



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta elektrotechnická

Východiska plazmové medicíny

Plasma medicine basis

Habilitační práce

Obor jmenování: Aplikovaná fyzika

MUDr. Ing. Vítězslav Kříha, Ph.D.

Praha 2014

Úvod

Plazmová¹ medicína² jako samostatný obor vznikla v druhé polovině minulého desetiletí. Navazovala na výzkum na pomezí fyziky netermálního plazmatu, biologie buňky, plazmové chemie, biochemie aktivních kyslíkových a dusíkových částic, oxidativního stresu, molekulární biologie, fyziky povrchů, biologie buněčné membrány, patologické fyziologie, mikrobiologie a populační biologie. Přestože historie snah o využití elektrických výbojů v terapii sahá téměř k samým začátkům zkoumání vlastností elektrických výbojů ve zředěných plynech (česká kinematografie dobové nadšení pro využití domnělých i skutečných léčebných účinků elektrických výbojů ztvárnila nezapomenutelnou scénou popisující aplikaci elektrického léčebného strojeku ve filmu Postřižiny), jsme stále v situaci, kdy nezřídka na základě experimentálních výsledků musíme zamítnout pracovní hypotézu vycházející z výsledků popsaných v literatuře. Vysvětlení mechanismů biologických účinků netermálního plazmatu tak na svá vysvětlení dosud ještě čekají. Na druhé straně z ryze praktického hlediska jsou plazmové technologie již v lékařské praxi využívány. Jako ukázkou propracovaných aplikací netermálního plazmatu v lékařství můžeme uvést například ošetření lékařských nástrojů a pomůcek v plazmatických sterilizátorech, povrchové úpravy implantátů nebo zástavu akutního či chronického krvácení pomocí argonové koagulační jednotky. Zároveň se objevují kazuistiky popisující hojení kožních defektů, které vzdorovaly jiné terapii. Další oblastí, kde jsou do plazmové medicíny vkládány velké naděje, jsou některá onkologická onemocnění.

¹ Podstatné jméno plazma původně pochází z řečtiny a je užíváno ve více vědních oborech. Do vědecké terminologie termín plazma zavedl v první polovině devatenáctého století Jan Evangelista Purkyně pro označení biologických tekutin, například součásti krve, obsahu buňky či buněčného jádra, dále byl v mineralogii pojmem plazma označován rohovcovitý šedozelený chalcedon. Do češtiny přešlo slovo plazma ve svém původním středním rodě (stejně jako drama, téma, sperma nebo klima). V průběhu dvacátého století se však v biologii a mineralogii slovo plazma začalo podobně jako ve slovenštině či ruštině používat v ženském rodě. Ve fyzice bylo plazma poprvé použito Irvinem Langmuirem v roce 1927 jako označení pro kvazineutrální ionizovaný plyn vykazující kolektivní chování. Na tuto představu pojmu plazma navázala terminologie z fyziky pevných látek a posléze i v jaderné fyzice pro označení extrémních stavů hmoty sestávajících z volných kvarků a gluonů. Plazma ve fyzikálním významu je používáno ve svém původním středním rodě, který si zatím ponechalo. Literární prameny naznačují, že za touto jazykovou pestrostí může stát i důslednost fyziků na Elektrotechnické fakultě ČVUT. Přídavná jména však odvozena nepravdělně, tvar *plazmatický -á, -é*, který odpovídá střednímu rodu, je používán pro pojmy týkající se plazmy v biologickém slova smyslu (například cytoplazmatická membrána), naopak tvar *plazmový -á, -é* je používán k popsaní situací týkajících se plazmatu.

² Termín *Plasma medicine* zatím nemá ustálený český překlad, tvaru *medicína* před pojmem *lékařství* jsem dal přednost vzhledem k již ustálenému (přesto však vzniklému relativně nedávno) spojení nukleární medicína.

Ve výzkumné práci rozvíjející obor plazmové medicíny jsem se zaměřil na tři východiska:

- 1) Vývoj a stanovení parametrů zdrojů netermálního plazmatu za atmosférického tlaku.
- 2) Studium mechanismů účinků netermálního plazmatu na modelové organismy.
- 3) Časné monitorování terapeutického účinku po ošetření netermálním plazmatem.

Na výzkumu orientovaném na vývoj nových zdrojů netermálního plazmatu za atmosférického tlaku jsem se podílel již od jeho zavádění v první polovině devadesátých let na katedře fyziky ve skupině vedené prof. Stanislavem Pekárkem. [11,12,13] Z poměrně širokého spektra možných řešení jsme se věnovali stabilizaci výbojů za atmosférického tlaku s elektrodami s malým poloměrem křivosti pomocí proudění pracovního plynu. Reakční potenciál netermálního plazmatu za atmosférického tlaku byl studován zejména z hlediska generace ozónu, oxidů dusíku a také dekompozice molekul těkavých organických látek. Vedle variací korónového výboje byla pozornost věnována dielektrickému bariérovému výboji. [17,18] Zapojení do týmu, který na pracovišti vytvářel nový směr výzkumu, bylo cennou zkušeností pro pozdější zavádění experimentálního studia biologických účinků netermálního plazmatu.

Studium biologických účinků netermálního plazmatu se orientovalo na inaktivaci růstu modelových mikroorganismů.[3,4,9,10,14,15,16,19] Mikroorganismy byly exponovány netermálnímu plazmatu nejčastěji buď přímo na polotuhém kultivačním médiu, nebo ve vodní suspenzi. Paralelně probíhaly experimenty zaměřené na ovlivnění růstových schopností osiva ošetřeného netermálním plazmatem. [20] Tento výzkum jsme realizovali ve spolupráci s dalšími pracovišti, zejména Ústavem imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Katedrou fyziky Pedagogické fakulty Jihočeské univerzity, Ústavem nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AVČR, v.v.i, Ústavem fyziky a měřicí techniky Fakulty chemicko-inženýrské Vysoké školy chemicko-technologické.

V oblasti časného monitorování terapeutického účinku po ošetření netermálním plazmatem byla pozornost věnována průniku singletového kyslíku do polotuhého kultivačního média. Agarové fantomy jsou využívány jako model lidské tkáně ve studiích zaměřených na průnik léčebné modalitty do hlubších struktur. [15] Tato studie probíhala ve spolupráci s Katedrou anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Další práce obecně orientované na hledání nových biomarkerů vycházejí z klinického výzkumu při sledování pacientů s ledvinným selháním prováděné ve spolupráci s Klinikou nefrologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. [22-25] Tato strategie, kdy jsem svou pozornost soustředil na výzkum, který přímo s plazmovou medicínou nespojuje, byla zvolena ze tří důvodů. V současné chvíli se systematické hledání biomarkerů pro plazmovou terapii nemůže rozvíjet, protože dosud plazmová terapie není široce používána, přesto se dá očekávat, že tato problematika bude v budoucnu velice naléhavá. Studie pacientů se selháním ledvin pracují s relativně malými počty osob ve studovaných skupinách, podobná situace se dá očekávat i u zavádění plazmové terapie, proto je tento výzkum vhodný k osvojení potřebných dovedností při sestavování budoucích studií vyhodnocujících účinnost ošetření patologických změn netermálním plazmatem. Za poslední, níméně důležitý faktor, považuji udržení svých znalostí na aktuálním stavu poznání jak v oblasti fyziky plazmatu, tak lékařství. To vyžaduje udržení kontaktu se současným výzkumem orientovaným na hledání nových biomarkerů.

1. Vývoj a stanovení parametrů zdrojů netermálního plazmatu za atmosférického tlaku

Pod plazmatem rozumíme kvazineutrální soubor nabitých částic vytvářejících plynnou či tekutině podobnou směs volných elektronů a iontů, a rovněž velice často i neutrálních částic (atomů, molekul) s vysokou střední energií elektronů, případně všech složek plazmatu (v rozmezí od zlomků elektronvoltů do jednotek megaelektronvoltů na částici) s významným vlivem nosičů náboje a jimi generovaných elektromagnetických polí na vlastnosti celého systému, zejména na kolektivní chování nosičů náboje (kdy každý nosič náboje interaguje s velkým množstvím ostatních nosičů náboje) a na tvorbu makroskopických oblastí objemového náboje v rámci kvazineutrality plazmatu jako celku. Přítomnost volných nosičů náboje vede k snižování intenzity elektrických a magnetických polí uvnitř plazmatu. S tím kontrastuje chování nabitých částic v okrajových oblastech plazmatu, kde hrají roli nejen vnější pole, ale i lokální pole vytvářená nosiči náboje v samotném plazmatu.³ [6]

Plazma je možné kategorizovat podle různých kritérií, z hlediska biologických aplikací je důležité dělení podle teploty jednotlivých složek plazmatu na plazma termální, kdy je díky dynamické rovnováze srovnatelná teplota všech složek plazmatu (elektronů, iontů i neutrálních částic) a plazma netermální, ve kterém je většina energie exponovaná do výboje využita na ohřev elektronové složky. Elektronová složka je v tepelné rovnováze, takže se pravděpodobnost výskytu elektronů určité rychlosti podrobuje Maxwellovu rozdělení. Typická střední energie elektronů ve výbojích využívaných pro netermální technologie je v rozmezí jednotek elektronvoltů. Ionty a neutrální částice v netermálním plazmatu jsou rovněž v lokální rovnováze, přičemž vytvořením plazmatu se zvyšuje teplota těchto složek plazmatu o několik jednotek až desítek kelvinů.

Netermální plazma může být vytvářeno různými způsoby, například:

- vysokofrekvenčním výbojem (často v kombinaci s proudícím pracovním plynem v podobě plazmových trysek, plazmových per či plazmových jehel),
- mikrovlnným výbojem,
- tichým výbojem,
- korónovým výbojem,
- vnějšími oblastmi klouzavého obloukového výboje,
- výbojem stabilizovaným proudícím prostředím,

³ Striktně vzato je tedy označení plazmových technologií či plazmové medicíny pro děje týkající se ošetření povrchů nepřesné, protože se jedná o interakci s elektrodovými či okrajovými oblastmi výbojů, nicméně daná terminologie se již vžila a tak do účinků přímého působení netermálního plazmatu zahrnujeme i působení elektrodových a okrajových oblastí. V případě nepřímého působení rovněž nemůžeme rozlišit mezi produkty vznikajícími ve vlastním plazmatu výboje a v okrajových a elektrodových oblastech.

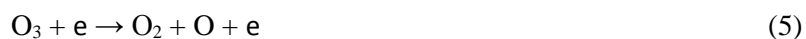
- výbojem stabilizovaným interakcí plazmatu se zvukovou či ultrazvukovou vlnou,
- dielektrickým bariérovým výbojem.

Chemické reakce probíhající v nízkoteplotním plazmatu jsou ovlivněny jak teplotou chladných částí plazmatu, tak i interakcí reagujících molekul s elektronovou složkou. Vzhledem k tomu, že střední energie elektronů je souměřitelná s energií chemických vazeb v molekulách, dochází v důsledku srážek molekul s elektrony velice intenzivně k disociačním dějům. Jelikož elektrony s vyššími energiemi zajišťují excitaci a ionizaci, vzniká v plazmatu pestrá směs chemicky reaktivních komponent. Disociační, excitační a ionizační procesy takto považujeme za plazmochemické reakce, protože vzniklé produkty získávají jiné chemické vlastnosti. Ve výsledku i v prosté soustavě jako je směs kyslíku a dusíku v poměru 1:4 dochází k řadě reakcí, jejichž kinetika je popsána několika sty chemických rovnic. Pro ilustraci si ukážeme typické reakce [2]:

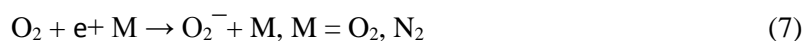
Excitace:



Disociace molekul:



Ionizace:

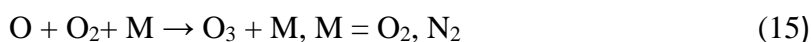


Rekombinace:



Tvorba stabilních reakčních produktů:

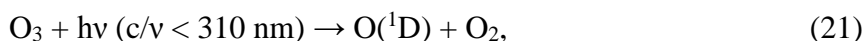
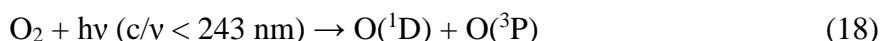




Degradace reakčních produktů:



Vzhledem k tomu, že výboje emitují fotony ve viditelné a ultrafialové části spektra, je třeba plazmochemické reakce doplnit i o reakce fotochemické, jako příklad si uveďme vznik reaktivních forem kyslíku v suchém vzduchu[7, 8, 21]



Při exponování biologického materiálu jsou v reakční směsi obvykle přítomny molekuly vody, takže i u zjednodušených modelů biologických aplikací je třeba zohlednit v reakční směsi koncentraci vodních par. Tím množství reakcí, které je třeba zohlednit, rychle narůstá i v případě dobře definovaných podmínek experimentu. Z hlediska prakticky využitelných aplikací je mnohdy třeba počítat s otevřenými systémy, kde je nutné počítat s difúzí a konvekčním přenosem reakčních produktů do okolí. Další komplikací mohou být pomalé změny teploty a složení pracovního plynu způsobené nerovnoměrným odparem vody během ošetřování povrchů.

Experimenty, které jsme realizovali v devadesátých letech a počátkem tohoto století byly cílené na tvorbu ozónu a dekompozici těkavých uhlovodíků. Z tohoto hlediska se pracovalo s výboji v režimech, které stabilizovaly parametry plazmatu, například nastavením parametrů proudění a vnějšího obvodu tak, aby voltampérové charakteristiky výboje vykazovaly kladný diferenciální odpor. Optimalizace byla vedena směrem zvýšení energetické účinnosti tvorby ozónu, případně dekompozice těkavých organických sloučenin.

Z hlediska studia biologických účinků plazmatu, případně plazmové terapie, se však pohled jak na konstrukci, tak na vhodný pracovní bod mění. Konstrukce aparatury musí umožňovat aplikaci plazmatu na cílový povrch. Uzavřená konstrukce je tak použitelná pouze v případě, kdy je celý ošetřovaný objekt možné umístit do reaktoru (příkladem může být ošetření malých porcí osiva nebo potravin (vejce, ovoce, zelenina). Svě místo tak nacházejí otevřená konstrukční řešení. Dalším trendem je miniaturizace plazmových aplikátorů, které umožňují například i ošetření dutin. Teplota iontů a neutrálních částic ve výbojích vhodných pro biologické aplikace by měla být zvýšena pouze o jednotky kelvinů, jinak hrozí nebezpečí nespecifického poškození v důsledku denaturace bílkovin.

Vedle přímého působení plazmatu, kdy je ošetřovaný objekt buď přímo součástí elektrického obvodu (případně je alespoň umístěn do oblasti s velikostí proudové hustoty řádově srovnatelné se střední hodnotou proudové hustoty výboje), je možné biologické objekty ošetřovat i nepřímou aplikací plazmatu, kdy je ošetřování prováděno produkty vzniklými v plazmatu.

Ukazuje se, že odezva organismů závisí nejen na synergii mechanismů působících v plazmatu (tok nabitých i neutrálních částic, účinky aktivních kyslíkových a dusíkových radikálů, lokální změny pH, průtok proudu, působení lokálních polí a nabíjení povrchů, akumulace ozónu a/nebo oxidů dusíku, infračervené, viditelné a ultrafialové záření), ale i na pořadí, v jakém byly tyto faktory aplikovány. Z tohoto hlediska jsou zajímavá i konstrukční a elektrická řešení výbojových systémů, která jsou nestabilní díky zápornému diferenciálnímu odporu výbojového plazmatu. Další prostor pro vývoj umožňují systémy aktivního řízení napájení výbojů za atmosférického tlaku.

2. Studium mechanismů účinků netermálního plazmatu na modelové organismy

Nástin současného stavu teorií vysvětlujících mechanismy působení netermálního plazmatu na biologické objekty vydá na samostatnou monografii a stále se náhled na dílčí mechanismy zpřesňuje. V tomto komentáři se proto zaměřím pouze na problematiku, které v literatuře není věnována potřebná pozornost, nicméně ji bude nutné řešit, a to sice standardizaci postupů testování účinků plazmatu na modelové organismy.

Použití definovaných mikroorganismů⁴ jako modelových organismů při studiu účinků ošetření plazmatem je metodou první volby s ohledem na pořizovací a provozní náklady výzkumu, relativně nízké nároky na kvalifikaci obsluhujícího personálu, krátké růstové doby a variabilitu experimentů. I přes zdánlivou jednoduchost práce s mikroorganismy je vhodné mít propracované metodiky jednotlivých pracovních postupů, aby se zamezilo časovým ztrátám, případně znehodnocení výsledků způsobených nedostatečně zohledněnými zdroji chyb zanášených do výsledků experimentů.

V současné době nejsou k dispozici standardizované metody, které by umožnily například referenční kvantitativní stanovení inhibice růstu mikroorganismů účinkem určitého typu výboje.

S ohledem na tuto skutečnost jsme při experimentech s konkrétním typem výboje testovali účinnost inhibice růstu definovaných mikroorganismů pomocí modifikace diskové difúzní metody, běžně používané k testování účinnosti antibiotik. Tato metoda je standardizována například metodickým návodem EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Aktuálně platná je verze 3.0 z dubna 2013. [1]

Na příkladu této metody si ukážeme některá specifika spojená s testováními inhibice růstu mikroorganismů po působení netermálního plazmatu na definované organismy. Volba experimentálního uspořádání, parametrů výboje i pořadí aplikace výboje umožňuje tuto metodu využít přímo pro vyhodnocení účinku dílčích faktorů inhibičního působení.

Testování antimikrobiální citlivosti diskovou difúzní metodou EUCAST [1]

1 Úvod

Disková difúzní metoda je jedním z nejstarších přístupů k testování antimikrobiální citlivosti a zůstává jedním z nejvíce používaných antimikrobiálních testů citlivosti v rutinních klinických laboratořích. Je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů, včetně nejobvyklejších náročných bakterií,

⁴ V našich experimentech jsme převážně používali mikroorganismy získané z České sbírky mikroorganismů. V případě započaté spolupráce zaměřené na ošetření osiva nebo řízení kvality potravin je na místě používat izolované kmeny, které typicky kontaminují cílový objekt.

je univerzální v rozmezí antimikrobiálních látek, které mohou být testovány, a nevyžaduje žádné speciální vybavení.

Společně s několika dalšími diskovými difúzními technikami je EUCAST standardizovaná metoda založená na zásadách stanovených ve zprávě Mezinárodní společné studie pro testování antimikrobiální citlivosti z roku 1972 a ze zkušeností expertních skupin po celém světě.

Přestože se v publikacích objevují práce, které využívají pro testování citlivosti mikroorganismů na účinky netermálního plazmatu podobnou metodu, dosud nebyla zorganizována multicentrická studie, která by poskytla data pro standardizaci.

Hraniční průměry inhibičních zón v metodě EUCAST jsou kalibrovány podle harmonizovaných evropských hraničních hodnot, které zveřejňuje EUCAST a jsou volně k dispozici na webových stránkách EUCAST (<http://www.eucast.org>).

Průměr inhibiční zóny je dán nejen difúzí reakčních produktů do okolí, ale je ovlivněn i rozložením elektrického pole výboje a směrem unášení reaktivních částic iontovým větrem.

Stejně jako u ostatních metod musí být níže popsána metoda prováděna bez úpravy, aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků.

Ze své podstaty musíme do metody zasáhnout, protože modifikací diskové metody testujeme jiné faktory inhibující růst bakterií, než jsou antibiotika difundující v polotuhém médiu, nicméně nemáme k dispozici jinou metodu, která by nám sloužila jako referenční.

2 Příprava média

2.1 Připravte MH agar podle návodu výrobce, s aditivy u náročných organismů, jak je uvedeno v tabulce 1.⁵ Příprava a přidání doplňků jsou detailně popsány na stránce <http://www.eucast.org>.

2.2 Médium by mělo mít výši 4 mm \pm 0.5 mm (cca 25 ml pro 90 mm kruhové misky, 31 ml pro 100 mm kruhové misky, 71 ml pro 150 mm kruhové misky, 40 ml na 100 mm čtvercové misky).

Výška média může být problematická u delších expozic. Díky iontovému větru je povrch polotuhého média deformován a agar může být i zcela odtlačen z nejvíce exponované oblasti.

⁵ Tabulky, na které se odkazuje návod, nejsou podstatné pro pochopení metody a v textu je necitují.

2.3 Povrch agaru musí být před použitím suchý. Pokud plotny vyžadují sušení, pak se doba potřebná k sušení povrchu agaru odvíjí od podmínek skladování a sušení. Nepoužívejte přesušené plotny.

Vysychání ploten ovlivňuje nejen růstové vlastnosti inokulovaných bakterií, ale vzhledem ke změně povrchu polotuhého média v důsledku působení iontového větru změna viskozity agarového gelu způsobuje jiné chování ošetřované plotny v závislosti na trvání expozice. V případech, kdy jsou již nalité plotny dodávány v rámci služby třetí stranou, je vhodné tento aspekt zohlednit.

2.4 Ukládejte plotny připravené v rámci instituce při 8–10 °C. Jsou-li plotny skladovány déle než 7 dní, mohou být požadovány postupy alternativního uložení, jako je například ukládání ploten při 4–8 °C, v hermeticky uzavřených plastových sáčkách.

2.5 Pro plotny připravené v rámci instituce, sušení ploten, podmínky a doba skladování by měly být stanoveny jako součást programu zabezpečování kvality laboratoře.

2.6 Komerčně připravené desky by měly být uloženy v souladu s doporučením výrobce a používané do vyznačeného data expirace.

Doporučení výrobce se vztahuje k očekávanému využití agarových ploten. Výše zmíněné problémy s vysycháním a následnou změnou viskozity gelu je třeba mít v patrnosti i u komerčně dodávaných ploten.

3 Příprava inokula

3.1 Použijte metodu přímého suspendování kolonií k vytvoření suspenze daného organismu ve fyziologickém roztoku o hustotě zákalu 0,5 podle McFarlandovy stupnice (tabulka 2), která pro Escherichia coli přibližně odpovídá hustotě $1-2 \times 10^8$ CFU⁶ / ml. Metoda přímého suspendování kolonií je vhodná pro všechny organismy, včetně náročných organismů, jako je Haemophilus spp., Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, β-hemolytické streptokoky a další.

Při testování inaktivačních účinků výbojů využíváme i předem připravené suspenze bakterií. Je vždy nutné kontrolní stanovení hustoty inokula a je nepřipustné v rámci jedné experimentální kampaně používat suspenze připravené různými metodami.

⁶ CFU označuje Colony Forming Unit, kolonie tvořící jednotku. Jedná se o jednotlivý mikroorganismus či shluk mikroorganismů, ze kterého po inokulaci na polotuhé médium může při kultivaci vzniknout izolovaná kolonie.

3.1.1 Kultivujte organismus přes noc na neselektivním médiu. Použijte několik morfologicky podobných kolonií (je-li to možné), aby se zabránilo výběru atypické varianty, a vytvořte suspenzi kolonií ve fyziologickém roztoku pomocí sterilní smyčky nebo vatového tamponu.

Jelikož k testování jsou používány definované organismy ze sbírky mikroorganismů, je naopak třeba kontrolovat, zdali nedošlo ke kontaminaci zásobní kultury nežádoucím organismem. Při výskytu morfologicky různých kolonií je nutné vyslovit podezření z kontaminace a následně vytvořit novou zásobní kulturu.

3.2 Natitrujte suspenzi inokula na hustotu 0,5 McFarlandovy stupnice. Hustší inokulum bude mít za následek zmenšení inhibičních zón a zředěné inokulum bude mít opačný účinek.

Na rozdíl od standardizovaných dávek antibiotik se inhibice růstu způsobená vystavením netermálnímu plazmatu mění v širokém rozmezí. Vhodně zvolená koncentrace inokula v některých případech umožní sledovat závislost inhibičního efektu na parametrech expozice.

3.2.1 Doporučuje se, aby k nastavení hustoty suspenze bylo použito fotometrické zařízení. Fotometrický densitometr musí být kalibrován proti standardu o hustotě 0,5 McFarlandovy stupnice podle pokynů výrobce.

Použití densitometru je zvláště vhodné při titrování hustot odlišných od standardů McFarlandovy stupnice.

3.2.2 Alternativou může být vizuální srovnání hustoty suspenze se zákalovým standardem 0,5 McFarlandovy stupnice.

Energicky protřepejte zákalový standard před použitím na vortexu (některé obchodní normy jsou na gelové bázi a neměly by se míchat, takže postupujte podle pokynů dodavatele).

Pro snazší srovnání porovnávejte testovanou suspenzi a standard proti bílému pozadí s černými čarami.

V případě, kdy je použito pouze vizuální porovnání se standardem, je na místě provádět kontrolní stanovení koncentrace inokula kultivací řady ředění suspenze tak, aby bylo možné stanovit koncentraci spočítáním jednotlivých kolonií a vynásobením činitelem ředění.

3.2.3 Streptococcus pneumoniae by měl být přednostně do suspenze s hustotou 0,5 McFarlandovy stupnice přenášen z krevního agaru. Když je Streptococcus pneumoniae přenášen z čokoládového agaru, musí být inokulum ekvivalentní standardu McFarland 1,0.

3.2.4 Nastavte hustotu suspenze organismů na 0,5 McFarlandovy stupnice přidáním fyziologického roztoku nebo přidáním organismů.

3.3 Suspenze by měla být použita v optimálním případě během 15 minut, a to vždy do 60 minut po přípravě.

4 Očkování agarové plotny

4.1 V optimálním případě využijte titrovanou suspenzi inokula do 15 minut po přípravě. Suspenze musí být použita vždy do 60 minut po přípravě.

4.2 Namočte sterilní vatový tampon do suspenze pro odstranění přebytečné tekutiny otáčením tamponu proti vnitřku nádoby.

Je důležité odstranit přebytečnou tekutinu z tampónu, aby se zabránilo nadměrné inokulaci ploten, a to zejména u Gram-negativních organismů.

4.3 Rozprostřete inokulum rovnoměrně po celém povrchu plotny stěrem ve třech směrech, nebo pomocí automatického rotátoru ploten.

4.4 Použijte plotny během 15 minut.

Pokud jsou naočkované destičky ponechány při pokojové teplotě po delší dobu, než jsou aplikovány na disky, může organismus začít růst, což vede k chybnému snížení velikosti zón inhibice. Disky by proto měl být aplikovány na povrch agaru do 15 minut po naočkování.

Jelikož výboje není možné aplikovat souběžně při různých parametrech, znamenalo by toto doporučení si před každým experimentem připravit novou suspenzi. To vede k časovým ztrátám, neboť před zahájením expozice nesmí po povrchu plotny suspenze volně stékat (nebylo by možné odlišit inaktivaci od mechanického odtlačení iontovým větrem; navíc by s plotnami muselo být manipulováno ve vodorovné poloze). Proto je u ploten používaných déle než čtvrt hodiny po přípravě (i při uložení v chladničce) vhodné provést ověření necitlivosti metody na použité prodlevě před expozicí, která je použita jako kontrolní standard.

5 Použití antimikrobiálních disků

Namísto disků napuštěných antibiotikem jsou plotny s inokulem ošetřeny netermálním plazmatem. Povrch gelu je možné využít jako rovinnou elektrodu (přímého působení plazmatu) je však třeba vést v patrnosti, že v důsledku iontového větru se gel během expozice deformuje.

5.1 Požadavky na disky v tabulkách na <http://www.eucast.org>.

Z hlediska porovnání výsledků z různých pracovišť by bylo vhodné zavést etalon působení netermálního plazmatu v podobě relativně levného a jednoduchého výbojového systému.

5.2 Umístěte disky pevně na povrch naočkované a suché agarové plotny. Kontakt s agarem musí být těsný a rovnoměrný. Disky se nesmí pohybovat po aplikaci na povrchu plotny, protože difúze antimikrobiálních látek z disků je velmi rychlá.

5.3 Počet disků na talíři by měl být omezen, aby se zabránilo překrývání zón a rušení mezi agenty. Je důležité, aby průměry zón šlo spolehlivě měřit. Maximální počet disků závisí na typu organismu a výběru disků. Normálně je používáno maximálně 6, případně 12 disků na 90 a 150 mm kruhové plotny.⁷

Při ošetření plotny plazmatem musí být na každé jednotlivé měření použita nová plotna. Není přípustné exponovat jednu plotnu na více místech při různých parametrech výboje. Je experimentálně ověřeno, že se následné experimenty prováděné na jedné plotně vzájemně ovlivňují. Toto ovlivnění není komutativní, i při stejné expozici na více místech plotny dostaneme rozdílné výsledky.

6 Inkubace ploten

6.1 Obrátte plotny a inkubujte je do 15 minut po aplikaci disků. Jsou-li plotny ponechány při pokojové teplotě poté, co byly použity disky, může mít difúze před zahájením růstu za následek falešné zvětšení inhibiční zóny.

Respektování tohoto doporučení minimalizuje rizika spojená s nechtěným opakováním expozice, případně s nežádoucím vystavením působení ozónu při ponechání plotny v blízkosti výboje.

6.2 Ukládání ploten na sebe v inkubátoru ovlivňuje výsledky díky nerovnoměrnému ohřevu plotny. Účinnost inkubátorů se liší, a proto je nutná kontrola inkubace, včetně stanovení přípustného množství desek ukládaných na sebe, v rámci programu zajištění kvality laboratoře.⁸

7 Vyšetření ploten po inkubaci

7.1 Správné inokulum a jeho uspokojivé rozprostření po plotně by mělo vést k růstu splývající biomasy.

Toto doporučení naráží na omezení malé rozlišovací schopnosti pro některé změny parametrů výbojů.

7.2 Růst by měl být na plotně rozložený rovnoměrně k dosažení rovnoměrné kruhové (nikoli zubaté) inhibiční zóny.

⁷ Bod 5.4 se týká kontroly kvality disků a není zde uveden.

⁸ Body 6.3 6.4 upřesňují podmínky inkubace pro jednotlivé druhy mikroorganismů

Tvar inhibiční zóny kromě rovnoměrné inokulace povrchu plotny ovlivňují i vlastnosti výboje, inhibiční zóny tak mohou mít i poměrně bizarní tvary.

7.3 Pokud lze jednotlivé kolonie vidět, inokulum je příliš řídké a test se musí opakovat.

Gradient účinků plazmatu směrem k okraji inhibiční zóny může klesat tak pomalu, že i pro případ hustého inokula jsou pozorovány jednotlivé kolonie.

7.4 Ujistěte se, že inhibiční zóny jsou v mezích kontroly kvality.

Přestože není k dispozici všeobecně uznávaný etalon, můžeme si zavést sledování kvality s vybraným zdrojem netermálního plazmatu v rámci laboratoře.

V bodech 8 a 9 se metodický návod zabývá pokyny pro čtení inhibičních zón, které jsou v experimentálním výzkumu omezeně využitelné. Předpokládají odečítání velikosti zón pouhým okem, zatímco v našem výzkumu je vhodné pořizovat fotodokumentaci. Dále se zabývají interpretací výsledků, která není v naší modifikaci použitelná a metodami kontroly kvality, které testují celý řetězec pomocí známých citlivých kmenů.

Při ošetření vodní suspenze je výstupem počet přeživších mikroorganismů.

V případě zkoumání vlivů parametrů výboje na ošetření osiva používáme standardizované testy klíčivosti a polní testy.

3. Časné monitorování terapeutického účinku po ošetření netermálním plazmatem

Otázku časného monitorování terapeutického účinku lze formulovat jako potřebu nalezení vhodných biomarkerů plazmové terapie. Experimenty na mikroorganismech naznačují, že výsledek ošetření lze výrazně ovlivnit nejen samotnými pracovními parametry, ale i pořadím v jakém byly parametry měněny. Z tohoto hlediska se množství parametrů, kterým lze ovlivnit terapii značně rozšiřuje a pouhé sledování klinického stavu pacientů po empiricky zvoleném protokolu terapie, které může trvat i několik týdnů, je samozřejmě problematické nejen z hlediska praktického (jaké parametry výboje vybírat v jednotlivých skupinách pacientů), ale i etického (sledujeme pouze výsledek terapie, nemonitorujeme průběh a nepřizpůsobujeme jej aktuálnímu klinickému stavu).

Biomarker v užším slova smyslu označuje měřitelnou vlastnost odrážející přítomnost, případně závažnost chorobného stavu. V širším slova smyslu jde o měřitelnou veličinu, která může být použita jako indikátor stavu organismu, vývoje onemocnění a průběhu léčby. Biomarker může mít charakter fyzikální, chemický nebo biologický. Příkladem fyzikálního markeru je například teplota tkáně nebo její zbarvení, chemické markery mohou být enzymy, metabolické produkty, hormony, hladiny iontů, aktivní radikály, biologické markery jsou například specifické buňky, geny, genové produkty, protilátky, signální molekuly nebo receptory. Obecně jsou na biomarkery kladeny požadavky snadné dostupnosti (v ideálním případě bezkontaktní diagnostika, neinvazivní odběr ze slin, potu, moči, případně tkáňového exsudátu, minimálně invazivní odběr u periferní krve) a rychlosti zpracování výsledků (ideálně během několika minut). S ohledem na diagnostiku je žádoucí, aby senzitivita testu (poměr kladné odpovědi testu ke skutečně kladnému stavu) i specifita (poměr negativní odpovědi testu ke skutečně negativnímu stavu) přesahovaly 90%.

Biomarkery jsou děleny do tří typů: [5]

typ 0 – přirozené markery historie onemocnění,

typ 1 – markery odrážející biologický efekt terapeutické intervence,

typ 2 – náhradní biomarkery, parametry korelující s klinickým stavem léčby či průběhem onemocnění, avšak s nimi nemusí být v potvrzené příčinné vazbě.

Pro sledování plazmové terapie je výzvou hledání biomarkerů typu 1 a 2. U biomarkerů 1 typu je již pozornost věnována v první řadě průniku reaktivních forem dusíku a kyslíku a oxidů dusíku do tkání z čistě fyzikálního pohledu na ošetřovanou soustavu. Z fyziologického hlediska bude zajímavé lokální ovlivnění mikroflóry a buněk tkání a zároveň hladiny ukazatelů zánětu.

Závěr

Plazmová medicína je rychle se rozvíjející součástí současné fyziky plazmatu a považuji za přirozené rozvíjet tento směr v rámci doktorského studijního programu v oboru Fyzika plazmatu. Z dlouhodobého pohledu je pravděpodobné, že plazmové technologie budou více pronikat do lékařské praxe a výchova odborníků v plazmové medicíně je potřebná i z hlediska pěstování oboru Biomedicínské inženýrství a informatika.

Všechna tři zvolená východiska jsou v současné době v bouřlivém vývoji.

V oblasti zdrojů netermálního plazmatu za atmosférického tlaku se dá předpokládat cílený vývoj terapeutických aplikátorů, zejména pro potřeby endoskopického přístupu.

V oblasti pochopení mechanismů účinku plazmatu na živé organismy vidím jako jeden z prvořadých úkolů standardizaci metod vyhodnocení účinků plazmatu pro potřeby rozsáhlejších multicentrických studií.

Současný rozvoj molekulární biologie, konkrétně genomiky, transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky rozšiřuje spektrum kandidátských biomarkerů typu 1 o diagnostiku na buněčné úrovni. Zároveň tyto metody umožňují studovat elementární děje interakce buněk s plazmatem na modelových organismech či tkáňových kulturách.

Literatura

1. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_3.0_EUCAST_Disk_Test.pdf
2. Askarjan G. A. et al.: Физика и химия газовых разрядов в пучках СВЧ волн. Труды института общей физики, том 47, Nauka, Moskva, 1994, 23
3. Bujaček, K. - Fantova, V. - Kříha, V.: Decontamination Effects of the Corona Discharge with Plane to Bent Needle Configuration. Problems of Atomic Science and Technology. Series: Plasma Physics. 2012, vol. 82, no. 6, 187-189
4. Fantova, V. - Bujaček, K. - Kříha, V. - Julák, J.: Inactivation of *Candida albicans* by Corona Discharge: The Increase of Inhibition Zones Area After Far Subsequent Exposition. Acta Polytechnica. 2013, vol. 53, no. 2, p. 148-151. ISSN 1210-2709.
5. Frank R and Hargreaves R Clinical biomarkers in drug discovery and development. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 2003, 566–58
6. Hippler, R. - Kersten, H. - Schmidt, M., Schoenbach K.H.: Low temperature plasmas, Vol. 1, Wiley-VCH, 2008
7. Chen Feiyan, S.O. Pehkonen, Madhumita B. Ray: Kinetics and mechanisms of UV-photodegradation of chlorinated organics in the gas phase, Water Research 36 (2002) 4203–4214
8. Juyoung Jeonga, Kazuhiko Sekiguchia, Wookeun Leeb, Kazuhiko Sakamoto: Photodegradation of gaseous volatile organic compounds (VOCs) using TiO₂ photoirradiated by an ozone-producing UV lamp: decomposition characteristics, identification of by-products and water-soluble organic intermediates, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 169 (2005) 279–287.
9. Julák, J. - Kříha, V. - Scholtz, V.: Corona discharge: A simple method of its generation and study of its bactericidal properties. Czechoslovak Journal of Physics. 2006, vol. 56, no. Suppl. B, p. 1333-1338. ISSN 0011-4626.
10. Julák, J. - Kříha, V. - Scholtz, V.: The study of bactericidal effects of corona discharge at atmospheric pressure. In 33rd EPS Conference on Plasma Physics. Frascati: European Physical Society, 2006, p. P4.007. ISBN 2-914771-40-1.
11. Pekárek, S. - Kříha, V. - Pospíšil, M. - Viden, I.: Multi Hollow Needle to Plate Plasmachemical Reactor for Pollutant Decomposition. Journal of Physics D: Applied Physics. 2001, vol. 34, no. 22, p. 117-121. ISSN 0022-3727.
12. Pekárek, S. - Kříha, V. - Šimek, M. - Bálek, R. - Hanitz, F.: Hollow Needle-to-Plate Electrical Discharge at Atmospheric Pressure. Plasma Sources Science and Technology. 1999, vol. 8, no. 3, p. 513-518. ISSN 0963-0252.
13. Pekárek, S. - Rosenkranz, J. - Kříha, V.: Ozone Generation in Gas Flow Enhanced Hollow Needle to Plate Electrical Discharge. Czechoslovak Journal of Physics. 2000, vol. 50, no. S3, p. 385-388. ISSN 0011-4626.
14. Scholtz, V. - Julák, J. - Kříha, V. - Mosinger, J.: Decontamination Effects of Low-temperature Plasma Generated by Corona Discharge Part I: an Overview. Prague Medical Report . 2007, vol. 108, no. 2, p. 115-127. ISSN 1214-6994.

15. Scholtz, V. - Julák, J. - Kříha, V. - Mosinger, J. - Kopecká, S.: Decontamination Effects of Low-temperature Plasma Generated by Corona Discharge Part II: New Insights. Prague Medical Report . 2007, vol. 108, no. 2, p. 128-146. ISSN 1214-6994.
16. Scholtz, V. - Julák, J. - Kříha, V.: The microbicidal effect of low-temperature plasma generated by corona discharge: Comparison of various microorganisms on an agar surface or in aqueous suspension. Plasma Processes and Polymers. 2010, vol. 7, no. 3-4, p. 237-243. ISSN 1612-8850.
17. Sláma, J. - Bauer, J. - Flígl, S. - Kříha, V.: Active Control of Atmospheric Pressure Discharges. Problems of Atomic Science and Technology. Series: Plasma Physics. 2013, vol. 83, no. 1, p. 246-248. ISSN 1562-6016.
18. Sláma, J. - Kříha, V. - Julák, J. - Fantova, V.: Comparison of Dielectric Barrier Discharge Modes Fungicidal Effect on Candida Albicans Growth. Problems of Atomic Science and Technology.
19. Straňák, V. - Tichý, M. - Kříha, V. - Scholtz, V. - Šerá, B. - et al.: Technological Applications of Surfatron Produced Discharge. JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS. 2007, vol. 9, no. 4, p. 852-857. ISSN 1454-4164.
20. Šerá, B. - Gajdová, I. - Černák, M. - Gavril, B. - Hnatiuc, E. - et al.: How various plasma sources may affect seed germination and growth. In Book of Abstracts of the 13th Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment. Brasov: Transilvania University of Brasov, 2012, p. 1365-1370. ISSN 1842-0133. ISBN 978-1-4673-1650-7.
21. Wang JH, Ray MB.: Application of ultraviolet photooxidation to remove organic pollutants in the gas phase, Sep Purif Technol 19 (2000) 11–20.
22. Zakiyanov, O. - Kalousová, M. - Kratochvilová, M. - Kříha, V. - Zima, T. - et al.: Determinants of Circulating Matrix Metalloproteinase-2 and Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in Patients with Chronic Kidney Disease. CLINICAL LABORATORY. 2012, vol. 58, no. 5-6, p. 471-480. ISSN 1433-6510.
23. Zakiyanov, O. - Kalousová, M. - Kratochvilová, M. - Kříha, V. - Zima, T. - et al.: Changes in levels of matrix metalloproteinase-2 and -9, pregnancy-associated plasma protein-A in patients with various nephropathies. Journal of Nephrology. 2013, vol. 26, no. 3, p. 502-509. ISSN 1121-8428.
24. Zakiyanov, O. - Kalousová, M. - Kříha, V. - Zima, T. - Tesař, V.: Serum S100A12 (EN-RAGE) Levels in Patients with Decreased Renal Function and Subclinical Chronic Inflammatory Disease. Kidney and Blood Pressure Research [online]. 2011, vol. 34, no. 6, p. 457-464. Internet: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?doi=10.1159/000329291>. ISSN 1420-4096.
25. Zakiyanov, O. - Kříha, V. - Vachek, J. - Zima, T. - Tesař, V. - et al.: Placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, soluble receptor for advanced glycation end products, extracellular newly identified receptor for receptor for advanced glycation end products binding protein and high mobility group box 1 levels in patients with acute kidney injury: a cross sectional study. BMC Nephrology [online]. 2013, vol. 14, no. 245, Internet: <http://www.biomedcentral.com/1471-2369/14/245>. ISSN 1471-2369.

Odkazy na přiložené publikace:

1. http://vant.kipt.kharkov.ua/ARTICLE/VANT_2012_6/article_2012_6_187.pdf
2. <http://ojs.cvut.cz/ojs/index.php/ap/article/view/1739>
3. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10582-006-0370-5>
4. http://epsppd.epfl.ch/Roma/pdf/P4_007.pdf
5. <http://iopscience.iop.org/0022-3727/34/22/102/>
6. <http://iopscience.iop.org/0963-0252/8/3/321>
7. http://download.springer.com/static/pdf/758/art%253A10.1007%252FBF03165915.pdf?auth66=1394004738_8ff2190d0f567bd51f7c24b4710d6018&ext=.pdf
8. <http://int2.lf1.cuni.cz/Data/files/PragueMedicalReport/PMR%2007-02%20Scholtz1.pdf>
9. http://www.researchgate.net/publication/5625491_Decontamination_effects_of_low-temperature-plasma-generated_by_corona_discharge._Part_II_new_insights/file/e0b4951629dbe330f2.pdf
10. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ppap.200900072/full>
11. http://vant.kipt.kharkov.ua/ARTICLE/VANT_2013_1/article_2013_1_246.pdf
12. http://vant.kipt.kharkov.ua/ARTICLE/VANT_2013_1/article_2013_1_237.pdf
13. http://www.nh.cas.cz/upload/publication/optoelectronic_07.pdf
14. <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/abstractKeywords.jsp?arnumber=6231880>
15. <http://www.readcube.com/articles/22783577?locale=en>
16. <http://www.jnephrol.com/article/changes-in-levels-of-matrix-metalloproteinase-2-and-9-pregnancy-associated-plasma-protein-a-in-patients-with-various-nephropathies>
17. <https://www.karger.com/Article/FullText/329291>
18. <http://www.biomedcentral.com/1471-2369/14/245>