

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

KATEDRA FYZIKY



## VÝZKUMNÝ ÚKOL

### **Ošetřování onkologických lézí netermálním plazmatem**

Autor: Bc. Anna Machková

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

Praha, 2019

*Název práce:* **Ošetřování onkologických lézí netermálním plazmatem**  
*Autor:* Anna Machková  
*Obor:* Fyzika a technika termojaderné fúze (FTTF)  
*Druh práce:* Výzkumný úkol  
*Vedoucí práce:* MUDr. Ing. Vítězslav Kříha, Ph.D.  
Katedra fyziky, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

*Abstrakt:*

Existuje velké množství biomedicínských aplikací netermálního plazmatu, např. sterilizace. Pokud je 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. Toto pole výzkumu – plazmová medicína – je velmi široké a multidisciplinární, zasahuje do fyziky, inženýrství, biologie, medicíny a je staré přibližně pouhé dvě dekády, ale za posledních pár let se výrazně rozrostlo. Je zde též několik studií zabývajících se plazmatem vyvolanou apoptózou a tlumení aktivity rakovinných buněk, které potvrzují možnou budoucí aplikaci plazmové terapie u nádorových onemocnění. 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 především plazmatem ošetřených roztoků na desinfekci a hojení ran, léčbu nádorových onemocnění a mechanismus jeho účinku. Následný výzkum by měl obsahovat nejprve in vitro experimenty s ošetřováním mikrobiálních kultur odpovídajících mikrobiálnímu osídlení onkologických lézí a poté na základě výsledků plánování klinické studie ošetřování onkologických lézí.

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

*Title:* **Non-thermal plasma treatment of oncological lesions**

*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, and problems to be solved. 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 my literary research in the field of influence of non-thermal (nonequilibrium, atmospheric pressure) plasma and especially plasma treated solutions on wound disinfection and healing, cancer treatment and the mechanism issue of this processes. My own research should then include at first in vitro experiments of plasma treatment of microbial samples corresponding to microbial settlements of oncological lesions and secondly the planing of clinical study for plasma treatment of oncological lesions.

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

# Obsah

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| Úvod a cíle práce.....                                          | 8         |
| <b>1 Teoretické základy použití plazmatu v biomedicině.....</b> | <b>10</b> |
| 1.1 Historický úvod.....                                        | 10        |
| 1.2 Základní mechanismus biologického účinku CAP.....           | 12        |
| <b>2 Zdroje plazmatu pro medicínské účely.....</b>              | <b>13</b> |
| <b>3 Plazmatem aktivované roztoky.....</b>                      | <b>16</b> |
| 3.1 Chemické základy.....                                       | 17        |
| 3.2 PAM a apoptóza – role RONS.....                             | 20        |
| 3.3 Mechanismus působení PAM na molekulární úrovni.....         | 22        |
| 3.4 Vliv na zdravé buňky.....                                   | 23        |
| <b>4 Desinfekce a ošetřování ran.....</b>                       | <b>25</b> |
| <b>5 Diskuze a závěr.....</b>                                   | <b>29</b> |
| Seznam použité literatury.....                                  | 30        |

## Úvod a cíle práce

Předložená práce je rešerší a teoretickým úvodem pro následnou diplomovou práci. Uvádí do problematiky biomedicínského využití plazmatu s důrazem na plazmovou medicínu a aplikaci plazmatem aktivovaných roztoků. Toto pole výzkumu je velmi široké a multidisciplinární, zasahuje do fyziky, inženýrství, biologie, medicíny a je staré přibližně pouhé dvě dekády, ale za posledních pár let se výrazně rozrostlo. 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 této rešerše bylo použito velké množství odborných publikací a shrnuje z nich získané poznatky o mechanismu účinku a možných využití netermálního atmosferického plazmatu na poli medicíny.

Cíle diplomové práce jsou následující:

1. Seznámit se se současným stavem terapeutických možností netermálního plazmatu směrem k onkologickým lézím.
2. Osvojení si praktických dovedností při ošetřování bakteriálních kultur odpovídajících mikrobiálnímu osídlení lézí in vitro.
3. Seznámení se s klinickou problematikou onkologických lézí na konkrétních pacientech.
4. Sestavení plánu klinické studie pro ošetřování onkologických lézí.
5. Zpracování problematiky schvalování užití netermálního plazmatu v klinické praxi.

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. Kapitola Zdroje plazmatu pro medicínské

účely pojednává o různých možnostech produkce plazmatu a jeho parametrech. Třetí kapitola je věnována Plazmatem aktivovaným roztokům, kde je rozebráno získávání, chemická podstata účinku a využití plazmatem aktivovaných roztoků. Poslední kapitola je věnována Desinfekci a ošetřování ran a popisuje aktuální poznatky o vlivu plazmatu a plazmatem aktivovaných roztoků na hojení ran, jsou zde nastíněny jeho výhody a mechanismy účinku. V Diskuzi a závěru se nachází shrnutí hlavních získaných poznatků a jejich následné použití při samotném výzkumu pro diplomovou práci.

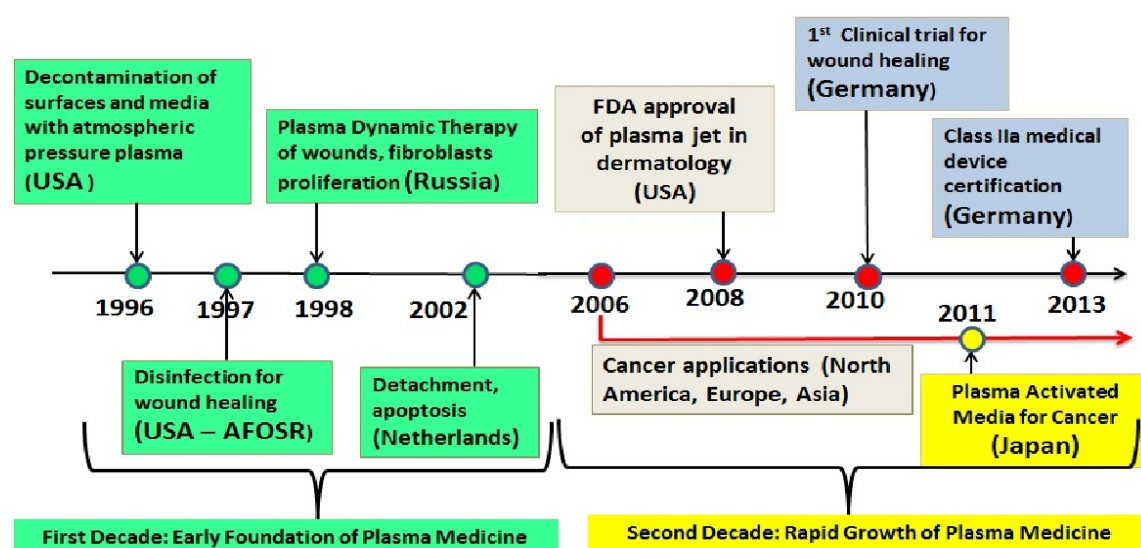
# 1. Teoretické základy použití plazmatu v biomedicině

Plazma je čtvrtým skupenstvím hmoty, obsahuje volné nosiče náboje, čímž získává nové vlastnosti, které u jiných skupenství neznáme, kolektivně reaguje na elektrické a magnetické pole a samo je vytváří. Existuje mnoho typů dělení plazmatu, podle jeho různých vlastností. (Kulháněk, 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. 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 et al., 2017), léčby rakoviny (Keidar a kol., 2013) a ošetření kůže (Heinlin a kol., 2011).

## 1.1 Historický úvod

V polovině devadesátých let výsledky výzkumu Laroussiho a kol. (1996) ukázaly, že CAP lze použít k inaktivaci bakterií. Na základě slibných výsledků byl výzkum na tomto poli dalších několik let sponzorován US Air Force Office of Scientific Research. Výsledky tohoto výzkumného programu byly publikovány v literatuře a nově objevenou aplikací CAP v biologii a medicíně přilákaly pozornost komunity kolem fyziky plazmatu. Původním záměrem US Air Force Office of Scientific Research byla aplikace CAP pro ošetřování ran zraněných vojáků a sterilizaci/desinfekci biotických a abiotických povrchů. Na začátku druhého tisíciletí byl výzkum rozšířen i na eukariotické buňky, kde při aplikaci malých dávek CAP bylo pozorováno zvýšení fagocytózy, zrychlení proliferace fibroblastů, oddělení savčích buněk bez způsobení nekrózy a za některých podmínek 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) tak, aby způsobilo určitý požadovaný výsledek. Tyto počáteční úspěchy vzbudily velký zájem mnoha laboratoří všude po světě a na konci první dekády 20. století byla kolem této disciplíny zavedena 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, desinfekce 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 20. století bylo též schváleno několik zdrojů CAP pro kosmetické a medicínské účely. 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. Není zde uveden případ termálního plazmatu, které bylo po mnoho desetiletí používáno v medicínských aplikacích vyžadujících teplo, jako je kauterizace (zcelování ran pálením) a koagulace krve. (Laroussi, 2018)

Jak je vidět z obrázku 1, biomedicínské aplikace CAP začaly experimenty na inaktivovaných bakteriích na biotických a abiotických površích a médiích. Bakteriální kontaminace je problémem v některých průmyslových odvětvích a na poli zdravotní péče, konkrétně například dekontaminace potravin a sterilizace potravinových obalů, nebo nozokomiální nákazy způsobené kmeny bakterií rezistentních na antibiotika. CAP je tedy považováno za novou metodu, která by mohla být úspěšně uplatněna při řešení těchto problémů. Naopak jednou z nejnovějších aplikací, kterým je aktuálně věnováno hodně pozornosti je využití plazmatu k selektivnímu ničení rakovinných buněk a nádorů.

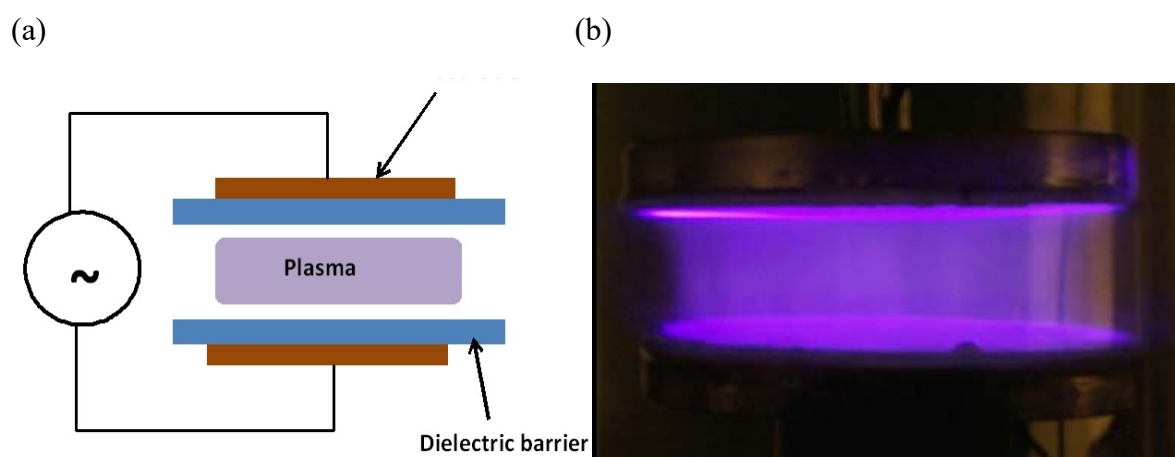


## 1.2 Základní mechanismus biologického účinku CAP

Ze systematických studií vychází, že vliv CAP na biologické buňky je zprostředkován pomocí reaktivních forem kyslíku a dusíku – RONS (reactive oxygen and nitrogen species) (Lu a kol., 2016; Laroussi a kol., 2017). Tyto formy zahrnují hydroxyly (OH), atomární kyslík (O), singletní delta kyslík ( $O_2(^1\Delta)$ ), superoxid ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a oxid dusnatý (NO). Hydroxylový radikál je znám působením peroxidace nenasycených mastných kyselin, ze kterých jsou složeny lipidy tvořící cytoplazmatickou membránu buňky. Biologický vliv peroxidu vodíku je způsoben jeho silným oxidativním účinkem na lipidy, proteiny a DNA (zde způsobuje zlomy vláken DNA). Molekula NO, která v buňce funguje jako messenger a regulátor biologických funkcí je známa vlivem na regulaci imunitních reakcí, buněčné proliferace, vyvolává fagocytózu a reguluje syntézu kolagenu a angiogenezi. 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 (DS) zlomům v DNA 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 nakonec vést k apoptóze rakovinných buněk (Laroussi a kol., 2017). Navíc bylo experimentálně prokázáno, že plazmatem generované RONS mohou skutečně pronikat biologickými tkáněmi až do hloubky více než 1 mm a tedy interagovat nejen s buňkami na povrchu, ale i těmi hlouběji (Duan a kol., 2017). Působení netermálního plazmatu může kromě chemických aspektů, působit také poměrně silným elektrickým polem. 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.

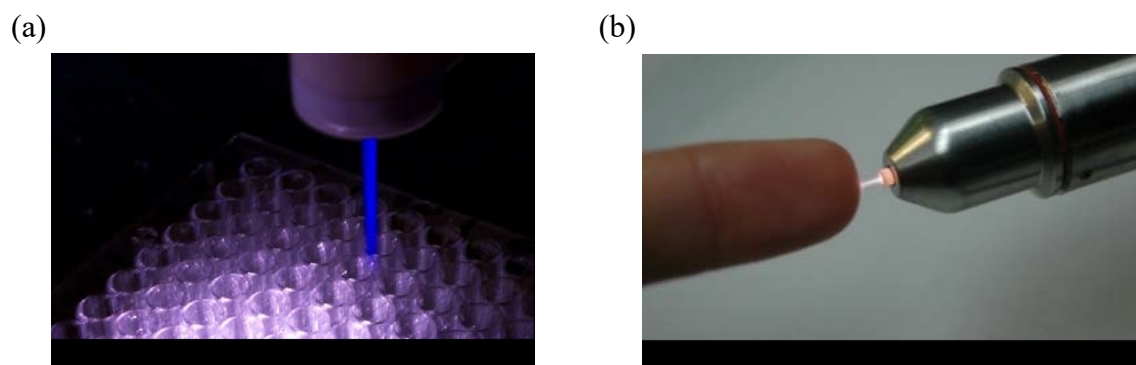
## 2. Zdroje plazmatu pro medicínské účely

Elektrický výboj, nebo plazma, je obecně získáváno aplikací vysokého napětí na aktivní elektrodu za pomoci pracovního plynu např. helia, argonu, neonu, dusíku, kyslíku, vzduchu, či jejich směsi. Dvěma hlavními zdroji používanými ve výzkumu na poli plazmové medicíny je dielektrický bariérový výboj (dielectric barrier discharge – DBD) a nerovnovážný plazmový paprsek generovaný za atmosferického tlaku (plazmový hořák, neboli plazma jet). Na počátcích výzkumu byl používán DBD při experimentech s inaktivací bakterií. DBD využívá deskové elektrody pokryté dielektrikem (např. sklo). Plazma je generováno v prostoru mezi elektrodami pomocí silného sinusového napětí ve frekvenčním rozsahu řádu kHz. Obvykle jsou používány plyny jako helium s příměsí kyslíku či vzduchu. Na obrázku 2 je vidět schéma DBD a fotografie difúzního plazmatu generovaného pomocí DBD za atmosferického tlaku. Plazma jet produkuje oblaky plazmatu (plasma plumes), které se propagují do okolního vzduchu a díky proudícímu plynu směrem od působení elektrod. Reaktivní formy generované plazmatem mohou tedy být snadno transportovány směrem ven z hlavní oblasti kde je plazma vytvářeno a působit na vzdálený cíl (např. tkáň). Tato charakteristická vlastnost činí plazma jet velmi atraktivním nástrojem pro biologické a medicínské aplikace (Weltmann a kol., 2010; Lu a kol., 2016).



Obr. 2 – (a) Schéma a (b) fotografie dielektrického bariérového výboje (DBD) produkujícího difúzní plazma za atmosferického tlaku. Na fotografii vpravo je výboj způsobený vysokým napětím se sinusovým průběhem řádu kHz, použitým pracovním plynem je helium s malou příměsí vzduchu. (Laroussi, 2018)

Byly vyzkoušeny různé metody napájení včetně DC a RF pulzů, nebo mikrovln. Také jsou možné různé konfigurace elektrod (Lu a kol., 2012) od jedné elektrody až po dvě prstencové elektrody obtočené kolem vnější stěny válcového dielektrického trupu a dvě prstencové elektrody připojené k centrálnímu dielektrickému disku. Obrázek 3 znázorňuje fotografie dvou různých zdrojů typu plazma jetu – plazmovou tužku a kINPen, které jsou hojně využívány ve výzkumu na poli plazmové medicíny.

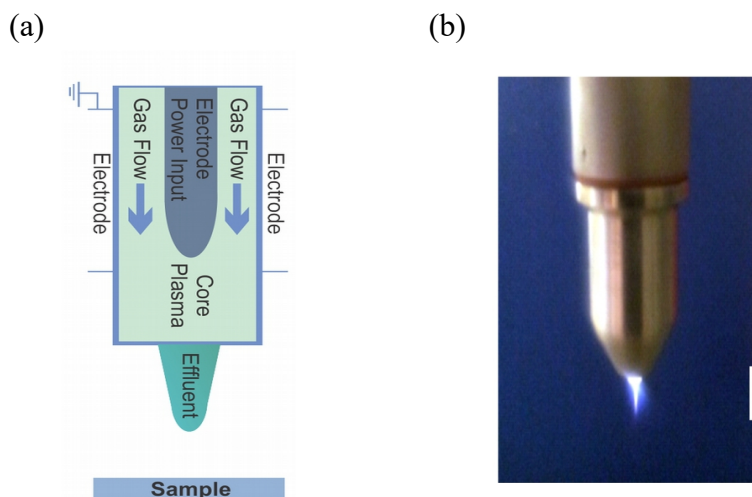


Obr. 3 – Fotografie dvou typů plazma jetu, používaných v různých biomedicínských aplikacích. (b) Plazmová tužka (plasma pencil, ODU, Norfolk, USA) a (c) kINPen (INP, Greifswald, Germany). (Laroussi, 2018)

Později se ukázalo, že oblaky plazmatu emitované plazma jetem 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 20. 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. Dnes panuje obecná shoda, že plazmové kulky jsou řízené ionizační vlny (Lu a kol., 2014).

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 ostatní efekty s celkovou teplotou blízkou okolnímu prostředí. Excitované/ionizované atomy reagují s ostatními atomy pracovního (nebo okolního) plynu, výsledkem je zformování hojného množství RONS, které mají v biomedicíně široké pole využití. Na základě tohoto zjištění bylo všude po světě vyvinuto

mnoho různých plazmových zařízení jako jsou plazma jet 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 20. století bylo schváleno několik CAP zdrojů pro kosmetické a medicínské účely. Příkladem jsou: 2008 US FDA schválila Rhytec Portrait® (plazma jet) pro použití v dermatologii. V US jsou používána i jiná zařízení produkující CAP pro různé medicínské aplikace, např. 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® (plazma jet), znázorněnému na obrázku 4 a také PlasmaDerm® device (CINOGY GmbH) bylo schváleno.



Obr. 4 – (a) Schéma a (b) fotografie komerčně používaného zdroje typu plazma jet - kINPen (Mai-Prochnow, 2015).

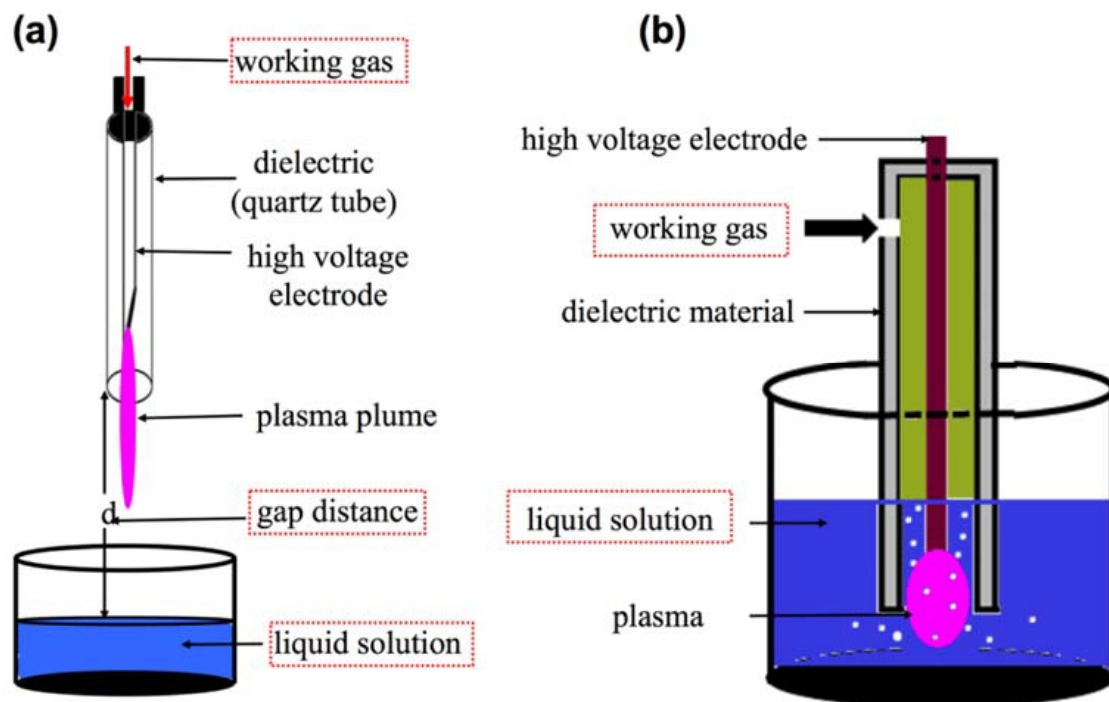
Pokud jsou zdroje plazmatu použity pro biomedicínské aplikace, specifické cíle mohou vyžadovat přímé, nebo nepřímé ošetření. Při přímé léčbě je aktivní výbojová zóna oblaku plazmatu o okolní teplotě v přímém kontaktu s biologickým cílem. Toto může být výhodné pro ošetření silně postižených ran a v podmínkách,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

### 3. Plazmatem aktivované roztoky

Plazmatem aktivované roztoky lze vytvořit např. z biologických tekutých medií, jejich vystavením působení CAP po dobu v řádu minut. Plazmatem generované reaktivní formy molekul a atomů, v těsné blízkosti živného media pro buněčné kultury či vody, 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 jsou takto aktivované roztoky obohaceny o dlouho žijící RONS jako je peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ), dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxyinitridy ( $\text{ONOO}^-$ ) 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. Nespornou výhodou plazmatem aktivovaných roztoků je možnost je dopravit na místa, kde by generace samotného plazmatu nebyla možná, jako jsou malé orgány a těžko přístupné dutiny. Takovýto typ roztoku může posloužit jako léčivo a zdá se, že by mohl být novým slibným nástrojem na poli plazmové medicíny. Též vykazují velmi slibné výsledky v souvislosti se sterilizací živých tkání, koagulací krve, ničením rakovinných buněk, hojení ran, jako desinfekce 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 ani při efektivní dávce nepoškozuje zdravé tkáně. Jejich účinnost závisí na mnoha faktorech jako je exponovaná dávka 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 konvenčního plazma jetu je znázorněn na obrázku 5. Parametry, které mohou měnit charakteristické vlastnosti PAM jsou na obrázku v tečkovaných obdélnících. Hlavní komponentou je pracovní plyn, běžně je používán inertní plyn jako argon, helium, nebo neon. Toto je nutné pro produkci výboje při nižší dodané energii. Do hlavní složky mohou být přidány další plyny jako dusík, kyslík, vodní pára a jejich směsi pro změnu produkovaných reaktivních forem. Dielektrickým materiálem může být křemen, sklo, akryl, nebo teflon a vysokonapěťová elektroda je z vodivého materiálu jako měď, nerezová ocel, nebo stříbro. Tento typ plasma jetu může být provozován za přítomnosti zemnicí elektrody nebo bez ní,

ale bylo zjištěno, že jeho používání je bezpečnější s použitím zemnicí elektrody (Kim a kol. 2015).

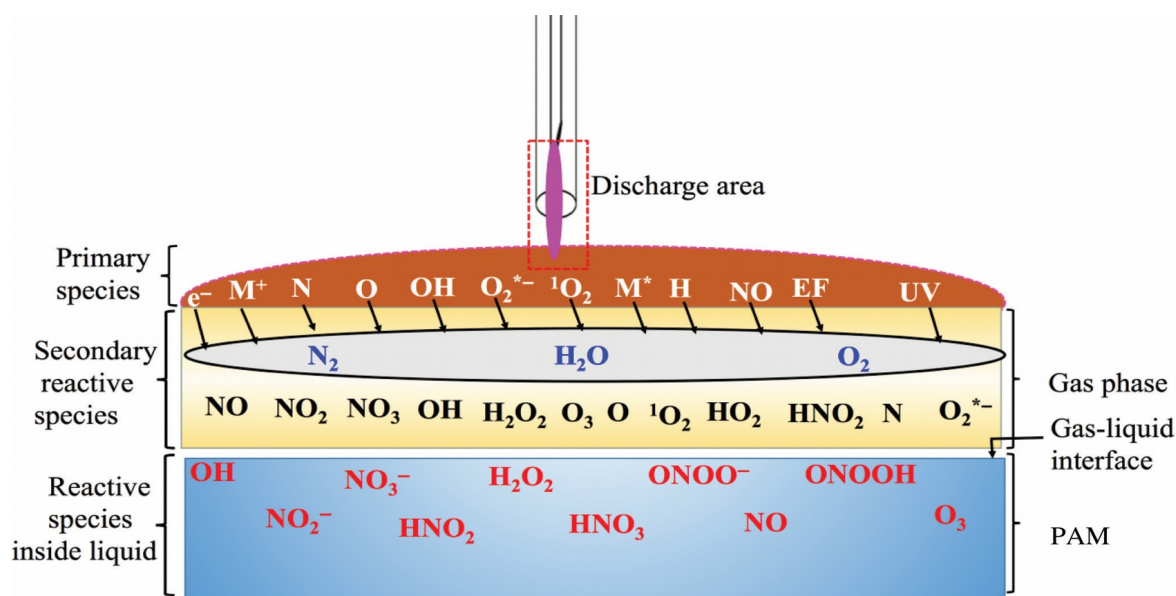


Obr. 5 – Schématický diagram znázorňující metody přípravy PAM pomocí plazmatu (a) vně prostředí tekutiny a (b) uvnitř tekutiny. V tečkovaných obdélníků jsou parametry, které lze měnit pro přizpůsobení charakteristických vlastností PAM (kromě doby působení CAP na roztok a dodané energie zdroje). (Kaushik a kol., 2018)

### 3.1 Chemické základy

Produkce reaktivních forem v plazma jetu je realizováno aplikací vysokého střídavého napětí přes vysokonapěťovou elektrodu. Oblak z plazma jetu má velikost od pár milimetrů do několika centimetrů, je tedy možno ho pozorovat pouhým okem. Dopravit aktivní složky do PAM pomocí plazmatu lze dvěma různými způsoby aplikace: (a) vně tekuté prostředí a (b) uvnitř tekutiny. Schématický diagram těchto dvou metod je ukázán na obrázcích 5a a 5b. Pokud je zdroj plazmatu (typicky plazma jet, viz. obrázek 5) 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/akumulují v roztoku. V podmínkách, kdy dochází k dotyku je plazma v přímém kontaktu s biologickým roztokem. Kromě akumulace reaktivních forem atomů a molekul vzniklých interakcí vzduchu s plazmatem, je zde navíc mnoho dalších reaktivních forem vytvořených interakcí plazmatu s tekutinou. V těchto podmínkách je tedy generace reaktivních forem výrazně umocněna, jelikož excitované/ionizované atomy reagují jak s molekulami okolního plynu, tak s molekulami vody. Na druhou stranu plazma uvnitř tekutého prostředí je obvykle formováno skrze bublinky způsobené proudem plynu (Chen a kol., 2017). Bylo zjištěno, že pro delší časy generace plazmatu v tekutém prostředí je produkováno více RNS a méně ROS (Chen a kol., 2016). Kapalina připravená pomocí jedné z těchto metod může hrát roli bioaktivního roztoku pro řadu využití a je snadnější ji transportovat ke specifickému cíli. Formování aktivních složek v PAM 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, např. 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. 6 – Schéma formování aktivních složek v mediu aktivovaném pomocí konvenčního plazma jetu. (Kaushik a kol., 2018)

Na obrázku 6 je znázorněn schématický diagram formování aktivních složek plazmatu, tj. reaktivních forem, generovaných v oblasti výboje, v plynné fázi a uvnitř tekutiny, pomocí konvenčního plazma jetu. 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 ( $O_2^{\bullet-}$ ), atomový kyslík (O), singletní kyslík ( $^1O_2$ ) a excitovaný dusík (N) jsou produkovány přímo v oblasti výboje díky interakci elektronů s molekulami pracovního plynu, nebo okolního vzduchu. Tyto mají poměrně krátkou dobu života a jejich koncentrace uvnitř 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, např. 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 je peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), dusitany ( $NO_2$ ), dusičnany ( $NO_3$ ) a ozon ( $O_3$ ). Formy generované v plynné fázi mohou přejít do kapalné 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  $HNO_3$ , mimo jiné, může být PAM skladován několik dní a může tedy být převezen i na vzdálená místa, kde plazmové zdroje nejsou k dispozici. Ačkoli PAM vždy obsahuje podobné složky, má široké pole uplatnění. Na příklad  $H_2O_2$  může, v závislosti na jeho koncentraci, efektivně působit apoptózu/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 vypnutí. Deriváty NO, jako dusičnany a dusitany, pomáhají růstu rostlin, čímž rozšiřují možné použití PAM i na zemědělství.

### 3.2 PAM a apoptóza – role RONS

Věří se, že RONS, nebo jejich deriváty obsažené v PAM 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 trvalou reaktivitu PAM. Vychytávání RONS, pozorované u mnoha kmenů nádorových buněk, má za následek poškození buňky. Na druhou stranu, protinádorový efekt PAM může být zcela potlačen díky NAC (N-acetyl cysteine). NAC je široce využívaný jako antioxidant, přímo rozkládá OH,  $H_2O_2$  a kyselinu chlornou ( $HClO$ ), na  $O_2^-$  však nemá vliv. Z toho lze vyvodit, že minimálně jedna z reaktivních forem ovlivňovaných NAC je zodpovědná za PAM vyvolané buněčné poškození. Nicméně OH radikály jsou krátce žijící formy 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  $H_2O_2$ , např. organické peroxidy, 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 PAM do buňky.  $H_2O_2$ -scavenging činidla jako je kataláza, nebo pyruvát výrazně utlumují protinádorový efekt PAM. Jiné formy obsažené v PAM mají však vzhledem k  $H_2O_2$  kooperativní roli, což bylo prokázáno porovnáním s účinky média s přidaným  $H_2O_2$ , které zabíjelo buňky plicního adenokarcinomu méně, než PAM (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 na příklad NO-PAM, kdy se zvyšuje koncentrace NO, probubláváním plynu ve vodě, až na 140  $\mu\text{mol}$ . Rozsáhlá akumulace NO radikálů uvnitř buněk krční nádoru 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  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NO}_2^-$  je navíc do koncentrace tisíců mikromolů, velmi málo toxická pro buňky glioblastomu. Nicméně přidáním  $\text{NO}_2^-$  k  $\text{H}_2\text{O}_2$  do media vzniká synergický efekt, který zvyšuje schopnost zabíjení nádorových buněk  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $\text{NO}_2^-$ , nebo NO radikály a  $\text{H}_2\text{O}_2$  spolu reagují za vzniku peroxynitritu ( $\text{ONOO}^-$ ), který je toxický a napadá důležité makromolekuly v buňce, což by mohlo vysvětlovat pozorovaný synergický efekt. 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, na příklad pyruvát, bude protinádorový efekt PAM menší. Nižší hustota buněk a větší objem PAM vedou k vyššímu procentu poškození buněk. 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 PAM. 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 jinými vědeckými skupinami které ukázaly, že přítomnost FBS v PAM fungovala jako RONS scavenger, proto snižovala protinádorovou aktivitu. Díky scavenging efektu FBS, koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PAM rostla lineárně s dobou ošetření media plazmatem, avšak rostla pomaleji pro media s obsahem FBS v porovnání s medii bez FBS. Koncentrace  $\text{NO}_2^-$  však 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 scavenger efekt na ROS, než na RNS, což by mohlo přispívat k nestabilitě PAM během jeho skladování. Kromě toho in vivo experimenty ukázaly, že objem nádoru nebyl pomocí PAM zcela potlačen, pravděpodobně kvůli rozličným RONS scavengerům 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.

Selektivní mechanismus vůči nádorovým buňkám v prostředí PAM, zprostředkovaný díky RONS, může být vysvětlen z hlediska rozdílných statusů 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 a otázka správné dávky PAM je zde méně důležitá. Naproti tomu nádorové buňky mají specifické metabolické potřeby a více aquaporinů na svém povrchu, než normální zdravé buňky. Nádorové buňky jsou tedy více bezbranné vůči akumulaci intracelulárních RONS.

### **3.3 Mechanismus působení PAM na molekulární úrovni**

Existuje několik studií zaměřených na molekulární mechanismy spojené s protinádorovým efektem PAM. PAM funguje jako donor reaktivních forem pro inhibici, nebo posílení signální dráhy přežití a proliferace v buňce a tedy silně potlačujících karcinogenezi. Dráhy PI3K/AKT a Ras/MARP jsou nacházeny aktivní v nádorových buňkách mozku (glioblastoma), po jejich ošetření PAM byly obě dráhy nalezeny omezené. Toto by mohlo též vysvětlovat selektivní efekt PAM, vzhledem k tomu, že v nich obsažené reaktivní formy napadají signální dráhy které jsou aktivovány speciálně v nádorových buňkách. Jelikož tyto dvě dráhy úzce souvisí a proliferací nádorových buněk a inhibicí apoptózy, jejich omezení může vyvolávat řízenou smrt nádorové buňky. Reaktivní formy přítomné v PAM mohou způsobovat poškození struktury DNA porušením vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi. Tento typ oxidace DNA je také spjat se zvýšenou tvorbou 8-hydroxy-20-dexyguanosine a aktivací poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), což má za následek snížení obsahu ATP uvnitř buňky, vedoucí k buněčné smrti (Kumar a kol., 2016).  $H_2O_2$  produkovaný kvůli PAM způsobené mitochondriální dysfunkci může působit jako spouštěč v apoptotické signální dráze. Mitochondrie hraje stěžejní roli v buněčné apoptóze díky uvolňování proapoptotických faktorů, jako je apoptózu indukující faktor (AIF) a cytochrom c. Aktivací PARP-1 dochází k uvolnění AIF z mitochondrií, doprovázeného formováním poly(ADP-ribózy) (PAR) a vyčerpáním nicotinamide adenin dinukleotidu ( $NAD^+$ ). AIF uvolněné z mitochondrie putují do jádra, spouští kondenzaci chromatinu a způsobují rozsáhlá poškození jádra. Pokud jsou mitochondrie poškozené a jejich membránový potenciál je snížený, propustnost membrány vzrůstá a umožňuje výtok AIF a tedy další přesun AIF do jádra, což vyvolává kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a nakonec apoptózu buňky. Ošetření PAM tedy aktivuje PARP-1, vyvolává tvorbu

PAR v buněčném jádře, akumulaci AIF obklopující jádro a vyčerpání celkového množství NAD<sup>+</sup> v nádorové buňce. Nicméně tento poškozující efekt může být potlačen pomocí PAPR-1 inhibitorem, což jen potvrzuje, že PAM aktivuje právě tuto dráhu a následně způsobuje mitochondriální dysfunkci. Mimoto PAM výrazně zvyšuje počet vápníkových iontů (Ca<sup>2+</sup>) a tedy spouští stresovou apoptotickou dráhu endoplazmatického retikula (ER), což je potvrzeno pozorováním zvýšené exprese ER stresových markerů (Adachi a kol., 2015). Ačkoli komplexní síť mechanismů interakce PAM s buňkou je stále třeba objasnit, výše popsaná zjištění poskytují významný vhled do vnitrobuněčných molekulárních mechanismů vedoucích k PAM zprostředkované apoptóze nádorových buněk. To je potřeba především k porozumění selektivnímu efektu při zabíjení buněk a molekulárním mechanismům, nutnému k budoucí klinické aplikaci PAM.

### **3.4 Vliv na zdravé buňky**

PAM má však i jiné pozitivní vlastnosti, než je způsobování buněčné apoptózy u většiny nádorových buněk. Důležitá je jeho izolace chemických efektů (RONS) v aktivovaném mediu, oddělených od přímého efektu ostatních činidel v plazmatu, jako jsou např. nabitě částice, UV záření a teplo. Také je možné PAM uchovat pro pozdější využití. Tyto objevy rozšířily aplikaci CAP indukované terapie v podobě PAM tam, kde jsou nádorové terapie spojeny s nechtěnými vedlejšími efekty kvůli poškození zdravých tkání. Ve vztahu k dalšímu medicínskému využití je velmi důležité porozumět interakci mezi plazmatem a normálními, zdravými buňkami. 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 ošetření plazmatem nezpůsobuje žádné poškození kůže a všimli si, že jeho selektivní efekt je vysoce závislý na dávce, tedy době vystavení plazmatu. Normální buňky tudíž mohou vydržet mírnou úroveň oxidativního stresu, ovšem do určitého limitu, delší čas expozice nevyhnutelně způsobí jejich těžké poškození. Ošetření PAM může být zodpovědné za i 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). Bylo prokázáno snížení životaschopnosti buňky, morfologie a migrace, dva dny

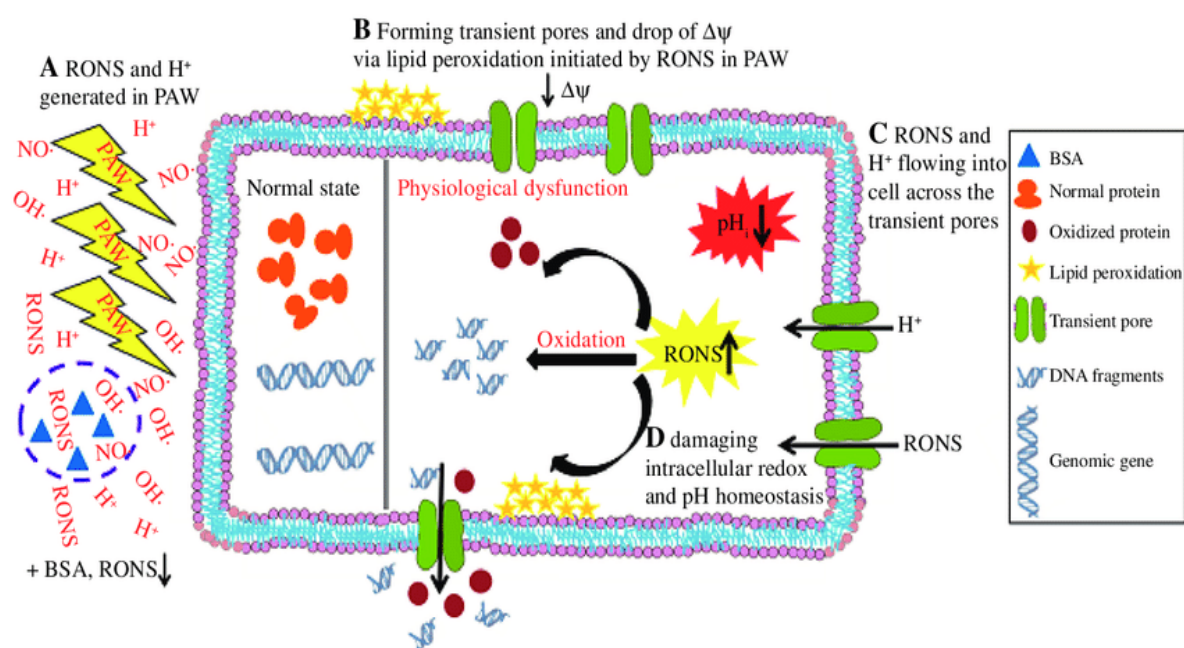
po ošetření MDCK buněk pomocí PAM. Imunobarvení v jádře MDCK buněk potvrzuje utlumení buněčné proliferace. Kultivace jaterních nádorových buněk (HepG2) a normálních buněk jater (L02) v mediích ošetřených plazma jetem po různě dlouhé intervaly, ukazuje u monokultur pokles v adhezenci buněk s rostoucí 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. Výzkumy ukazují, že neadherující (non-adherent) nádorové buňky přechází do stavu apoptózy spíše než do stavu nekrózy, bez výrazných změn hodnoty pH v PAM (Duan a kol., 2017). To může být připisováno zvýšené koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$  (594  $\mu\text{mol}$ ) a NO (29  $\mu\text{mol}$ ) při ošetření plazmatem 10 minut. PAM jsou též známy potlačováním choroidální neovaskularizaci u myší, což by mohl být nový terapeutický koncept pro věkem podmíněnou makulární degeneraci (Ye a kol., 2015). 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.

Vitamín C je hlavním antioxidantem přítomným v naší základní stravě a jeho množství rychle klesá s věkem, proto i jeho redukční potenciál klesá a je nutné ho ve vyšším věku přijímat v potravinových doplňcích. Studie na genomické úrovni ukázaly ochrannou a antioxidantní roli CAP ve vodném mediu (Kurita a kol., 2014). PAM obsahují z velké části vodu a mají vysoký redukční potenciál (-250 mV do 300 mV), což z nich dělá hlavní scavenging činidlo aktivního kyslíku. Normální voda obsahuje shluky 10 – 13 molekul  $\text{H}_2\text{O}$ , v PAM jsou tyto shluky menší, 5-6 molekul. Elektrolýza vody v PAM způsobuje mírnou zásaditost a zároveň snižuje velikost shluků molekul zhruba na polovinu (Santos a kol., 2013). Díky elektrolýze způsobené ošetřením plazmatem se v tekutém mediu generuje více aktivních vodíků a má nižší povrchové napětí než má běžná kohoutková voda. Díky nižšímu povrchovému napětí se PAM (zásaditá, ionizovaná voda) snadněji absorbuje pomocí osmózy do buňky. PAM rychle prostupuje tělem a poskytnutím elektronů aktivnímu kyslíku blokuje oxidaci biologických molekul a tím jim umožňuje normálně fungovat bez oxidačních poškození.

## 4. Desinfekce a ošetřování ran

Existuje mnoho prací referujících o schopnosti CAP efektivně dezinfikovat širokou řadu mikroorganismů včetně bakterií, plísní, virů, bakteriálních spor a biofilmu (Kolb a kol., 2008; Pan a kol., 2013). Klíčovými inaktivačními činiteli při přímém působení plazmatu na mikrobiální buňky jsou ROS, jako je  $O$ ,  $OH$  a  $^1O_2$ , způsobující poškození DNA a proteinů, tento oxidativní stres má za následek poškození buňky a následně její smrt (Zhang a kol., 2012). PAW získaný vystavením sterilní destilované vody plazmovému oblaku obloukového výboje může inaktivovat bakterie a kvasinky v jejich planktonické i adherentní formě (Kamagang-Youbi a kol., 2007). Plasma jetem aktivovaná voda byla úspěšně použita k desinfekci bakterií jako *B. Subtilis* (Sun a kol., 2012), *S. Aureus* (Shen a kol., 2016) a dalších jiných. Schopnost PAM inaktivovat přisedlé bakterie (Gram pozitivní a gram negativní) potvrzuje mnoho publikací a je připisována přítomnosti  $H_2O_2$  spolu s kyselým pH dusitanů a dusičnanů (Kamagang-Youbi, 2007). 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 je  $H_2O_2$  nejdůležitější z ROS, nicméně  $OH$ ,  $O$  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, např.  $NO$  a jeho deriváty vznikající při kontaktu s vodou, např.  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  a  $ONOOH$  (Laroussi, 2005). Kromě toho produkce RNS též hraje dominantní roli v acidifikaci PAW. Co se týče účinnosti PAW, Kamgang-Youbi a kol. (2008) zjistili, že pro reprezentativní zástupce gram pozitivních a gram negativních bakterií je ošetření pomocí PAM úspěšnější v desinfekci adherentních buněk než planktonických. Účinnost PAW závisí na typu mikroorganismu (efektivněji působí na bakterie než na kvasinky) a na produkovaných RONS, závislých na pracovním plynu, typu výboje, času působení na vodu, okolním prostředí, délce skladování, atd. Vliv plazmatu na vodu spočívá hlavně ve změně pH a elektrické vodivosti, díky čemuž je dosaženo důležitého oxidačního potenciálu. Chemické pozadí vzniku PAW bylo podrobněji popsáno výše, obecně vytváří kyselé roztoky s pH cca 2-3, obsahující  $H_2O_2$ ,  $NO_2$  a  $NO_3$  anionty (Oehmigen a kol., 2010). Takto kyselý roztok efektivně zabije bakterie v suspenzi, pokud však pH překročí hodnotu 3-4, antibakteriální efekt značně klesne. Na obrázku 7 je vidět sterilizační mechanismus

PAW pro *S. Aureus*, jak ho popsal Zhang a kol., (2016). Kumulace RONS uvnitř buňky lze docílit dvěma způsoby. Nejreaktivnější a nejtoxičtější z RONS (především OH) mohou působit peroxidaci lipidů fosfolipidové dvojvrstvy buněčné membrány, což vede k zesíťování (cross-linking) bočních řetězců mastných kyselin a k formování přechodných pórů, následované zprůchodněním buněčné membrány 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  $H^+$  z PAW, sníží se pH. Intracelulární RONS oxidují DNA a způsobují její fragmentaci, reagují s proteiny, lipidy a sacharidy a mění jejich molekulární strukturu a chemické vazby. Extrémní snížení pH a přítomnost RONS v buňce ničí redoxní a pH homeostázu a nakonec ústí ve fyziologické dysfunkce a buněčnou smrt.

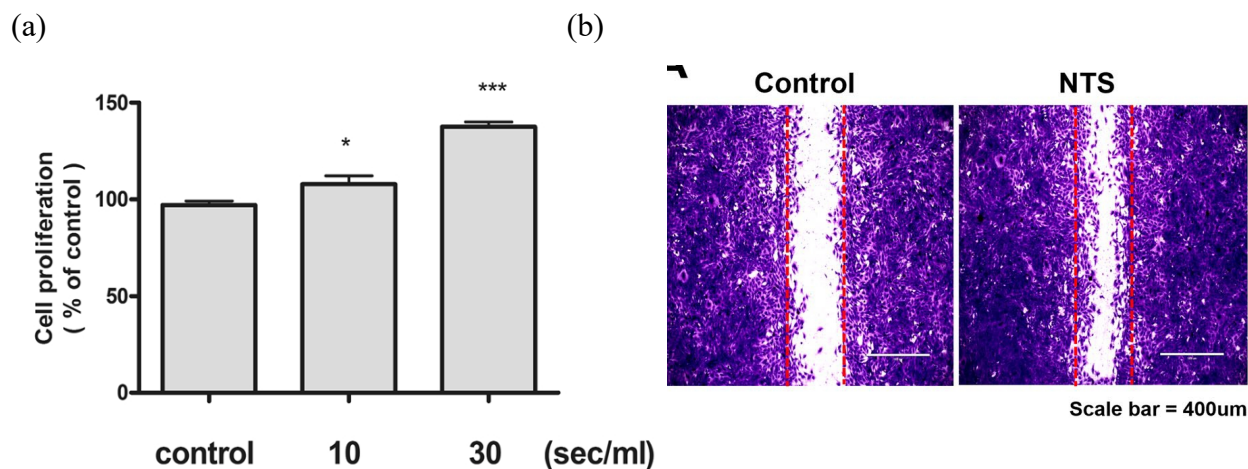


Obr. 7 – Schématický diagram plazmatem způsobené apoptózy, rozdělený do čtyř stádií. (Zhang a kol., 2016)  
 (A) Vznik RONS a kyselé pH PAW. (B) Zprůchodnění a depolarizace buněčné membrány způsobené reakcí RONS s lipidovou dvojvrstvou. (C) Akumulace ROS a snížení pH v buňce. (D) Poškození DNA a následná fyziologická disfunkce způsobená narušením redoxní a pH homeostázy.

Správná a rychlá regenerace tkáně je důležitá pro hojení po chirurgických zákrocích, nebo jiném poškození. CAP a plazmatem aktivované roztoky nepůsobí tepelné poškození tkáně (dosahují teplot cca 40°C) a podněcují jak hojení kožních poranění, tak regeneraci epiteliálních tkání. Jejich další důležitou vlastností je protizánětlivý, sterilizační a hemokoagulační efekt. Hemostáza – zacelování rány, je soubor současně probíhajících a navzájem se ovlivňujících dějů, které vedou k zastavení krvácení. Těmito ději je vazokonstrikce (reakce cév v místě poškození), činnost krevních destiček a srážení krve (hemokoagulace). Srážení krve je kaskádou enzymatických reakcí aktivujících potřebné enzymy a výsledkem je tvorba sítě z fibrinových vláken, do které se zachycují krevní buňky. PAW usnadněná koagulace krve je novou metodou, která je velmi efektivní při zastavování tekoucí krve při chirurgických operacích (Miyamoto a kol., 2016). PAW vyvolává tvorbu eosinofilní, vláknité, membránovité struktury, která překryje ránu, což se neděje při přirozené koagulaci (Ikehara a kol., 2013). Zánětlivé procesy po ošetření PAW, nebo tepelným koagulatorem byly zviditelněny pomocí radiofarmak 2-deoxy-2-[18F] fluoro-D-glukopoznanosa (18F-FDG) a bylo ukázáno, že první způsob je méně zánětlivý (Ueda a kol., 2015). Analýza elektronovým mikroskopem též odhalila přítomnost roztříštěných fibroblastů v kůži ošetřené elektrokoagulací, v kůži ošetřené PAW však fragmenty přítomny nebyly (Akimoto a kol., 2016). Ošetření rány plazmatem se tedy jeví méně invazivní, než elektrokoagulační. Imunoelektronovou mikroskopií byla též pozorována přítomnost galektinů v blízkosti membránovité struktury, vytvářené při ošetření plazmatem, 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. 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 8a 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 8b. Migrace byla znatelně zvýšena po ošetření plazmatem aktivovaným roztokem.



Obr. 8 – Plazmatem aktivované roztoky zvyšují proliferaci a migraci bronchiálních epiteliálních 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 NTS (CAP aktivovaným roztokem) a kontrolní skupiny. (Ho-Ryun a kol., 2018)

Dále bylo zjištěno, že epidermální růstový faktor (EGF) je klíčovým faktorem v hojení nosní sliznice. Plazmatem ošetřený roztok pozitivně ovlivňuje aktivitu tohoto faktoru, což naznačuje jeho souvislost se zvýšenou buněčnou proliferací a migrací. Aktivace EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) signální dráhy během hojení kožní rány způsobuje buněčnou migraci. Bylo prokázáno, že plazmatem ošetřený roztok podporuje migraci buněk zvýšením EMT signalizace. Na zvířecím modelu byla 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).

## 5. Diskuze a závěr

Z předkládané rešerše jsou patrné pozitivní vyhlídky, co se týče využití CAP, PAW, PAM a jiných aktivovaných roztoků v různých odvětvích biologie a medicíny, od sterilizace a ošetřování ran, až po plazmovou onkologii. Je však také zřejmé, že i přes čím dál lepší vhled do mechanismů účinku CAP a plazmatem aktivovaných roztoků na buňky a biologické tkáně, stále není úplně jasné co přesně se zde odehrává. To je dáno obrovskou komplexností a provázaností dějů a také velkým množstvím možností volby typu buněk, druhu zdroje CAP, doby ošetření a složení roztoku, atd. Též podmínky experimentu se mohou lišit na různých pracovištích (vlhkost a složení vzduchu, atd.). Navzdory tomu je vzhledem k získaným výsledkům nezpochybnitelné, že CAP a jím ošetřené roztoky mají pozitivní vliv na hojení ran na kůži i sliznici (podporují buněčnou proliferaci a migraci a hemokoagulaci), desinfekci a deaktivaci bakterií (díky nízkému pH a působení oxidativního stresu bakteriálních buněk) a působení apoptózy nádorových buněk (díky vyšší citlivosti buňky na oxidativní stres a aktivitě určitých typických signálních drah).

Z celé této škály možných využití CAP v medicíně bylo pro praktickou část diplomové práce, navazující na tento výzkumný úkol, vybráno použití plazmatem aktivované vody k léčbě onkologických lézí. V případě, kdy má pacient nehojící se rány není možné nasadit chemoterapeutickou léčbu, jelikož ta ze svého principu hojení brzdí, proto by využití dekontaminace rány pomocí plazmatem aktivované vody mohlo být zde velmi nápomocné. Dále v případě paliativní léčby se podporou hojení lézí může značně zvýšit kvalita života pacienta. K tomuto účelu je navázána spolupráce s ústavem radiační onkologie v nemocnici na Bulovce. Voda byla vybrána jelikož příprava PAW není příliš složitá a je možné ji provádět přímo na místě. Aplikace bude prováděna na vhodných pacientech, kde není schválení použití této metody příliš náročné a zdlouhavé, tedy u pacientů s těžce paliativní léčbou. Bude též provedena in vitro studie na bakteriálních kulturách odpovídajících mikrobiálnímu osídlení onkologických lézí, pro určení nejefektivnějších podmínky ošetření vody plazmatem. Půjde tedy o seznámení se s klinickou problematikou onkologických lézí na konkrétních pacientech kde by aplikace PAW byla použitelná a o stanovení postupu a parametrů při ošetření vody plazmatem z in vitro experimentů.

## 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 mitochondrial nuclear 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 low temperature plasma: comparison with treatment by electrical coagulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 605, 86–94.

Boehm, D., Curtin, J., Cullen, P.J., and Bourke, P. (2017). Hydrogen peroxide and beyond—the potential of high-voltage plasma-activated liquids against cancerous cells. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 17, DOI: 10.2174/1871520617666170801110517. (Epub ahead of print).

Duan, J., Lu, X., and He, J. (2017). The selective effect of plasma activated medium in an in vitro co-culture of liver cancer and normal cells. *J. Appl. Phys.* 121, 013302.

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., Obrušnik, 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.

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.

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 N<sub>2</sub> species concentrations. *Phys. Plasmas* 24, 073502.

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.

Chen, Z., Lin, L., Chen X., Gjika E., and Keidar, M. (2016). Effects of cold atmospheric plasma generated in deionized water in cell cancer therapy. *Plasma Process. Polym.* 13, 1-6.

Chen, Z., Krasik, Y., Cousens, S., Ambujakshan, A., Corr, C., and Dai, X. (2017). Generation of underwater discharges inside gas bubbles using a 30-needles-to-plate electrode. *J. Appl. Phys.* 122, 153303.

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.

Kamgang-Youbi, G., Herry, J.M., Bellon-Fontaine, M.N., Brisset, J.L., Doubla, A., and Naitali, M. (2007). Evidence of temporal postdischarge decontamination of bacteria by gliding electric discharges: application to *Hafnia alvei*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4791–4796.

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.

Kim, Y., Jin, S., Han, G., Kwon, G., Choi, J., Choi, E., Uhm, S., and Cho, G. (2015). Plasma apparatuses for biomedical applications. IEEE Trans. Plasma Sci. 43, 944.

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.; 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.
- 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.
- 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.

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.

Shen, J., Tian, Y., Li, Y., Ma, R., Zhang, Q., Zhang, J., and Fang, J. (2016). Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures. *Sci. Rep.* 6, 28505.



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.

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.

[26] 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.

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 O<sub>2</sub> 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.

