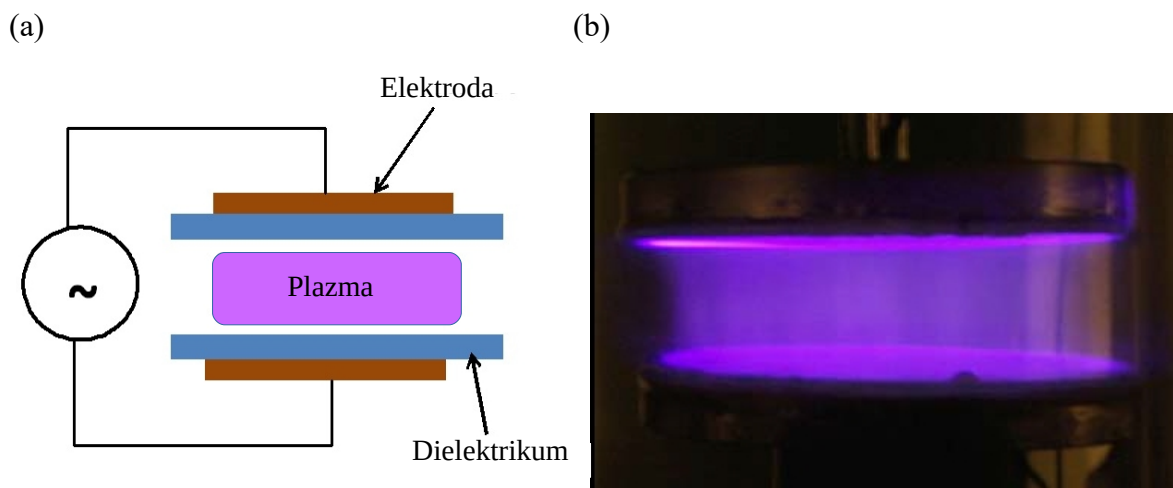
Plazma je obecně získáváno aplikací vysokého napětí na aktivní elektrodu za pomoci pracovního plynu, nejčastěji helia, argonu, dusíku, kyslíku, vzduchu, či jejich směsi. V biomedicínské oblasti jde většinou o výboj za atmosferického tlaku, jehož využití je výrazně snazší (například manipulace s ošetřovanými objekty) a levnější.

3.1 Typy zdrojů

Dvěma hlavními zdroji používanými ve výzkumu na poli plazmové medicíny je dielektrický bariérový výboj (dielectric barrier discharge – DBD) a plazmová tryska (plasmajet). Perspektivní je též korónový výboj, díky jeho jednoduchosti.

3.1.1 Dielektrický bariérový výboj

Na počátcích výzkumu byl používán DBD při experimentech s inaktivací bakterií. Na obrázku 5 je vidět schéma DBD a fotografie difúzního plazmatu generovaného pomocí DBD za atmosferického tlaku. Při dielektrickém bariérovém výboji dochází k zapálení výboje (tvorbě plazmatu) pomocí střídavého proudu mezi dvěma elektrodami oddělenými tuhým dielektrickým materiálem (například sklo nebo plast). Takovým materiálem může být křemen, sklo, akryl nebo teflon a vysokonapěťové elektrody jsou z vodivého materiálu jako měď, nerezová ocel nebo stříbro. Díky dielektriku dochází k uzavření proudového obvodu posuvnými proudy a proto má tato konfigurace nižší sklony k přechodu do jiskry nebo obloukového výboje. Jelikož v takovém uspořádání není možný transport náboje, dochází pouze k elektrické indukci a polarizaci dielektrika. DBD nejčastěji využívá deskové elektrody pokryté vrstvou dielektrika a plazma je generováno v prostoru mezi elektrodami pomocí silného sinusového napětí ve frekvenčním rozsahu řádu kHz. U DBD se plazma objevuje v rozsáhlé vrstvě mezi plochými elektrodami, zatímco u korónového výboje se objevuje aktivní zóna jen blízko bodové elektrody (nebo je limitována v oblasti mm). Obvykle jsou používány pracovní plyny jako helium s příměsí kyslíku či vzduchu.



Obr. 5 – (a) Schéma a (b) fotografie dielektrického bariérového výboje (DBD) produkujícího difuzní plazma za atmosférického tlaku. Na fotografii vpravo je výboj buzený vysokým napětím se sinusovým průběhem řádu kHz, použitým pracovním plynem je helium s malou příměsí vzduchu. (Laroussi, 2018)

3.1.2 Korónový výboj

Jako zdroj plazmatu vhodný pro biomedicínské aplikace může být využit též korónový výboj, který je obvykle generován přiložením vysokého napětí na ostré elektrody, hroty, či velmi tenké drátky. V blízkosti elektrody s malým poloměrem křivosti má díky geometrii elektrického pole tak vysokou intenzitu, že je překročena elektrická pevnost pracovního plynu. K zapálení výboje je nutné aby kombinací geometrie a přiloženého napětí byla dosažena taková intenzita elektrického pole, aby byly elektrony urychleny na ionizační energii pracovního plynu. Viditelný tvar koróny, který dal výboji jméno je vyvolán tím, že v blízkosti ostré elektrody dochází k excitacím a vyzařování ve viditelné oblasti spektra. Z biologického hlediska je důležité, že tento výboj vyzařuje i v UV oblasti. Pokud dále zvyšujeme přiložené napětí popsaný korónový výboj se mění v doutnavou korónu a dále v přechodovou jiskru, viz. Obr. 6 (Ashkiev a kol., 2005). Navzdory napájení stejnosměrným napětím je charakter výboje pulzní s frekvencí až několik desítek kHz. Od vysokonapěťové elektrody začíná díky silnému elektrickému poli vznikat streamer (mechanismus je podobný jako u bleskového výboje v atmosféře). Obvykle se začíná tvořit z lokalizovaného ionizačního zárodku nebo malého místa na elektrodě a pak už se náboj lavinovitě šíří prostorem k druhé elektrodě díky vnějšímu elektrickému poli posíleném generací vlastního pole. Mechanismus propagace streameru se liší v závislosti na jeho

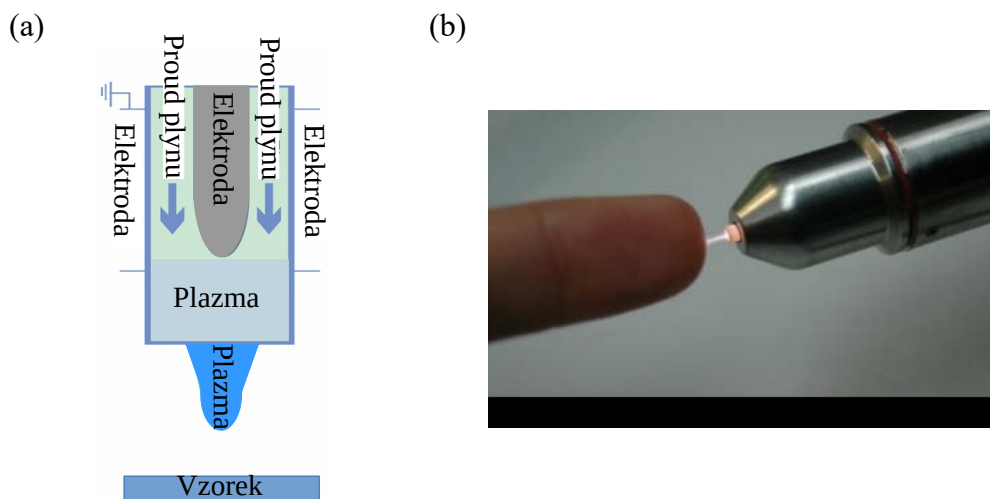
polaritě, negativnímu stačí volné elektrony z ionizovaného kanálu, pozitivní potřebuje zdroj volných elektronů z okolního plynu (Lukes a kol., 2012). Inaktivaci mikroorganismů pomocí korónového výboje zkoumalo několik různých autorů, například Scholtz a kol. (2016).



Obr. 6 – (a) korónový výboj (b) doutnáva koróna (c) přechodová jiskra (Ashkiev a kol., 2005).

3.1.3 Plazmová tryska

Plazmová tryska vlastně není samostatným typem výboje z hlediska klasifikace na základě fyzikálních vlastností, je pouze speciální konfigurací korónového, nebo DBD výboje. Produkce reaktivních forem v plazmové trysce je buzena aplikací vysokého střídavého napětí přes vysokonapěťovou elektrodu. Aktivní oblast výboje je rozfukována proudem plynu, který odnáší částice mimo elektrodovou oblast v propagujících se ionizujících vlnách a zformuje proud aktivních částic, vypadající jako malý výtrysk (jet). Plazmová tryska tedy produkuje oblaky plazmatu (plasma plumes), které se propagují do okolního vzduchu a díky proudícímu plynu směrem od působení elektrod. Oblak z plazmové trysky má velikost od pár milimetrů do několika centimetrů, je tedy viditelný pouhým okem. Díky tomuto uspořádání mohou být reaktivní formy generované plazmatem snadno transportovány směrem ven z hlavní oblasti, kde je plazma vytvářeno a působit na cílovou plochu (například tkáň). Navíc je spojením lokální aplikace a vysoké deponované energie a jeho údržba je poměrně jednoduchá. Tyto charakteristické vlastnosti činí plazmovou trysku velmi atraktivním nástrojem pro biologické a medicínské aplikace (Weltmann a kol., 2010; Lu a kol., 2016). Obrázek 7 znázorňuje schéma a fotografii zdroje typu plazmové trysky – kINPen, který je hojně využíván ve výzkumu na poli plazmové medicíny.



Obr. 7 – (a) Schéma (Mai-Prochnow, 2015) a (b) fotografie komerčně používaného zdroje typu plazmové trysky - kINPen (INP, Greifswald, Germany) (Laroussi, 2018).

Později se ukázalo, že oblaky plazmatu emitované plazmovou tryskou jsou složeny z malých „balíčků“ pohybujících se velmi vysokými rychlostmi (desítky km/s). Tyto plazmové balíčky začaly být známé jako „plazmové kulky“ (plasma bullets) a byly poprvé objeveny na začátku 21. století nezávisle na sobě dvěma různými skupinami: Techke a kol. (2005) a Lu a Laroussi (2006). Lu a Laroussi využívali nanosekundové DC pulzy zatímco Techke a kol. se zabývali RF napájením. Následně byly plazmové kulky rozsáhle zkoumány různými skupinami, jak experimentálně, tak pomocí počítačového modelování (například Lu a kol., 2012). Dnes panuje obecná shoda, že plazmové kulky jsou řízené ionizační vlny (Lu a kol., 2014).

3.2 Mechanismy působení plazmatu na buňky

Většina energie zdroje CAP je rozptýlena na ionizaci neutrálních molekul a atomů plynu jejíž výsledkem jsou elektrony, excitované nebo ionizované atomy, UV záření, elektrické pole, mírné teplo a další efekty s celkovou teplotou blízkou okolnímu prostředí. Excitované/ionizované atomy reagují s ostatními atomy pracovního (nebo okolního) plynu, výsledkem je, že CAP obsahuje množství různých aktivních složek. Jednou z nich jsou například různé typy částic – konkrétně UV fotony, neutrální či excitované atomy a molekuly, kladné i záporné ionty, volné radikály a elektrony. Další důležitou složkou jsou

lokální pole – elektrické (kvůli lokálním nehomogenitám), proudové (proud nikdy neteče rovnoměrně, do určité míry svazkuje) a tepelné. V běžně používaných zdrojích jsou hlavními reaktivními složkami elektronově či vibračně excitované částice, kyslík (O_2), dusík (N_2), ROS jako atomární kyslík (O), singletní kyslík (1O_2), superoxidový aniont (O_2^-) a ozon (O_3), RNS jako atomární dusík (N), excitované molekuly dusíku a oxid dusnatý (NO); v případě přítomnosti vzdušné vlhkosti se objevují reaktivní formy tvořené z vody jako H_2O^+ , OH^- , OH radikál, peroxid vodíku (H_2O_2). (Scholtz, 2015)

Je vidět, že dochází k formování hojného množství RONS, které mají v biomedicíně široké pole využití. Nicméně složení a hojnost zastoupení zmíněných složek se může výrazně měnit v závislosti na typu zdroje. Na základě tohoto zjištění bylo všude po světě vyvinuto mnoho různých plazmových zařízení jako jsou plazmová tryska a DBD zdroje s různými konfiguracemi. Navíc byl formulován oficiální postup pro testovací proceduru CAP zařízení, což umožňuje porovnání bezpečné aplikace těchto zařízení pro klinické účely (Mann a kol., 2016). Na konci první dekády 21. století bylo schváleno několik CAP zdrojů pro kosmetické a medicínské účely. Příkladem jsou: 2008 US FDA schválila Rhytec Portrait® (plazmová tryska) pro použití v dermatologii. V US jsou používána i jiná zařízení produkující CAP pro různé medicínské aplikace, například Bovie J-Plasma® a Canady Helios Cold Plasma a Hybrid Plasma™ Scalpel. V Německu byla v roce 2013 udělena certifikační třída medicínských zařízení IIa přístroji kINPen® (plasma jet), znázorněnému na obrázku 6 a také PlasmaDerm® device (CINOGY GmbH) bylo schváleno.

Pokud jsou zdroje plazmatu použity pro biomedicínské aplikace, specifické cíle mohou vyžadovat přímé, nebo nepřímé ošetření. Při přímé léčbě je aktivní výbojová zóna oblaku plazmatu o okolní teplotě v přímém kontaktu s biologickým cílem. Toto může být výhodné pro ošetření silně postižených ran a v podmínkách, kdy se jedná o anatomické lokality snadno přístupné aplikaci plazmatu (Akimoto et al., 2016; Bekeschus et al., 2016). Během nepřímé léčby je po určitou dobu působení plazmatu vystaven (dotykově či bezdotykově) aplikační roztok. K ošetření biologického cíle je poté použit tento roztok a ne plazma přímo. Tento přístup je podrobněji rozebrán v kapitole výše.

4. Dezinfekce a ošetřování ran pomocí CAP

Zkrácení doby vyhojení rány zásadně zvyšuje kvalitu života pacienta. Hojení otevřených a chronických ran je velká výzva z hlediska terapeutického i ekonomického a využití CAP se zde zdá být efektivním a inovativním přístupem. Navíc velkým problémem ve zdravotnictví, kde by použití CAP mohlo být zajímavé, je terapie a prevence nosokomiálních infekcí, díky jeho schopnosti inaktivovat různé mikroorganismy, priony a jiné biomolekuly, ničit biofilmy a účinně dezinfikovat kontaminované povrchy s uspokojivou účinností a působit minimální poškození exponovaných biomateriálů a rostlinných či živočišných tkání. Pomocí CAP je možné podpořit koagulaci krve, deaktivovat bakterie a zároveň nepůsobit toxicky na okolní tkáň.

4.1 Vliv CAP na hojení ran

Hojení rány je velice komplexním procesem, kdy se kůže a tkáň pod ní opravují po poranění (posttraumatické reparační procesy). Správná a rychlá regenerace tkáně je důležitá pro hojení po chirurgických zákrocích nebo jiném poškození. CAP nepůsobí tepelné poškození tkáně (dosahují teplot cca 40 °C) a podněcuje jak hojení kožních poranění, tak regeneraci epiteliálních tkání. Jejich další důležitou vlastností je protizánětlivý, sterilizační a hemokoagulační efekt. Hemostáza při zacelování rány, je soubor současně probíhajících a navzájem se ovlivňujících dějů, které vedou k zastavení krváčení. Těmito ději jsou vazokonstrikce (reakce cév v místě poškození), činnost krevních destiček a hemokoagulační kaskáda. Vlastní hemokoagulace je sledem enzymatických reakcí aktivujících potřebné enzymy a výsledkem je tvorba sítě z fibrinových vláken, do které se zachycují krevní buňky.

Podpora procesu koagulace krve pomocí CAP je novou metodou, která je velmi efektivní při zastavování tekoucí krve během chirurgických operací (Miyamoto a kol., 2016). Na rozdíl od elektrokauterizace, kdy k hemokoagulaci dochází pomocí vysoké teploty, při aplikaci CAP k ní dochází odlišnými, specifitějšími mechanismy (tyto mechanismy se uplatňují i při vytvoření plazmatu při elektrokauterizaci). Bylo prokázáno, že dokáže podporovat aktivaci krevních destiček a formování fibrinových vláken i v antikoagulované

krvi (Fridman a kol., 2008). Důvodem je selektivní ovlivnění aktivity proteinu fibrinogenu, který se na tvorbě vláken podílí i v průběhu přirozených koagulačních mechanismů. Ueda a kol. (2015) ukázali, že zánětlivé procesy jsou po ošetření CAP mírnější, než při ošetření tepelným koagulátorem. Analýza elektronovým mikroskopem též odhalila přítomnost roztržitých buněk (fibroblastů) v kůži ošetřené elektrokoagulací, v kůži ošetřené pomocí CAP však fragmenty přítomny nebyly (Akimoto a kol., 2016). Ošetření rány plazmatem se tedy jeví méně invazivní a šetrnější k okolní tkáni, než elektrokauterizace. To také může vysvětlovat, proč dochází k menším zánětlivým reakcím při použití CAP, jelikož zánět je komplexní odpovědí organismu na poškození tkáně a fyziologicky zastává obranou funkci.

Pokud však imunitní systém nedokáže zánět ukončit, přechází do chronicity, což může být pro organismus nebezpečné. S chronickými záněty je spojena například cukrovka, ale také nádorová onemocnění. Schopnost plazmatu potlačovat zánětlivé reakce by tedy byla též velmi dobře využitelnou vlastností při ošetřování ran. Zajímavou studii v této oblasti uskutečnili Yoonje a kol. (2019), kdy zkoumali vliv ošetření argonovou plazmovou tryskou na popáleniny 3. stupně na zvířecím modelu. Studie ukázala, že při ošetření plazmatem dochází, díky potlačení zánětlivé fáze hojení, k menším nekrotickým změnám v okolní tkáni, která nebyla přímo vystavena popálení. Histopatologické nálezy prokázaly, že v plazmatem ošetřených místech je více fibroblastů a kolagenu a menší infiltrace neutrofilů způsobujících zánětlivé reakce.

Zdá se, že celý mechanismus hojení rány je při ošetřování CAP trochu jiný, než její přirozený průběh. Hlavním rozdílem je tvorba membránovité struktury překrývající ránu. CAP vyvolává tvorbu eosinofilní, vláknité, membránovité struktury, která překryje ránu, což se při přirozené koagulaci neděje (Ikehara a kol., 2013). Imunoelektronovou mikroskopií byla též v její blízkosti pozorována přítomnost galektinů, které jsou známy jejich významným zapojením do hojení kožních poranění a úzce souvisí s buněčnou proliferací. Galektiny -2 a -3 zřejmě hrají zásadní roli při formování membránovité struktury, která udržuje vlhké prostředí a podporuje reepitelizaci poranění a dále urychlují hojení rány.

CAP též podporuje hojení rány podpořením buněčné proliferace (Fathollah a kol., 2016), migrace keratinocytů a fibroblastů, což zrychluje reepitalizaci rány (Schmidt a kol., 2017), a vyvolává aktivitu genů souvisejících s hojícími procesy (Barton a kol., 2013). Buněčná proliferace a migrace pozitivně ovlivňuje schopnost rány se hojit. Při vzniku poranění,

traumatické rány, či popáleniny, značně vzroste indukovatelná syntéza NO v těle v zánětlivé a proliferační fázi hojícího procesu. Z toho lze vyvodit, že NO pozitivně ovlivňuje buněčnou proliferaci. RONS generované v CAP zřejmě hrají významnou roli v potlačení zánětu a stimulaci buněčné proliferace a dalších akcích podporujících správné a rychlé hojení ran. Molekula NO, která v buňce funguje jako druhý posel a regulátor biologických funkcí, je známa množstvím různých důležitých funkcí v lidském organismu, mimo jiné reguluje koagulaci krve, imunitní systém a apoptózu a poskytuje antimikrobiální a protinádorovou obranu. Byla též studována důležitost NO přidaného z vnějšku v infekčních a zánětlivých procesech spojených s jejím antimikrobiálním efektem, stimulaci imunitní odpovědi (například makrofágů, T-lymfocytů a imunoglobulinů) a cytotoxickou a ochrannou roli (v závislosti na podmínkách) (Fridman a kol., 2008).

Interakce CAP s živými tkáněmi a jeho podpoření reparačních procesů bylo prokázáno v mnoha studiích, co je však jen málo analyzováno a vysvětleno jsou mechanismy této interakce.

4.2 Cidní účinky CAP

Mikrobiální dekontaminací je chápán rozklad či odstranění infekčních agens (virů, bakterií, plísni a prionů), které mohou působit infekce, alergie, či intoxikace. Mikrobicidní léčba je definována jako snaha o zničení mikrobů, tento termín je nadřazen pro sterilizaci, dezinfekci a také aseptické a antiseptické procedury. Existuje mnoho prací referujících o schopnosti CAP efektivně inaktivovat širokou řadu mikroorganismů včetně bakterií, plísni, virů, bakteriálních spor a biofilmu (Kolb a kol., 2008; Pan a kol., 2013). V nemocnicích je zásadní možnost efektivní dezinfekce živé tkáně (lidské i zvířecí) s minimálním poškozením zdravých buněk. Využití různých chemických sloučenin toto ne vždy umožňuje, například v případě sterilizace otevřených ran, vředů či popálenin je nelze použít, jelikož příliš zatěžují poškozenou tkáň a orgány. Experimenty ukazují, že CAP je schopno efektivní a bezbolestné dezinfekce, bez poškození zdravé tkáně. Julák a Scholtz (2013) ukázali, že je možné provést dezinfekci kůže již během několika minut. Klíčovými inaktivačními činiteli při přímém působení plazmatu na mikrobiální buňky jsou ROS, jako je O, OH[•] a ¹O₂, způsobující v bakteriální buňce oxidativní stres, který byl blíže

popsán v první kapitole. V rámci oxidativního stresu ROS působí poškození DNA a proteinů, což má za následek poškození buňky a následně její smrt (Zhang a kol., 2012).

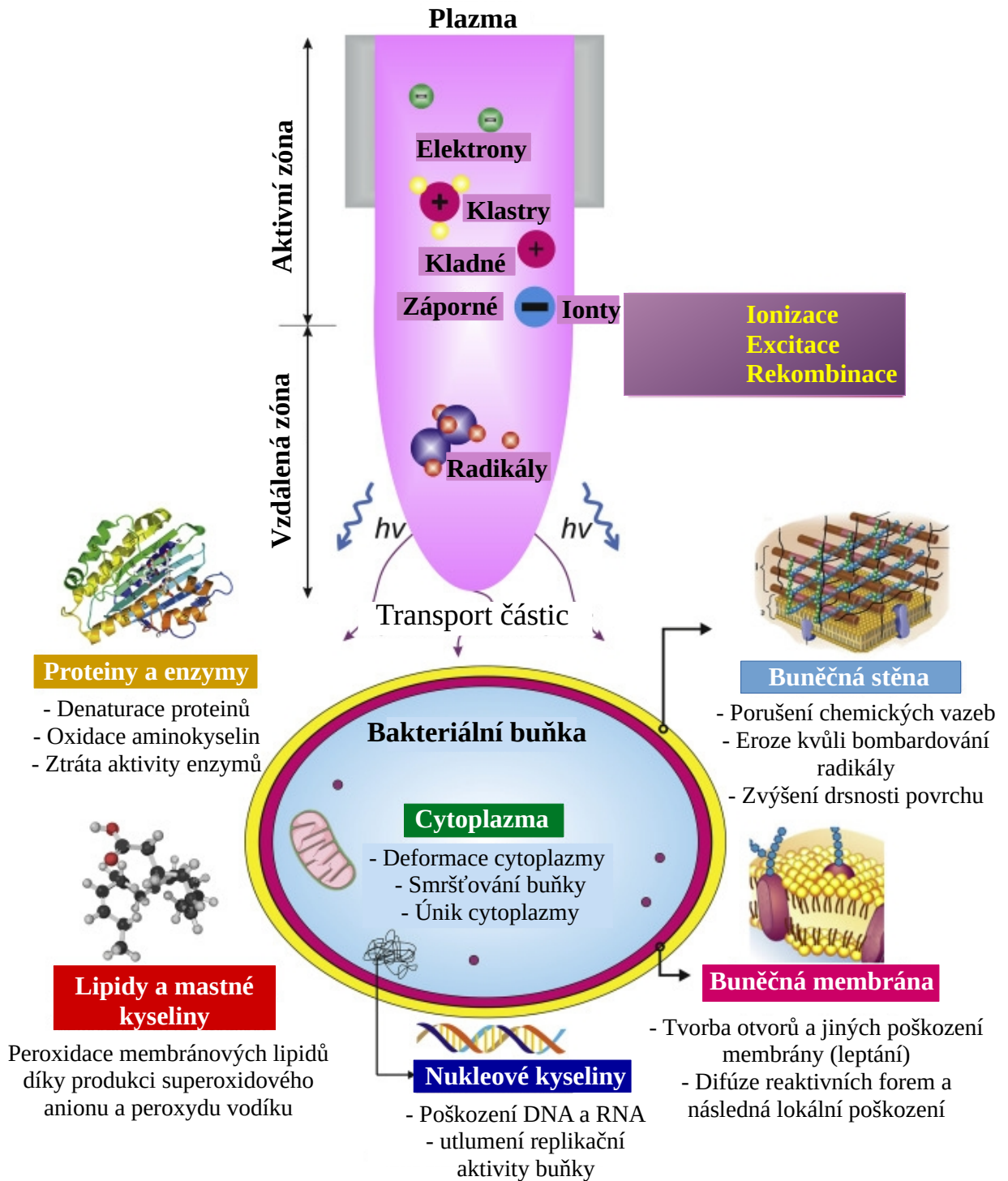
Hydroxylový radikál je znám působením peroxidace nenasycených mastných kyselin, ze kterých jsou složeny fosfolipidy tvořící cytoplazmatickou membránu buňky. Je jedním z nejsilnějších oxidačních činidel v buňce (i přirozeně přítomný). Reaguje s vodíkem v polynenasycené mastné kyselině za vzniku vody a lipidového radikálu, který je nestabilní a dále reaguje s kyslíkem za vzniku nestabilního a reaktivního peroxylového radikálu, který má potenciál odebrat vodík další mastné kyselině. Takto vznikají lipidové hydroperoxydy. Může též způsobit rozsáhlá poškození DNA, která mohou vést k tvorbě chybných proteinů, či jejich produkování úplně zastavit. Biologický vliv peroxidu vodíku je dán jeho silným oxidačním účinkem na lipidy, proteiny a DNA (zde způsobuje zlomy vláken DNA) za vzniku hydroxylového radikálu (ten dále způsobuje crosslinking v DNA). Navíc je v plazmatu zastoupen v poměrně vysoké míře.

Kumulace RONS uvnitř buňky lze docílit dvěma způsoby. Nejreaktivnější a nejtoxičtější z RONS (především OH^{\cdot}) mohou působit peroxidaci lipidů fosfolipidové dvojvrstvy buněčné membrány, což vede k zesíťování (cross-linking) bočních řetězců mastných kyselin a k formování přechodných pórů v buněčné membráně, následované jejím zprůchodněním a depolarizací membránového potenciálu. To umožňuje extracelulárním RONS vstoupit do buňky. Druhá možnost je, že vnější oxidativní stres způsobí oxidativní stres i v buňce a na základě toho vzroste koncentrace intracelulárních RONS. Pokud se přes porušenou membránu dostane do buňky velké množství protonů H^+ , sníží se pH. Pro bakteriální buňky může mít vymizení protonového gradientu fatální následky. Intracelulární RONS oxidují DNA a způsobují její fragmentaci, reagují s proteiny, lipidy a sacharidy a mění jejich molekulární strukturu a chemické vazby. Snížení pH a přítomnost RONS v buňce ničí acidobazickou a redoxní homeostázu a nakonec ústí ve fyziologické dysfunkce a buněčnou smrt (Zhang a kol., 2016).

Na bakterie působíme téměř vždy v prostředí bohatém na vodu a i samy jsou z velké části složeny z vody, bylo by tedy na místě zmínit se i o tom, jak CAP působí na vodu a vodné roztoky. Vliv plazmatu na vodu spočívá hlavně ve změně pH, elektrické vodivosti a tvorbě RONS, díky čemuž získá výsledný roztok oxidační potenciál. Obecně lze shrnout, že se vytváří kyselé roztoky s pH cca 2-3, obsahující H_2O_2 , NO_2 a NO_3 anionty (Oehmigen a kol., 2010). Panuje obecná shoda, že baktericidní aktivita PAW je dána synergickým

efektem vysokého kladného oxidačně-redukčního potenciálu (ORP) a nízkého pH. Mezi různými reaktivními formami v PAW hraje H_2O_2 klíčovou roli, nicméně OH^\cdot , O a O_3 se též nepřímo podílejí na ORP, jelikož mohou reagovat za vzniku stabilních forem a toxických molekul. Navíc je nutné uvažovat i RNS způsobující vysoký ORP, například NO a jeho deriváty vznikající při kontaktu s vodou, například NO_2^- , NO_3^- a ONOOH (Laroussi, 2005). Plasma jet byl například úspěšně použit k dezinfekci bakterií *B. subtilis* ve vodném prostředí (Sun a kol., 2012). Přehled plazmatem indukovaných poškození různých struktur v bakteriální buňce je znázorněn na obrázku 8.

Z výsledků různých studií je patrné, že bakterie ve vegetativní formě jsou výrazně citlivější na působení plazmatu (výsledek pozorovatelný již po jedné minutě expozice), než bakteriální spory, citlivost kvasinek (reakce je pozorovatelná až po šesti minutách) je několikanásobně nižší než u bakterií a biofilm je výrazně odolnější než planktonická forma (Scholtz a kol., 2015). Účinnost dekontaminace závisí též na produkovaných RONS, závislých na pracovním plynu, typu výboje, času působení, atd.



Obr. 8 – Schématický diagram plazmatem způsobeného poškození bakteriální buňky. (Misra a Jo, 2017)

4.2 Mikroorganismy významné z hlediska onkologických ran

Experimenty prezentované ve výsledkové části byly koncipovány za záměrem zvýšení kvality života pacientů podstupujících paliativní léčbu na onkologických odděleních. Jednou z komplikací kterou často trpí jsou nehojící se zvrhodovatělé rány. Pokud je rána mikrobiálně infikována, její hojení se tím dále komplikuje a zpomaluje. Navíc takové rány mohou být kontraindikací k onkologické léčbě, již z podstaty jejího fungování. Problém s nozokomiálními infekcemi byl zmíněn již výše a může být zdrojem infekce ran u pacientů výše popsaného typu. Dle definice jsou nozokomiální nákazy onemocněním exogenního (zvenčí), nebo endogenní (z vlastního těla) původu, která vznikají v příčinné souvislosti s hospitalizací pacientů v nemocničním zařízení. Jejich základním znakem je, že tyto nemocniční kmeny mikroorganismů mají vyšší rezistenci na antimikrobní léčiva a dezinfekce. Takovými typickými zástupci jsou například mikroorganismy patřící mezi antimikrobiálně rezistentní bakteriální patogeny ESCAPE – *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. Baumannii*, *P. aeruginosa* a *Enterobacter* (Pendleton a kol., 2013). Od jiných patogenů se liší jejich zvýšenou rezistencí na běžně používaná antibiotika jako je penicilin, vancomycin, carbapenemy, atd. Navíc jsou všechny tyto bakterie významné ve zdravotnictví. Následující popisy patogenů jsou přejaty z učebnice Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie od Bednář a kol. (1996).

Stafylokoky jsou gram-pozitivní bakterie běžně osidlující kůži a sliznice člověka, zároveň jsou nejčastějšími původci poúrazových a pooperačních infekcí, způsobují zánětlivý proces, hnisání rány a následnou rozsáhlou nekrózu a rozpadání rány. Vznik pyogenních („hnis způsobujících“) metastáz je v těchto případech častou komplikací. *S. aureus* produkuje celou řadu toxinů a patří mezi nejčastější původce patogenních infekcí a intoxikací u člověka. Způsobuje záněty, abscesy, sepse a kromě toho mají stafylokokové infekce sklon se opakovat, či přecházet do chronicity. Navíc cca čtvrtina jeho kmenů vylučuje exotoxin způsobující syndrom toxického šoku. Bývá součástí biofilmů. Hluboké infekce vyžadují chirurgický zákrok, či použití antibiotik. V současné době je zhruba 80 % kmenů rezistentních na penicilín. Multirezistentní kmeny *S. aureus* se rozšířily zejména v nemocnicích, důvodem je používání širokospektrálních antibiotik. *S. epidermidis* je patogenem napadajícím zejména pacienty s oslabenou imunitou (popáleniny, chirurgické zákroky). Zdroji přenosu infekce jsou hlavně předměty z umělých materiálů (ortopedie,

chirurgie, ORL a onkologie), což mohou být například katetry, výživové sondy, tracheostomické kanily, kloubní náhrady a podobně. Onemocnění způsobená tímto stafylokokem jsou často nozokomiální. (Bednář a kol.,1996)

Enterokoky jsou gram-pozitivní, anaerobní bakterie tvořící přirozenou mikroflóru střev, tím pádem jsou velmi odolné vůči vysokému pH (8,5) a teplotám, navíc vykazují vysokou rezistenci k antibiotikům (hlavně u nozokomiálních kmenů). Způsobují infekce močových a žlučových cest, gynekologické záněty, pooperační komplikace u operací dutiny břišní a podílí se na vzniku infekční endokarditidy (zánět endokardu). *E. faecium* postihuje opět především pacienty s oslabenou imunitou a hraje roli nejčastěji v infekcích spojených se zdravotní péčí. Rezistentní kmeny vykazují schopnost sdílet jejich odolnosti vůči léčivům pomocí horizontálního genového přenosu. Mohou být součástí biofilmu a rostou v různých prostředích včetně lékařského vybavení, například katetry. (Bednář a kol.,1996)

Zatímco předešlé bakterie byly koky (kulaté), *P. aeruginosa* je gram-negativní, aerobní, modrozeleně zbarvený bacil (tyčinka), klinicky nejvýznamnější z rodu pseudomonád. Je schopna přežít v extrémním prostředí, vyskytuje se především v odpadních vodách či půdě a osidluje zejména sliznice dýchacího a močového ústrojí. U zdravých jedinců může dojít ke kolonizaci, čímž se mohou stát důležitým šířitelem této nozokomiální nákazy. Produkuje proteolytické enzymy poškozující kapiláry, indukující vznik nekrotických a inhibující fagocytózu a cytotoxin, který porušuje membrány. Může způsobit infekce jakéhokoliv orgánu či systému těla, především však u osob těžce nemocných (nádorová onemocnění, diabetes, atd.), s oslabenou imunitou, v případě popálenin (zde je prognóza dosti špatná, úmrtnost je 60%), či v případě dlouhodobě zavedených cévek, kanyl, apod. Vyskytuje se často v nemocničním prostředí a kontaminuje katetry, dýchací přístroje apod. Existují též kmeny rezistentní na různá léčiva. (Bednář a kol.,1996)

E. coli je gram-negativní tyčinka tvořící normální součást mikroflóry tlustého střeva a není schopna dlouhodobě existovat mimo hostitele. Klinicky závažné infekce působí v případě narušení mikrobiální rovnováhy (průjmy, střevní onemocnění), patogenních kmenů produkujících toxiny nebo jejího zavlečení do močových cest či peritoneální dutiny. Obvykle nepatří mezi nozokomiální či nebezpečné typy bakterií, ale jsou známy i velice patogenní kmeny (například EHEC – enterohemoragická *E. coli*). Je vhodná pro *in vitro* experimenty díky své nenáročnosti při kultivaci a manipulaci. (Bednář a kol.,1996)

Nejčastějším kvasinkovým patogenem je *C. albicans*, která je běžnou součástí osídlení střev, sliznic a kůže člověka. Kvasinky jsou eukariotní organismy. Při přemnožení mohou vyvolávat infekční onemocnění – kandidózy, nejčastěji dutiny ústní, nosohltanu nebo pochvy a zevního genitálu a míst vlhké zapárky (pod prsy, v tříslech a pod kožními záhyby obézních pacientů). K tomu však dojde pouze při narušení stabilních podmínek (změna pH, porušení kožního krytu, atd.) nebo v případě systémového onemocnění (cukrovka, nádorová onemocnění, atd.) či oslabení organismu (gravidita, oslabená imunita, léčba antibiotiky, atd.). (Bednář a kol.,1996)

Jak bylo popsáno výše, některé ze zmíněných bakterií jsou schopny tvořit biofilm, který funguje jako mechanický a biochemický štít a velmi efektivně chrání bakterie před antibiotiky a jinou léčbou. Při přilnutí bakterie k povrchu vznikají podmínky pro spuštění tvorby biofilmu, tvoří se extracelulární polymery a další buňky vznikají již v extracelulární polysacharidové hmotě, jejich dělením vznikají mikrokolonie obalené slizem a ty se dále diferencují v biofilm. Mohou zde být přítomny i vyšší organismy, například kvasinky, v těle to bývá výše zmíněná *C. albicans*. Z biofilmu se mohou uvolňovat planktonické buňky a osidlovat vzdálenější místa. Prostřednictvím biofilmu též dochází ke vzájemné komunikaci bakterií, především výměnou genetické informace z plazmidů, tím mohou získávat například rezistenci vůči antibiotikům. Dále také existují mechanismy s jejichž pomocí bakterie vnímá přítomnost jiných bakterií v biofilmu a dochází tím k regulaci a udržování optimální hustoty populace v kolonii. Tloušťka biofilmu může být jednotky až stovky mikrometrů a často se tvoří například na kanilách, implantátech či katetrech. Jeho vytvoření značně komplikuje léčbu. (Schindler, 2010)

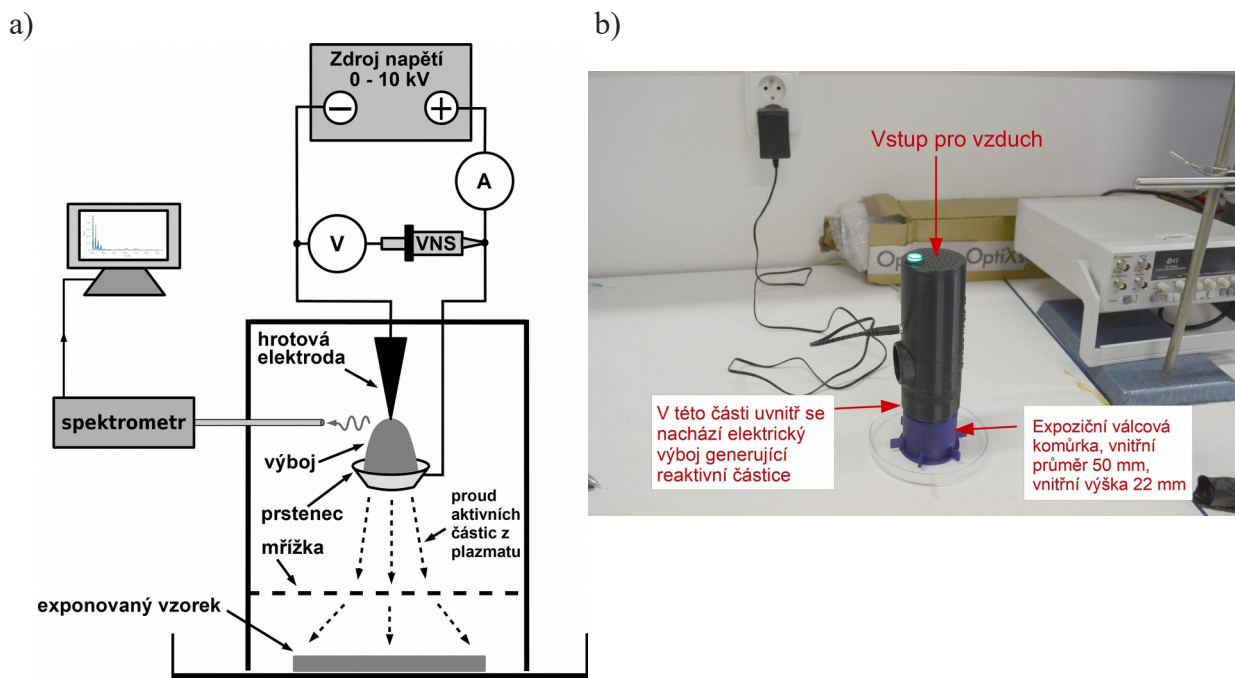
5. Praktická část

V následující části jsou popsány detaily provedení a výsledků experimentů uskutečněných v rámci této práce. Byly uskutečněny dva *in vitro* experimenty, kdy první z nich zkoumal efekt působení netermálního atmosferického plazmatu na lékařský obvazový materiál a jeho baktericidní účinky. Ze získaných výsledků byly následně vyvozeny postupy pro další výzkum. Druhý, rozsáhlejší experiment se věnoval synergickému cidnímu efektu antibakteriálních obvazů a CAP na sedm různých mikroorganismů.

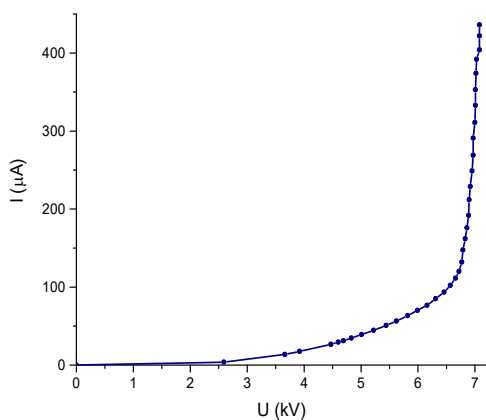
5.1 Parametry zdroje CAP

Jako zdroj nízkoteplotního plazmatu pro uskutečněné experimenty byla použita aparatura se záporným korónovým výbojem generovaným mezi hrotovou a prstencovou elektrodou, viz. obr. 9. Aparatura se skládá ze zdroje stejnosměrného vysokého napětí, elektrodového systému hrot-prsteneček, rozptylové mřížky a plastového pouzdra (obr 9 a)). Jako hrotová elektroda slouží lékařská jehla Medoject (0,6×25) mm, připojená k záporné svorce zdroje vysokého napětí. Prstencová elektroda, připojená ke kladné svorce, má průměr 12 mm a je zhotovena z mosazi. Vzdálenost mezi elektrodami je 3,5 mm. Při běžném použití v průběhu experimentu je na elektrody systému přiloženo napětí $U = 6,8$ kV a proud protékající mezi elektrodami záporného korónového výboje dosahuje hodnoty $I = 150$ μ A. Pro napájení elektrodového systému byl použit zdroj stejnosměrného vysokého napětí UTES (maximální napětí a proud 10 kV, 500 μ A). Proud aktivních částic vystupující z plazmatu výboje byl rozptýlen do větší plochy pomocí mřížky z nerezové oceli. Takto rozptýlené částice poté dopadaly na ošetřovaný vzorek. Z obrázku 9 b) víme, že vnitřní průměr válcové expoziční komůrky je 50 mm, ošetřovaná plocha je tedy 1963,5 mm².

Pro měření voltampérové (VA) charakteristiky výše popsaného zdroje CAP znázorněné na grafu v obrázku 10 byly použity digitální multimetry Metex M-3800, jeden přepnutý do režimu voltmetru pro měření stejnosměrného napětí a druhý přepnutý do režimu ampérmetru pro měření stejnosměrného proudu. Voltmetr byl do obvodu připojený přes vysokonapěťovou sondu (VNS, typ TT-HVP 40, maximální stejnosměrné napětí 40 kV), která slouží jako dělič napětí 1:1000.

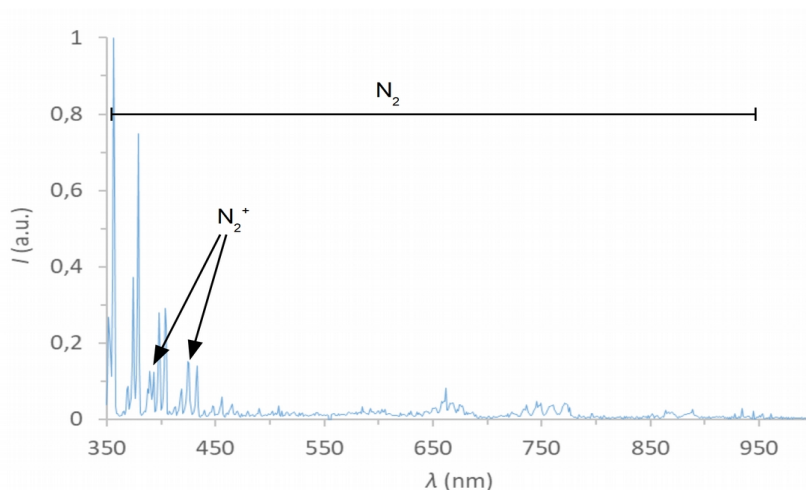


Obr. 9 – (a) Schéma a (b) fotografie zdroje nízkoteplotního plazmatu za atmosferického tlaku, použitého k realizaci experimentů prezentovaných v praktické části práce.



Obr. 10 – VA charakteristika zdroje nízkoteplotního plazmatu za atmosferického tlaku, použitého k realizaci experimentů prezentovaných v praktické části práce.

Pro měření emisního spektra (obr. 11) záporného korónového výboje v konfiguraci elektrod hrot-prsteneč byl použitý spektrometr Ocean Optics USB-650 RED TIDE (350 – 1000 nm). Emisní spektrum bylo snímáno z aktivní oblasti záporného korónového výboje, tj. z oblasti v bezprostřední blízkosti hrotové elektrody.



Obr. 11 – Emisní spektrum zdroje nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku, použitého k realizaci experimentů prezentovaných v praktické části práce.

5.2 Metodické postupy

V experimentech byly použity čtyři typy obvazů používaných v onkologii: Mepilex, GranuFlex, Inadine a Ialugen (popisy obvazů jsou přejaty z jejich příbalové informace).

- Mepilex je poddajné pěnové krytí pro širokou škálu akutních i chronických ran, efektivně absorbuje exudát (sekrece z rány) a udržuje v ráně vlhké prostředí.
- Tenké krytí GranuFlex je tvořeno vnitřní vrstvou hydrofilních koloidních částic obsažených v adhezivní polymerové matrix (tato část přichází do kontaktu s kůží) a vnější vrstvou z polyuretanového filmu. Vytváří vlhké prostředí napomáhající hojení, absorbuje exudát z rány a napomáhá rozkládání neživé tkáně. Vhodný na chronické (například kožní ulcerace) i akutní rány (například pooperační rány).
- Inadine je nepřilnavá mřížka impregnovaná antiseptickou látkou – povidone-iodem. Slouží k ošetření akutního povrchového poranění jako prevence infekce nebo pokud již k infekci došlo, při popáleninách, traumatických ranách a k ošetření ulcerujících ran.
- Ialugen je impregnovaný obvaz s obsahem léčivých látek sulfadiazinu stříbrného (protibakteriální, účinný proti většině bakterií a některým plísním) a kyseliny hyaluronové (snižuje zánět a urychluje hojení kožních ran). Lze jej použít pro povrchová ošetření hnisavých i nehnisavých ran, odřenin a menších popálenin, bércových vředů či proleženin.

První uskutečněný experiment byl spíše testovací a proveden pro všechny čtyři obvazy a pouze pro gram-negativního zástupce (*E. coli*) a gram-pozitivního zástupce (*S. epidermidis*) bakterií, aby podle jeho výsledků mohl být stanoven další postup výzkumu. Na Petriho misky (průměr 9 cm) s Mueller-Hinton (MH) agarem bylo naočkováno 0,5 ml suspence bakterií s koncentrací 10^5 CFU/ml (colony forming unit) a byly v řádech minut ponechány, aby zaschly. Poté byly rozděleny do pěti skupin, ošetřovány několika různými způsoby a následně přes noc kultivovány v inkubátoru při teplotě cca 36 °C. Následující den byly vyhodnoceny výsledky a pořízeny prezentované fotografie kultur.

Postupy ošetření misek s naočkovanými bakteriálními kulturami byly následující:

1. Na misku byl přiložen suchý čtvereček (cca 1 cm²) sterilního obvazu stranou, kterou se běžně přikládá na kůži pacienta.
2. Suchý čtvereček sterilního obvazu byl ošetřen plazmatem po dobu 15 minut ze strany, kterou se přikládá na kůži a následně přiložen aktivní stranou na misku.
3. Na čtvereček sterilního obvazu byla nanесena kapka sterilní vody předem ošetřené plazmatem po dobu 15 minut ze strany, kterou se přikládá na kůži a následně byl přiložen aktivní stranou na misku.
4. Suchý čtvereček sterilního obvazu byl ošetřen plazmatem po dobu 15 minut ze strany, kterou se přikládá na kůži a poté na něj byla nanесena kapka sterilní vody předem ošetřené plazmatem po dobu 15 minut a následně byl přiložen aktivní stranou na misku.
5. Na čtvereček sterilního obvazu byla nanесena kapka sterilní vody ze strany, kterou se přikládá na kůži a poté byl ošetřován plazmatem po dobu 15 minut a následně přiložen aktivní stranou na misku.

V případě prvních dvou obvazů Mepilex a Granuflex, které neobsahují antibakteriální složku a nedošlo u nich k vytvoření inhibiční zóny kolem obvazu, byly ještě pořízeny kontrolní obtisky obvazů na Petriho misku s čistým MH agarem. Z nich byla sledována kontaminace přímo pod obvazem. Pět čtverečků každého obvazu, odpovídajících různému postupu ošetření, bylo položeno na agar, ponecháno 1 minutu a odstraněno. Takto pořízené obtisky a misky s odstraněnými obvazy (s již narostlými kulturami) byly opět kultivovány

přes noc v inkubátoru při teplotě zhruba 36 °C a následující den byly vyhodnoceny výsledky a pořízeny fotografie kultur.

V dalším experimentu byl zkoumán synergický cidní efekt antibakteriálních ob vazů a plazmatu. Byl studován *in vitro* na sedmi různých mikroorganismech: gram-negativní *E. coli*, gram-pozitivní *S. aureus*, gram-pozitivní *S. epidermidis*, gram-negativní *P. aeruginosa*, gram-pozitivní *E. faecium*, gram-pozitivní *E. faecalis* a kvasince *C. albicans*. Důvodem tohoto výběru je význam použitých mikroorganismů z hlediska onkologických ran a zdravotní péče v onkologii, což je detailněji popsáno v teoretické části. Na Petriho misky (průměr 9 cm) s Mueller-Hinton (MH, pro bakterie) nebo Sabouraud (S, pro kvasinku) agarem bylo naočkováno 0,5 ml suspence bakterií či kvasinek s koncentrací 10^5 CFU/ml (colony forming unit) a před vystavením plazmatu byly chvíli ponechány aby uschly. Poté byly u každého mikroorganismu rozděleny do čtyř skupin po třech miskách, na jednu ze tří misek byl umístěn čtvereček (cca 1 cm²) sterilního antibakteriálního ob vazů Ialugen, na další Inadine a třetí byla kontrolní. Následně byly ošetřovány netermálním atmosferickým plazmatem 1, 2, nebo 4 minuty, čtvrtá trojice byla opět kontrolní. Zdroj plazmatu byl přiložen expoziční válcovou komůrkou na kultivační medium na misce, ošetřovaná část tedy měla plochu 1963,5 mm². Po kultivaci přes noc v inkubátoru při teplotě cca 36° byly vyhodnoceny výsledky a pořízeny prezentované fotografie kultur. U některých mikroorganismů byla tato doba příliš krátká pro pozorování předpokládaného cidního efektu, experiment byl tedy v jejich případě doplněn ještě o ošetření 8 a 16 minut.

Následná analýza fotografií byla komplikovaně kvantifikovatelná, jelikož pro každý mikroorganismus byla situace trochu jiná. Výsledkem analýzy jsou napočítané plochy inhibičních zón (s malým výskytem bakterií), které byly určeny z fotografií na milimetrovém papíru. V případech, kdy se vyskytovaly pouze zóny se sníženým výskytem bakterií je jejich hustota uvedena jako počet CFU na cm² a byla určena jako aritmetický průměr počtu kolonií ze sedmi různých menších čtverců na milimetrovém papíru (25 mm²) vynásobena čtyřmi.

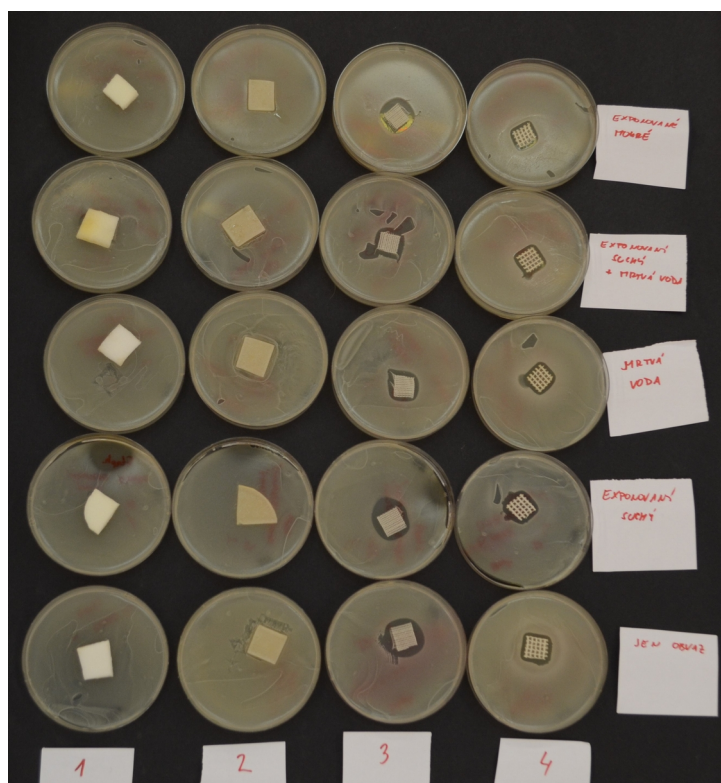
5.3 Výsledky a diskuze

Hlavním účelem prvního experimentu bylo sledovat, zda dojde k „aktivaci“ obvazu působením plazmatu a bude vykazovat baktericidní účinky. Toto je myšlenka, která byla již úspěšně zkoumána několika různými skupinami (Eswaramoorthy and McKenzie, 2017) a byla by velmi dobře využitelná při ošetřování infikovaných ran. Díky působení plazmatu dochází k několika různým dějům, jednak k leptání povrchu obvazu, kdy lze upravovat jeho drsnost, potažmo povrchovou energii obvazu, tedy jeho smáčivost (hydrofilní vs. hydrofobní). Druhým efektem může být tvorba funkčních chemických skupin (v závislosti na pracovním plynu zdroje CAP, atd.) na povrchu obvazu, které mohou mít vliv na bakterie či lidské buňky.

Tento efekt bohužel nebyl v našem případě pozorovatelný, na fotkách kultur *E. coli* (obr. 12) i *S. epidermidis* (obr. 13) vidíme po kultivaci u prvních dvou obvazů Mepilex (1) a Granuflex (2) kontinuální pokrytí povrchu agaru bakteriemi. Nicméně byl velmi dobře patrný baktericidní efekt dvou impregnovaných obvazů Inadine (3) a Ialugen (4), který je pozorovatelný i u kontrolní skupiny, kde byl použit pouze samotný obvaz bez dalšího ošetření, nesouvisí tedy s aplikací CAP. Tím pádem nám tyto obvazy mohou sloužit jako nezávislá reference při posuzování účinnosti úpravy obvazových materiálů. Zajímavé však je si všimnout, že pro zástupce gram-negativních bakterií (*E. coli*) vykazuje lepší baktericidní účinek obvaz 4 – Inadine, obsahující sulfadiazin stříbrný jako aktivní látku, viz. obr. 12 kde vidíme větší inhibiční zónu bez kolem obvazů na miskách v posledním řádku. Zatímco pro zástupce gram-positivních bakterií (*S. epidermidis*) je patrný lepší účinek pro obvaz 3 – Ialugen, obsahující povidone-iod a viz. obr. 13 vidíme větší inhibiční zónu bez bakterií kolem obvazů na miskách ve třetím sloupci.



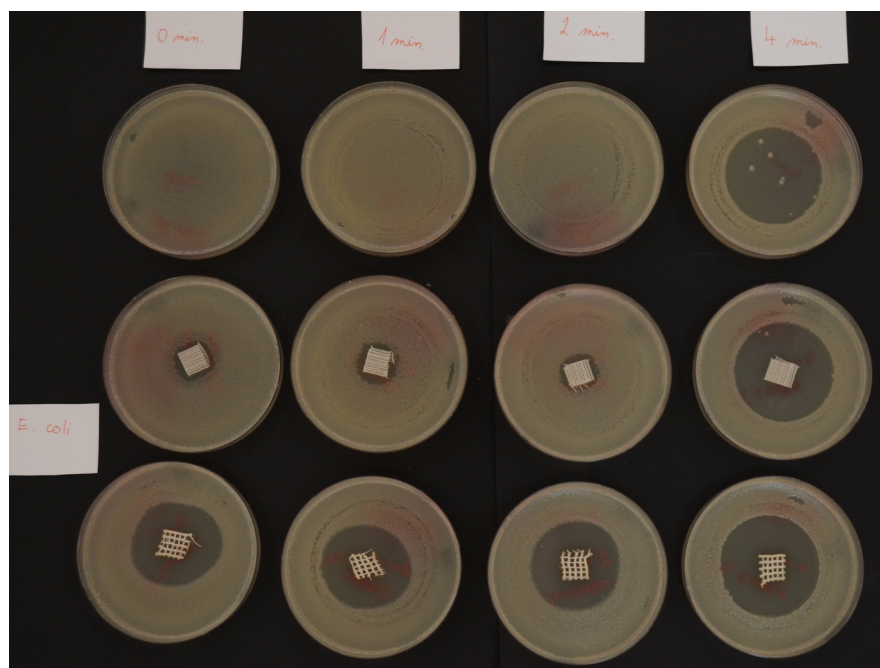
Obr. 12 – *E. coli*. Čísła určujú typ obvazu 1=Mepilex, 2=Granuflex, 3=Inadine, 4=Ialugen. První sloupec zleva je jen přiložený obvaz (postup 1), druhý je obvaz ošetřený plazmatem suchý (postup 2), třetí je obvaz s kapkou plazmatem ošetřené vody (postup 3), čtvrtý je obvaz ošetřený plazmatem suchý s kapkou plazmatem ošetřené vody (postup 4) a pátý sloupec je obvaz s kapkou vody ošetřený plazmatem (postup 5).



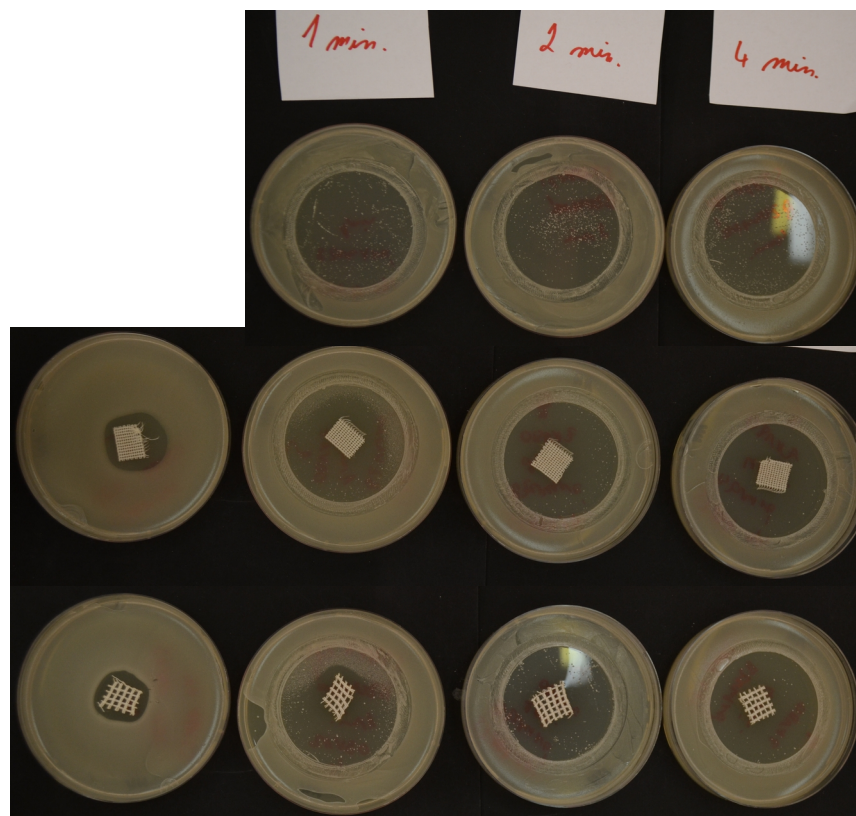
Obr. 13 – *S. epidermidis*. Čísła určujú typ obvazu viz. obr. 12 výše. První řada ošetřena postupem 5, druhá postupem 4, třetí postupem 3, čtvrtá postupem 2 a pátá postupem 1, viz. rozepsáno výše u obr. 12.

Po provedení zkušebních měření na *E. coli* a *S. epidermidis* byly nastaveny parametry druhého experimentu jak je popsáno výše v metodické části. Výsledky byly pro různé mikroorganismy dosti odlišné, většinou přibližně kruhové inhibiční zóny byly v některých případech ohraničeny ostře, jinde byly obklopeny řidší oblastí a přechod byl pozvolný, někdy se v jinak úplně čistých inhibičních zónách vyskytovalo pár náhodně rozmístěných kolonií, jinde nikoliv. V případě pseudomonády a candidy bylo nutné přidat ještě delší časy ošetřování plazmatem – 8 a 16 minut. V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky analýzy fotografií kultur na milimetrovém papíru. Je zde vždy uvedena plocha inhibiční zóny kolem obvazu v mm² a případně informace o množství kolonií v této zóně, o hustotě kolonií v řidší oblasti, apod. Jako inhibiční zóna je zde označován prostor s počtem kolonií maximálně 500 CFU.

V případě *E. coli* vidíme na obrázku 14 občasný výskyt kolonií v jinak poměrně ostře ohraničené téměř čisté inhibiční zóně, což je méně časté v případě aplikace antibakteriálních obvazů. Zároveň lze pozorovat zvětšování inhibiční zóny s prodlužováním doby ošetření plazmatem. Nejlepší baktericidní účinek je vidět v případě použití obvazu 4 – Ialugen (stříbro) v kombinaci s ošetřováním plazmatem po dobu 4 minut, zóna je zde rozlohou největší a nevyskytují se v ní žádné kolonie.



Obr. 14 – *E. coli*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, nebo 4 minuty, dle popisků.



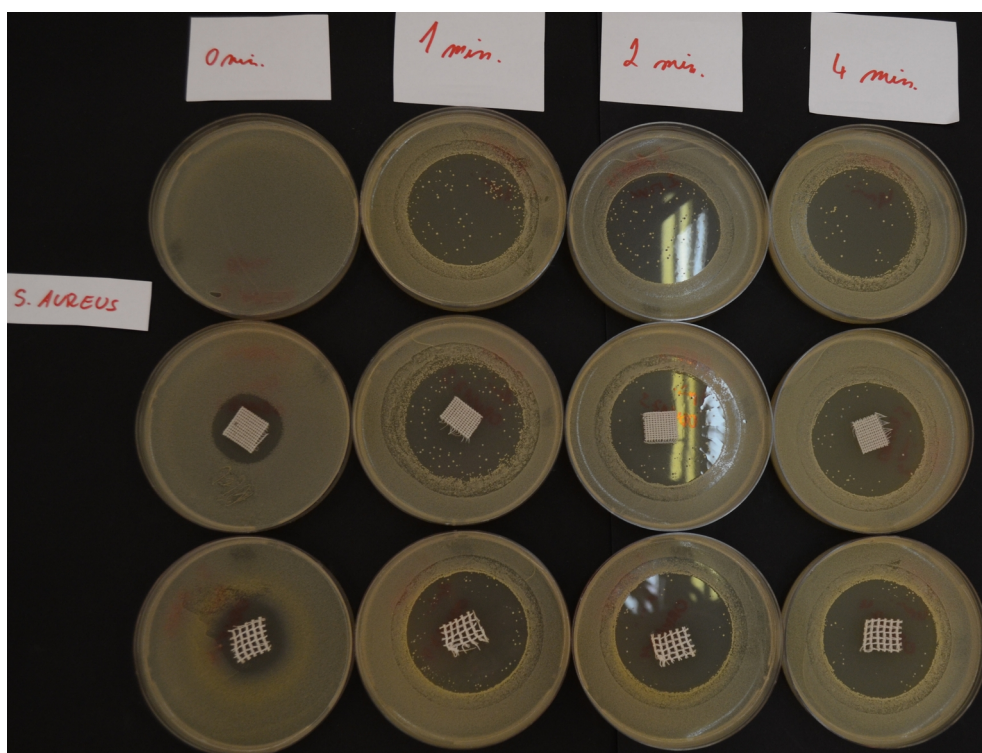
Obr. 15 – *S. epidermidis*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, nebo 4 minuty, dle popisků.

U *S. epidermidis* jsou pozorovatelné poměrně výrazné inhibiční zóny s řidšími oblastmi okolo a hojným množstvím kolonií většinou u kraje zóny. Na obrázku 15 můžeme pozorovat růst inhibiční zóny při prodlužování doby aplikace plazmatu, zároveň při použití antibakteriálních obvazů se v zóně vyskytuje méně kolonií. Nejlepší baktericidní účinek vykazoval obvaz 3 – Inadine (iod) v kombinaci s ošetřováním plazmatem po dobu 4 minuty, zóna je zde rozlohou největší a vyskytuje se v ní nejmenší množství kolonií (50 CFU).

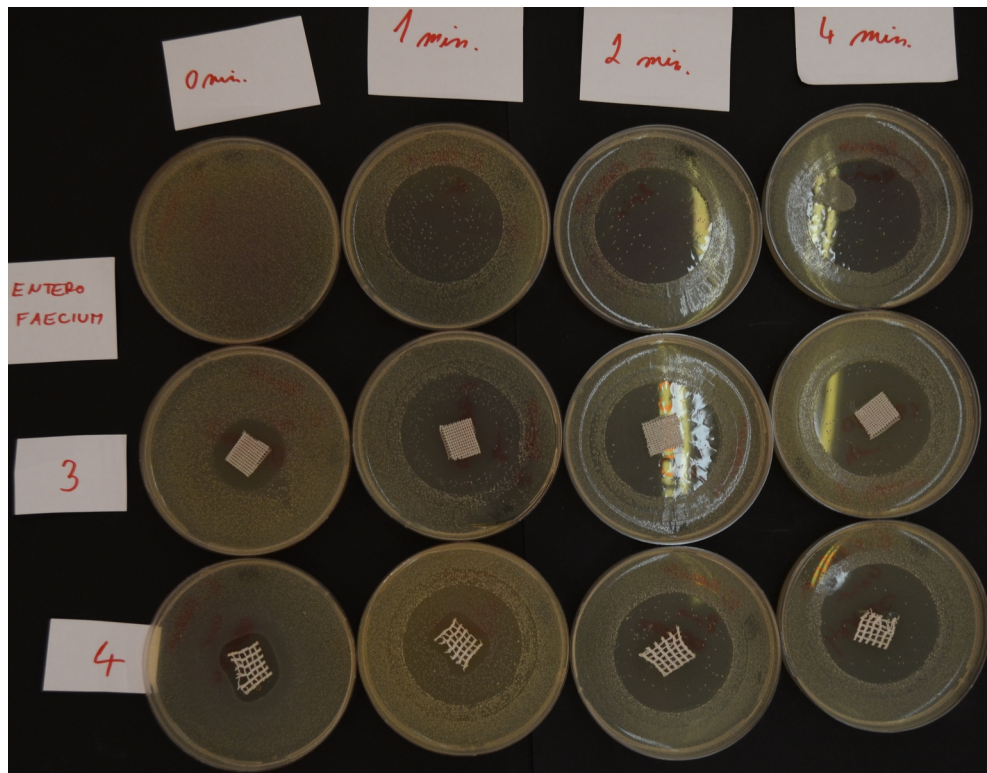
Na obrázku 16 jsou fotografie kultur *S. aureus*. Opět jsou zde pozorovatelné poměrně velké a téměř čisté inhibiční zóny, většinou ostře ohraničené s řídkou kontaminací na jejich okraji. Pro obvaz 4 bez použití plazmatu je inhibiční zóna obklopena oblastí nižší hustoty kolonií, po které následuje pruh naopak s vyšší hustotou kolonií. Výrazný nárůst velikosti inhibiční zóny je viditelný již po minutové aplikaci plazmatu, pro delší časy klesá počet kolonií uvnitř a objevuje se její ostřejší ohraničení. Diskutabilní je porovnání efektů

obvazů 3 a 4, kdy nelze s jistotou určit, který z nich vykazuje lepší baktericidní účinky, jelikož velikosti inhibičních zón i míra kontaminace uvnitř jsou podobné. Pro obvaz 4 – Ialugen (stříbro) se výrazné snížení počtu kolonií uvnitř inhibiční zóny dostavilo již po dvouminutovém ošetření plazmatem (počet CFU je poloviční než pro obvaz 3) a zóna úplně bez výskytu bakterií je trochu větší, kontaminace se vyskytuje jen na samém okraji.

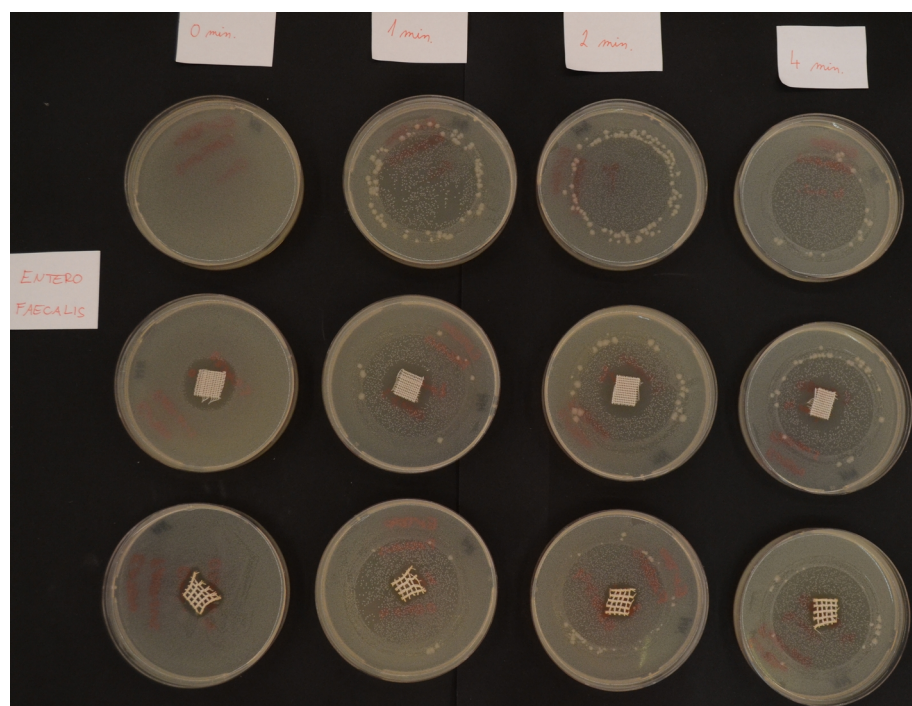
Pro *E. faecium* (obr. 17) vidíme, že výrazné inhibiční zóny se objevují již po minutě působení plazmatu a kontaminace uvnitř klesá s rostoucí dobou ošetření plazmatem. Též je možné pozorovat inhibiční zóny kolem obvazu v obou případech, pro obvaz 3 – Inadine (iod) je však baktericidní vliv výraznější. Při kombinované aplikaci obvazu i plazmatu dochází ke zvětšení zóny úplně bez kontaminace a nejsilnější účinek je pozorovatelný pro obvaz 3 s ošetřením plazmatem po dobu 4 minuty. V případě misky bez obvazu s čtyřminutovou aplikací plazmatu zřejmě došlo k systematické chybě a uvnitř inhibiční zóny se vyskytuje menší plocha s kontinuálním pokryvem bakteriemi. Zřejmě došlo ke špatné manipulaci s miskou a vylití suspenze z okolí do ošetřené zóny. I přes tuto chybu je však cidní efekt obvazů i plazmatu jasně znatelný.



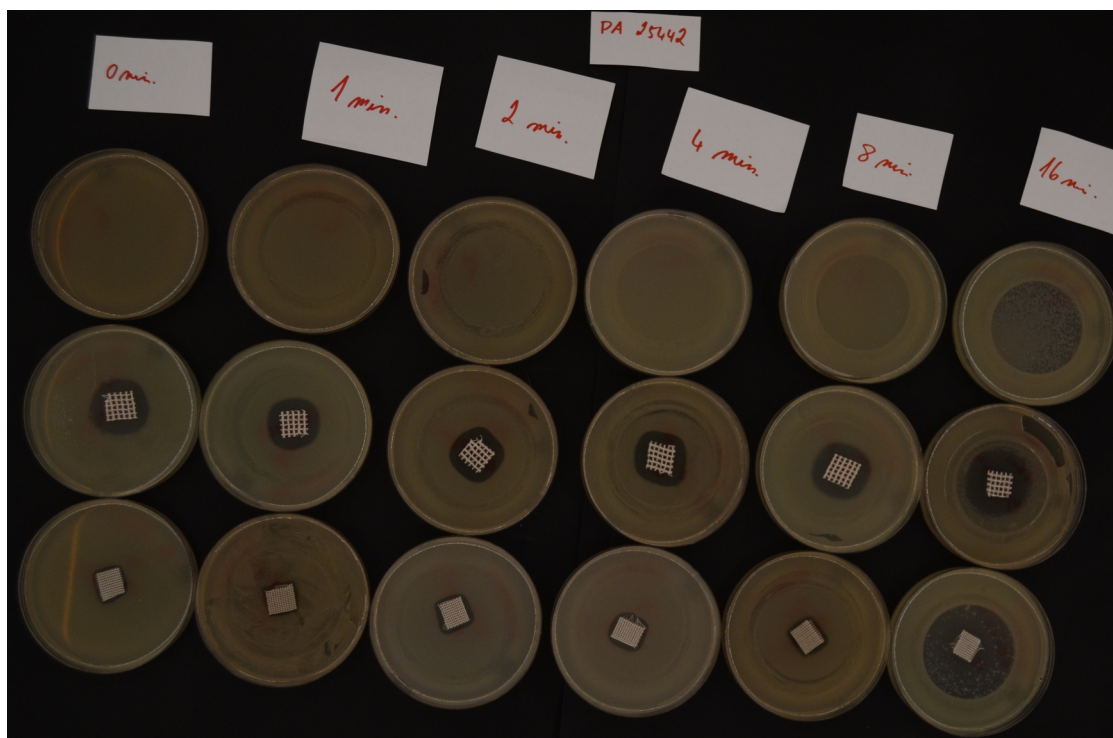
Obr. 16 – *S. aureus*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, nebo 4 minuty, dle popisek.



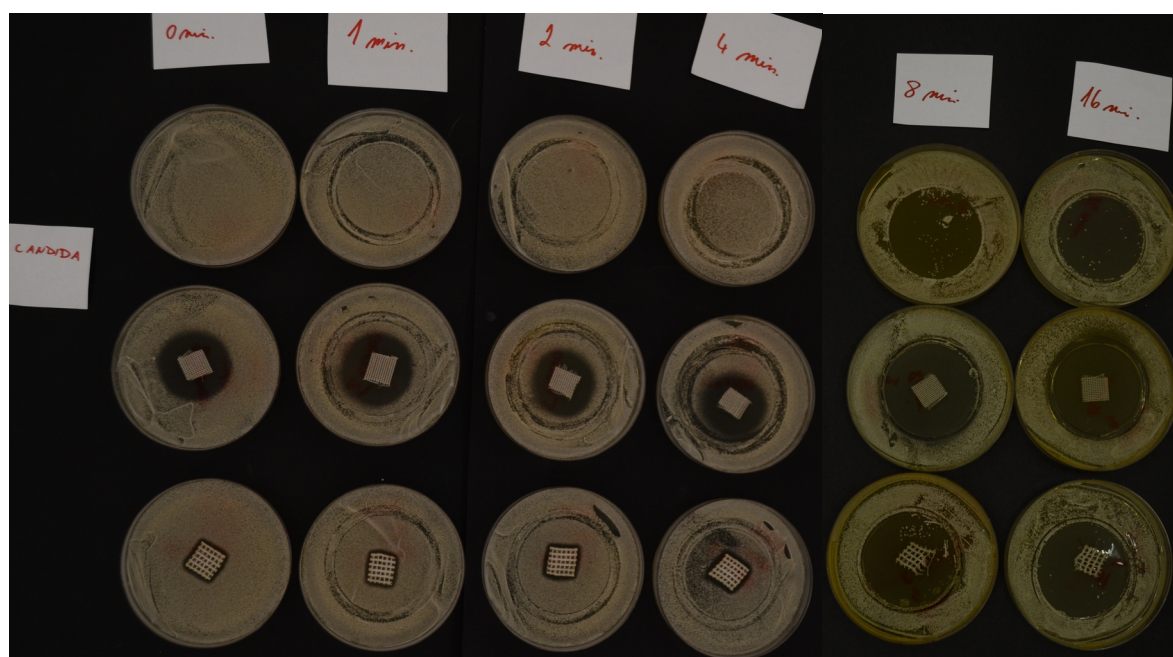
Obr. 17 – *E. faecium*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, nebo 4 minuty, dle popisek.



Obr. 18 – *E. faecalis*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, nebo 4 minuty, dle popisek.



Obr. 19 – *P. aeruginosa* (PA 25442). První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, 4, 8, nebo 16 minut, dle popisků.



Obr. 20 – *C. albicans*. První řada je kontrolní, v druhé jsou misky s obvazem 3 (Inadine) a ve třetí misky s obvazem 4 (Ialugen). Sloupce jsou podle doby ošetření plazmatem, 0, 1, 2, 4, 8, nebo 16 minut, dle popisků (8 a 16 minut ošetření bylo doměřeno později).

V případě *E. faecalis* vidíme na fotografii (obr. 18) kontaminaci jinou bakterií (nejspíše *E. coli*) způsobenou zřejmě nedostatečnou dezinfekcí hrany expoziční komůrky zdroje plazmatu (vzhledem k umístění). To však získané výsledky nijak nezkreslilo, jelikož jde o úplný okraj ošetřované oblasti. Čistá inhibiční zóna je na první pohled výrazně větší pro obvaz 3 – Inadine (iod) a též je zde nejřidší osídlení kolonií okolo ní, viditelné prořídnutí kolonií však pozorujeme již od jedné minuty aplikace plazmatu. Nejsilnější synergický efekt dostáváme tedy pro ošetření plazmatem po dobu 4 minuty v kombinaci s obvazem 3.

Pro *P. aeruginosu* byly naměřeny i delší časy expozice, jelikož výrazný efekt se dostavil až po šestnácti minutové aplikaci plazmatu, nicméně řádové prořídnutí je pozorovatelné již pro 8 minut. Na obrázku 19 jsou řady s obvazy přesně v opačném pořadí než pro ostatní kultury, největší čisté inhibiční zóny jsou vidět v druhé řádce misek, tedy pro obvaz 4 – Ialugen (stříbro). Nejvýraznější baktericidní efekt je zde těžko kvantifikovatelný, jelikož rozloha úplně čisté inhibiční zóny je největší pro aplikaci obvazu 4 a plazmatu po dobu 16 minut, nicméně pro obvaz 3 a ošetřování plazmatem po dobu 16 minut se však vyskytuje kontaminace v řádu pouze stovek kolonií na celé ploše ošetřované oblasti.

C. albicans (obr. 20) je jediný testovaný mikroorganismus s eukariotní buňkou. Byly zde nejprve naměřeny časy ošetření od jedné do čtyř minut, ale jelikož byl pozorovaný efekt malý, byly doměřeny i delší časy (8 a 16 minut), proto se fotografie od sebe typově liší. S dobou expozice hustota kolonií evidentně řídne, 4 minuty však byly příliš krátkou dobou k pozorování výraznějšího efektu, pro delší časy se inhibiční zóny zvětšily a v případě obvazu 3 jsou dokonce úplně bez kontaminace. Vliv antibakteriálního obvazu 3 – Inadine (iod) je velmi významný, plochy čistých inhibičních zón jsou výrazně větší, nejen v porovnání s druhým typem obvazu, ale i při porovnání s ostatními testovanými mikroorganismy.

[mm ²]		0 min	1 min	2 min	4 min
<i>E. coli</i>		0	0	0	1906 (7 kolonií)
	3	313	321	302	1964 (2 kolonie)
	4	1346	1399	1503	1902
<i>S. epidermidis</i>		0	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 30 CFU na cm ²)	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 32 CFU na cm ²)	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 35 CFU na cm ²)
	3	511	1473 (cca 150 kolonií, 1963,5 řádově řidší zóna)	1964 (cca 180 kolonií)	1964 (cca 50 kolonií)
	4	377	1420 (cca 100 kolonií, 1963,5 řádově řidší zóna)	1964 (cca 210 kolonií)	1964 (cca 60 kolonií)
<i>S. aureus</i>		0	1765 (cca 140 kolonií)	1964 (cca 60 kolonií)	1964 (41 kolonií)
	3	602	1964 (cca 100 kolonií)	1964 (cca 60 kolonií)	1964 (35 kolonií)
	4	586 (okolo pruh řidší a hustší zóny, kontaminace uvnitř obvazu)	1964 (cca 120 kolonií, kontaminace uvnitř obvazu)	1964 (33 kolonií, kontaminace uvnitř obvazu)	1964 (41 kolonií, kontaminace uvnitř obvazu)
<i>E. faecium</i>		0	1964 (cca 400 kolonií)	1964 (cca 50 kolonií)	1964 (cca 50 kolonií, plocha cca 196 mm ² kontinuální pokrytí)
	3	637	1964 (cca 500 kolonií)	1964 (cca 65 kolonií)	1964 (cca 55 kolonií)
	4	481 (okolo řidší zóna, kontaminace uvnitř obvazu)	421 (1964 řidší zóna, hustota cca 25 CFU na cm ² , kontaminace uvnitř obvazu)	1964 (cca 100 kolonií, kontaminace uvnitř obvazu)	1964 (26 kolonií, kontaminace uvnitř obvazu)
<i>E. faecalis</i>		0	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	0 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)
	3	561	493 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	594 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	546 (1964 řidší zóna, hustota cca 73 CFU na cm ²)
	4	274	296 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	302 (1964 řidší zóna, hustota cca 100 CFU na cm ²)	312 (1964 řidší zóna, hustota cca 80 CFU na cm ²)
<i>P. aeruginosa</i> 25442		0	0	0	0 (1964 trochu řidší zóna)
	3	260	259	305	311
	4	621	533	541	605
		8 min	16 min		
		0 (1964 trochu řidší zóna)	0 (1964 řádově řidší zóna)		
	3	295	1964 (cca 300 kolonií)		
	4	611	872 (1964 řádově řidší zóna)		
<i>C. albicas</i>		0	0	0	0 (uprostřed trochu řidší zóna)
	3	1006	1142	907	971
	4	306 (kontaminace uvnitř obvazu)	288 (kontaminace uvnitř obvazu)	326 (kontaminace uvnitř obvazu)	369 (1964 řádově řidší zóna, kontaminace uvnitř obvazu)
		8 min	16 min		
		1964 (cca 250 kolonií)	1964 (cca 40 kolonií)		
	3	1964 (cca 30 kolonií)	1964		
	4	1964 (cca 250 kolonií, kontamina uvnitř obvazu)	1964 (cca 100 kolonií hlavně po obvodu zóny, kontaminace uvnitř obvazu)		

Tab. 1 – Souhrnná tabulka uvádějící plochu inhibiční zóny (mm²) pro všechny testované mikroorganismy s případnými důležitými poznámkami. Vnitřní plocha válcové expoziční komůrky zdroje plazmatu a tedy i plocha ošetřované části misky je po zaokrouhlení 1964 mm². Kolonky s čísly po levé straně tabulky označují typ použitého obvazu: prázdná znamená bez obvazu, 3 – Inadine (I), 4 – Ialugen (Ag).

Je nutné poznamenat, že velikost čisté inhibiční zóny vytvořené v okolí obvazu je samozřejmě závislá na jeho velikosti. Vzhledem ke sterilní manipulaci by bylo dosti náročné přesněji měřit jednotlivé čtverečky, proto došlo k tomu, že nebyly všechny přesně stejně velké. Tato skutečnost samozřejmě ovlivňuje naměřené plochy inhibičních zón. V tabulce 1 je možné toto zpozorovat například v případě *C. albicans*, kdy jsou v druhém řádku (obvaz 3) první dva kousky obvazu i okem viditelně větší (obr. 20) a tudíž i pro ně naměřené inhibiční zóny, naopak ve třetím řádku (obvaz 4) je druhý čtvereček o trošku menší než ostatní a opět se to projevuje na uvedené velikosti inhibiční zóny. Toto měření je tedy zatíženo relativně velkou chybou způsobenou lidským faktorem a přesnost měření ploch inhibičních zón je poměrně špatná, odhadem $\pm 25 \text{ mm}^2$. I v rámci této chyby je však pozorovatelný synergický efekt působení plazmatu a antibakteriálních obvazů, v některých případech velmi výrazný.

Další zajímavou věcí je kontaminace uvnitř oček obvazu 4, která byla v několika případech pozorována, dobře viditelná je například pro *C. albicans* na obrázku 20. Obvaz 3 nic podobného nevykazuje. Tato skutečnost vede k domněnce, že zde může existovat souvislost s velikostí oček obvazů, která se dosti liší. Pro mechanismus tohoto efektu však zatím nemáme uspokojivé vysvětlení. Na obrázku 20 jsou též výrazněji viditelné otisky po expoziční komůrce zdroje. To je dáno tím, že se její okraj mnohem více propadal do živného média, které bylo jiné než v případě bakterií. Viskozita saburodového agaru je jiná než u MH agaru.

6. Závěr

V předkládané práci jsou v rámci teoretického úvodu shrnuty nejdůležitější poznatky ohledně medicínského využití aplikace nízkoteplotního atmosferického plazmatu nebo jím aktivovaných roztoků a též zde jsou popsány základní typy zdrojů plazmatu používaných pro výzkum v této oblasti. Dále jsou rozebrány dva různé experimenty, které byly provedeny a jsou uvedeny, zhodnoceny a diskutovány jejich výsledky.

Výstupem uskutečněných experimentálních měření je potvrzení existence synergického cidního efektu při společném působení antibakteriálních obvazů (Inadine a Ialugen) a nízkoteplotního plazmatu na kultury sedmi vybraných mikroorganismů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1 a je možno je vidět na obrázcích 14 až 20. Efekt byl pozorovatelný v různé intenzitě, velmi dobře je vidět v případě *E. coli* (obr. 14), obou streptokoků (obr. 15 a 16), *E. faecium* (obr. 17) a u pseudomonády (obr. 19) i candidy (obr. 20), kdy velikosti inhibičních zón rostou s prodlužováním doby aplikace plazmatu a zároveň řídne, případně úplně mizí kontaminace uvnitř a/nebo v okolí této zóny při současném použití impregnovaných obvazů. Pro *E. faecalis* (obr. 18) není závěr úplně jednoznačný, nicméně efekt prořídnutí kolonií po ošetření plazmatem je pozorovatelný i přesto, že se plynule nesnižuje s délkou doby ošetření. Ve všech případech je dobře pozorovatelný vliv rozdílných aktivních složek v impregnovaných obvazech, obvykle jeden z nich vykazuje evidentně silnější cidní efekt pro konkrétní mikroorganismus. Pouze malý rozdíl vykazují jen kultury *S. aureus* (obr. 16), naopak velmi výrazný rozdíl a silný cidní efekt jednoho z obvazů jsou znatelné pro zástupce kvasinek (obr. 20) a pro *E. coli* (obr. 14). Aktivace povrchu obvazů pomocí nízkoteplotního plazmatu bohužel nebyla potvrzena, přestože z výše uvedené literatury byl vytvořen předpoklad, že by tento efekt mohl být pozorovatelný.

Výsledky prezentovaných *in vitro* experimentů potvrzují účinnost použitého zdroje nízkoteplotního atmosferického plazmatu při dekontaminaci vybraných klinicky významných mikroorganismů a zesílení jeho efektu pomocí aplikace antibakteriálních obvazů Inadine a Ialugen. Této skutečnosti by bylo možné využít při ošetřování chronických ran například u onkologických pacientů.

Seznam použité literatury

Adachi, T., Tanaka, H., Nonomura, S., Hara, H., Kondo, S., and Hori, M. (2015). Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrialnuclear network. *Free Radic. Biol. Med.* 79, 28–44.

Akimoto, Y., Ikehara, S., Yamaguchi, T., Kim, J., Kawakami, H., Shimizu, N., Hori, M., Sakakita, H., and Ikehara, Y. (2016). Galectin expression in healing wounded skin treated with lowtemperature plasma: comparison with treatment by electronical coagulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 605, 86–94.

Akishev, Y., Grushin, M., Kochetov, I., Karal'nik, V., Napartovich, A., & Trushkin, N. (2005). Negative corona, glow and spark discharges in ambient air and transitions between them. *Plasma Sources Science and Technology*, 14(2), S18–S25. doi:10.1088/0963-0252/14/2/s03

Barton A, Wende K, Bundscherer L, et al., (2013). Non-thermal plasma increases expression of wound healing related genes in a keratinocyte cell line. *Plasma Med* 2013;3:125–136..

Bauermeister, A., Moeller, R., Reitz, G., Sommer, S., Rettberg, P. (2011). Effect of relative humidity on *Deinococcus radiodurans*' resistance to prolonged desiccation, heat, ionizing, germicidal, and environmentally relevant UV radiation. *Microbial Ecology*, 61, pp. 715–722, 2011.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J. a kol., (1996). *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha : Marvil, 1996. 558 s., ISBN 80-238-0297-6.

Boehm, D., Curtin, J., Cullen, P.J., and Bourke, P. (2017). Hydrogen peroxide and beyond-the potential of high-voltage plasmaactivated liquids against cancerous cells. *Anti-Cancer*

Agents Med. Chem. 17, DOI: 10.2174/1871520617666170801110517. (Epub ahead of print).

Čeladová, V., (2017). Biocidal Effects of Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma, PhD. Thesis, Czech technical University in Prague, Faculty of Electrical Engineering.

Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, 11(11), p. 115020.

Duan, J.; Lu, X.; He, G. On the penetration depth of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet through real biological tissue. *Phys. Plasmas* 2017, 24, 073506.

Dvorak, P., Mrkvickova, M., Obrusnik, A., Kratzer, J., Dedina, J., and Prochazka, V. (2017). Fluorescence measurement of atomic oxygen concentration in a dielectric barrier discharge. *Plasma Sources Sci. Technol.* 26, 065020.

Eswaramoorthy N., McKenzie D. R., (2017). Plasma treatments of dressings for wound healing: a review. *Biophys Rev.* 2017;9(6):895–917. doi:10.1007/s12551-017-0327-x

Fathollah S, Mirpour S, Mansouri P, et al., (2016). Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats. *Sci Rep* 2016;6:19144.

Friedline, A., Zachariah, M., Middaugh, A., Heiser, M., Khanna, N., Vaishampayan, P., and Rice, C. (2015). Sterilization of hydrogen peroxide resistant bacterial spores with stabilized chlorine dioxide. *AMB Express.* 5, 24.

Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter A, Vasilets V, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Processes Polym* 2008;5:503–33.

Ghimire, B., Sornsakdanuphap, J., Hong, Y., Uhm, H., Weltmann, K., and Choi, E. (2017). The effect of the gap distance between an atmospheric-pressure plasma jet nozzle and liquid surface on OH and N₂ species concentrations. *Phys. Plasmas* 24, 073502.

Guo, J., Huang, K., Wang, J. (2015). Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food control*, 50, pp. 482–490.

Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J., and Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25, 1–11.

Ho-Ryun, W., Sung U. K., Haeng, J. K., Jeon, Y. J., Yoo, S. S. And Chul-Ho, K. (2018) Non-thermal plasma treated solution with potential as a novel therapeutic agent for nasal mucosa regeneration. *Scientific Reports* 8, 13754.

Ikehara, Y., Sakakita, H., Shimizu, N., Ikehara, S., and Nakanish, H. (2013). Formation of membrane-like structures in clotted blood by mild plasma treatment during hemostasis. *J. Photopolym. Sci. Technol.* 26, 555–557.

Iseki, S., Nakamura, K., Hayashi, M., Tanaka, H., Kondo, H., Kajiyama, H., Kano, H., Kikkawa, F., and Hori, M. (2012). Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Appl. Phys. Lett.* 100, 113702.

Jha, N., Ryu, J.J., Choi, E.H., and Kaushik, N.K. (2017). Generation and role of reactive oxygen and nitrogen species induced by plasma, lasers, chemical agents, and other systems in dentistry. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 7542540.

Jinasova, L. (2016). Comparison of effects on the inactivation of bacteria caused by UV radiation generated by corona discharge and gliding arc discharge. Master thesis at FEE, CTU in Prague.

Julák J, Scholtz V, (2013). Decontamination of human skin by low-temperature plasma produced by cometary discharge. *Clin Plasma Med* 2013;1:31–4.

Kamgang-Youbi, G., Herry, J.M., Brisset, J.L., Bellon-Fontaine, M.N., Doubla, A., and Naitali, M. (2008). Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/detached state: case of *Hafnia alvei* inactivation by plasma activated water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 449–457.

Kamgang-Youbi, G., Herry, J.M., Brisset, J.L., Bellon-Fontaine, M.N., Doubla, A., and Naitali, M. (2009). Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 13–18.

Kaushik N.K., Ghimire B., Li Y., Adhikari M., Veerana M., Kaushik N., Jha N., Adhikari B., Lee S.-J., Masur K., von Woedtke T., Weltmann K.-D., Choi E.H. (2018). Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions.

Keidar, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Stepp, M., Srinivasan, P., Sandler, A., and Trink, B. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys. Plasmas* 20, 057101.

Kolb, J.F., Mohamed, A.A.H., Price, R.O., Swanson, R.J., Bowman, A., Chiavarini, R.L., and Schoenbach, K.H. (2008). Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Appl. Phys. Lett.* 92, 241501.

Kulhánek, P. (2011). Úvod do teorie plazmatu. AGA, p. 11-14.

Kumar, N., Park, J.H., Jeon, S.N., Park, B.S., Choi, E.H., and Attri, P. (2016). The action of microsecond-pulsed plasma-activated media on the inactivation of human lung cancer cells. *J. Phys. D* 49, 115401.

Kuninova, S., Zaviskova, K., Uherkova, L., Zablotskii, V., Churpita, O., Lunov, O., and Dejneka, A. (2017). Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. *Sci. Rep.* 7, 45183.

Kuok, S.N. (2017). Theory of low-temperature physics. In: Springer Series on Atomic, Optical and Plasma Physics, Vol. 95. ISBN: 978-3-319-43719-4. DOI: 10.1007/978-3-319-43721-7.

Kurake, N., Tanaka, H., Ishikawa, K., Kondo, T., Sekine, M., Nakamura, K., Kajiyama, H., Kikkawa, F., Mizuno, M., and Hori, M. (2016). Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium. *Arch. Biochem. Biophys.* 605, 102–108.

Kurita, M., Shimizu, M., Sano, K., Nakajima, T., Yasuda, H., Takashima, K., and Mizuno, A. (2014). Radical reaction in aqueous media injected by atmospheric pressure plasma jet and protective effect of antioxidant reagents evaluated by single-molecule DNA measurement. *Jap. J. Appl. Phys.* 53, 05FR01.

Laroussi, M. (1996). Sterilization of Contaminated Matter with an Atmospheric Pressure Plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 24, 1188.

Laroussi, M. (2005). Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process. Polym.* 2, 391400.

Laroussi, M.; Lu, X.; Keidar, M. Perspective: The Physics, Diagnostics, and Applications of Atmospheric Pressure Low Temperature Plasma Sources Used in Plasma Medicine. *J. Appl. Phys.* 2017, 122, 020901.

Laroussi, M. (2018). Plasma Medicine: A Brief Introduction. *Plasma*, 1, 47-60.

- Li, Y., Kang, M.H., Uhm, H.S., Lee, G.J., Choi, E.H., and Han, I. (2017a). Effects of atmospheric-pressure non-thermal biocompatible plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells. *Sci. Rep.* 7, 45781.
- Lu, X.; Laroussi, M. Dynamics of an Atmospheric Pressure Plasma Plume Generated by Submicrosecond Voltage Pulses. *J. Appl. Phys.* 2006, 100, 063302.
- Lu, X., Ye, T., Cao, Y., Sun, Z., Xiong, Q., Tang, Z., Xiong, Z., Hu, J., Jiang, Z., Pan, Y. (2008). The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria. *Journal of applied physics*, 104, 2008.
- Lu, X.; Laroussi, M.; Puech, V. On Atmospheric Pressure Non-equilibrium Plasma Jets and Plasma Bullets. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2012, 21, 034005.
- Lu, X.; Naidis, G.; Laroussi, M.; Ostrikov, K. Guided Ionization Waves: Theory and Experiments. *Phys. Rep.* 2014, 540, 123.
- Lu, X.; Naidis, G.V.; Laroussi, M.; Reuter, S.; Graves, D.B.; Ostrikov, K. Reactive Species in Non-equilibrium Atmospheric Pressure Plasma: Generation, Transport, and Biological Effects. *Phys. Rep.* 2016, 630, 1.
- Lukes, P., Locke, B. R., Brisset, J. L. (2012). Aqueous-phase chemistry of electrical discharge plasma in water and in gas-liquid environments *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- Mai-Prochnow, Anne & Bradbury, Mark & Ostrikov, Kostya & Murphy, Anthony. *KinPen*, (2015).
- Mann, M.S., Tiede, R., Gavenis, K., Daeschlein, G., Bussiahn, R., Weltmann, K.-D., Emmert, S., Woedtke, T.V., and Ahmed, R. (2016). Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet *KINPenR MED*. *Clin. Plasma Med.* 4, 35–45.

Misra, N.N., Jo, Ch., (2017). Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry, Trends in Food Science & Technology, Volume 64, 2017, Pages 74-86, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.005>.

Miyamoto, K., Ikehara, S., Takei, H., Akimoto, Y., Sakakita, H., Ishikawa, K., Ueda, M., Ikeda, J., Yamagishi, M., and Kim, J. (2016). Red blood cell coagulation induced by low-temperature plasma treatment. Arch. Biochem. Biophys. 605, 95–101.

Mohades, S., Barekzi, N., Razavi, H., Maruthamuthu, V., and Laroussi, M. (2016a). Intraperitoneal administration of plasma-activated medium: proposal of a novel treatment option for peritoneal metastasis from gastric cancer. Plasma Process. Polym. 13, 12.

Mohades, S., Barekzi, N., Razavi, H., Maruthamuthu, V., and Laroussi, M. (2016b). Temporal evaluation of the anti-tumor efficiency of plasma-activated media. Plasma Process. Polym. 13, 1206.

Norberg, S., Tian, W., Johnsen, E., and Kushner, M. (2014). Atmospheric pressure plasma jets interacting with liquid covered tissue: touching and not-touching the liquid. J. Phy. D: Appl. Phys. 47, 475203.

Oehmigen, K., Hahnel, M., Brandenburg, R., Wilke, C., Weltmann, K.D., and Von-Woedtke, T. (2010). The role of acidification for antimicrobial activity of atmospheric pressure plasma in liquids. Plasma Process. Polym. 7, 250–257.

Pan, J., Sun, K., Liang, Y.D., Sun, P., Yang, X.H., Wang, J., and Becker, K.H. (2013). Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro*. J. Endod. 39, 105–110.

Pendleton, J. N., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F., (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, Expert Review of Anti-infective Therapy, 11:3, 297-308, DOI: 10.1586/eri.13.12

Santos, D.M.F., Sequeira, C.A.C., and Figueiredo, J.L. (2013). Hydrogen production by alkaline water electrolysis. *Quim. Nova.* 36, 1176–1193.

Shekhter, A.B.; Kabisov, R.K.; Pekshev, A.V.; Kozlov, N.P.; Perov, Y.L. (1998). Experimental and Clinical Validation of Plasmadynamic Therapy of Wounds with Nitric Oxide. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 126, 829.

Schindler, J., (2010). *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. 1. vydání.* Praha : Grada, 2010. 0 s. ISBN 978-80-247-3170-4.

Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T., (2017) A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Exp Dermatol* 2017;26:156–162.

Scholtz V, et al, Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection, *Biotechnol Adv* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>

Scholtz, V., Souakova, H., Svarcova, M., Kriha, V., Zivna, H., Julak, J. (2016). Inactivation of dermatophyte infection by nonthermal plasma on animal model. *Medical Mycology*, 2016. Accepted for publication.

Stoffels, E.; Flikweert, A.J.; Stoffels, W.W.; Kroesen, G.M.W. (2002). Plasma Needle: A non-destructive Atmospheric Plasma Source for Fine Surface Treatment of Biomaterials. *Plasma Sources. Sci. Technol.*, 11, 383.

Sun, P., Wu, H., Bai, N., Zhou, H., Wang, R., Feng, H., Zhu, W., Zhang, J., and Fang, J. (2012). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in water by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet. *Plasma Process. Polym.* 9, 157–164.

Sysolyatina, E., Mukhachev, A., Yurova, M., Grushin, M., Karalnik, V., Petryakov, A., Trushkin, N., Ermolaeva, S., Akishev, Y. (2014). Role of the Charged Particles in Bacteria Inactivation by Plasma of a Positive and Negative Corona in Ambient Air. *Plasma processes and polymers*, 11, pp. 315–334.

Teschke, M.; Kedzierski, J.; Finantu-Dinu, E.G.; Korzec, D.; Engemann, J. High Speed Photographs of a Dielectric Barrier Atmospheric Pressure Plasma Jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2005, 33, 310.

Ueda, M., Yamagami, D., Watanabe, K., Mori, A., Kimura, H., Sano, K., Saji, H., Ishikawa, K., Mori, M., Sakakita, H., et al. (2015). Histological and nuclear medical comparison of inflammation after hemostasis with non-thermal plasma and thermal coagulation. *Plasma Process. Polym.* 12, 1338–1342.

Wang, M., Holmes, B., Cheng, X., Zhu, W., Keidar, M., and Zhang, L.G. (2013). Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PLoS One* 8, e73741.

Weltmann, K.-D.; Kindel, E.; vonWoedtke, T.; Hähnel, M.; Stieber, M.; Brandenburg, R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure Appl. Chem.* 2010, 82, 1223.

Xiong, Q., Yang, Z., and Bruggeman, P. (2015). Absolute OH density measurements in an atmospheric pressure dc glow discharge in air with water electrode by broadband UV absorption spectroscopy. *J. Phys. D Appl. Phys.* 48, 424008.

Xiang, J., Wan, C., Guo, R., and Guo, D. (2016). Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? *BioMed. Res. Int.* 2016, 7343965.

Yan, D.Y., Sherman, J.H., Cheng X.Q., Ratovitski, E., Canady, J., and Keidar, M. (2014). Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Appl. Phys. Lett.* 105, 224101.

Yoonje, L., Sanjaya, R., Tae Ho, L., Kiseok, J., Hongjung, K., Yeongtak, S., Sang -Yo, K., Kyu-sun, Ch. (2019). Wound Healing Effect of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet on a Rat Burn Wound Model: A Preliminary Study. *Journal of Burn Care & Research*. 40. 10.1093/jbcr/irz120.

Yue, Y., Pei, X., and Lu, X. (2016a). OH density optimization in atmospheric- pressure plasma jet by using multiple ring electrodes. *J. Appl. Phys.* 119, 033301.

Yue, Y., Xian, Y., Pei, X., and Lu, X. (2016b). The effect of three different methods of adding O₂ additive on O concentration of atmospheric pressure plasma jets (APPJs). *Phys. Plasmas* 23, 123503.

Zhang, Q., Sun, P., Feng, H., Wang, R., Liang, L., Zhu, W., Becker, K., Zhang, J., and Fang, J. (2012). Assessment of the role of various inactivation agents in an argon based direct current atmospheric pressure cold plasma jet. *J. Appl. Phys.* 111, 123305.

Zhang, Q., Ma, R., Tian, Y., Su, B., Wang, K., Yu, S., Zhang, J., and Fang, J. (2016). Sterilization efficiency of a novel electrochemical disinfectant against *Staphylococcus aureus*. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3184–3192.

