



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE DISTRIBUCE AKTIVNÍCH ČÁSTIC GENEROVANÝCH NÍZKOTEPLNÍM PLAZMATEM NA POVRCHU BIOPOLYMERŮ

OPTIMIZATION OF DISTRIBUTION OF ACTIVE PARTICLES GENERATED BY LOW TEMPERATURE PLASMA
ON BIOPOLYMER SURFACES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Krupičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1890/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lucie Krupičková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace distribuce aktivních částic generovaných nízkoteplotním plazmatem na povrchu biopolymerů

Zadání diplomové práce:

1. Seznamte se s principy generace aktivních částic v nízkoteplotním plazmatu
2. Nastudujte metody stanovení vybraných aktivních částic
3. Realizujte ošetření povrchů biopolymerů plazmatem za rozdílných podmínek
4. Nalezněte optimální podmínky aplikace plazmatu na povrchy s ohledem na vybrané druhy aktivních částic

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Lucie Krupičková
studentka

prof. RNDr. František Krčma,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Předložená diplomová práce se zabývá hledáním optimálních parametrů distribuce aktivních částic, které jsou generovány nízkoteplotním plazmatem, na povrchu biopolymerů. Teoretická část se zaměřuje na charakteristiku plazmatu a jeho aktivních složek. Jsou zde uvedeny možné aplikace plazmatu v medicíně a potravinářském průmyslu a také přehled modelů umělé kůže. Poslední kapitoly teoretické části se věnují popisu anatomie kůže a stručnému přehledu mikroorganismů *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermidis*.

V rámci experimentální části byly nejdříve připraveny biopolymery s obsahem barviv pro detekci reaktivních částic přítomných v plazmatu. Následně byly biopolymery podrobeny bodovému ošetření plazmatem při různých podmínkách. U všech biopolymerů došlo při správných podmínkách po ošetření k barevné změně, což je důkazem přítomnosti aktivních částic. Byl proveden také experiment, při kterém došlo k průchodu UV záření, ale byl zamezen styk aktivních částic s obarveným biopolymerem. Experiment potvrdil, že za změnu barvy biopolymerů jsou skutečně zodpovědné aktivní částice, a ne UV záření. Následně byly nalezeny optimální parametry distribuce aktivních částic po celé ploše biopolymeru. Získané parametry byly dále využity při ošetření agarových ploten s jednotlivými kulturami *C. glabrata*, *E. Coli*, *S epidermidis* a se směsnou kulturou *C. glabrata* + *E. Coli*. Při ošetření byly použity dva různé výboje, a to pochodňový s přímým přívodem plynu a mikrovlnný s povrchovou vlnou. Ošetřené vzorky byly po inkubaci nafoceny. Počítačový program Aurora vyhodnotil plochu agarových ploten, která je pokryta danou kulturou. Na základě těchto dat byl vyhodnocen inhibiční účinek ošetřených kultur ve srovnání s neošetřenými. Při použití pochodňového výboje s přímým přívodem plynu došlo k mnohem vyššímu inhibičnímu účinku než při použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou u všech 4 zkoumaných vzorků.

Klíčová slova

Plazmový výboj, plazma za atmosférického tlaku, nízkoteplotní plazma, biopolymery, distribuce aktivních částic, účinek inhibice

Abstract

This thesis is focused on the optimization of the distribution of active particles (RONS), generated by the low temperature plasma, on the biopolymer surfaces. The theoretical part characterizes plasma and its active particles. Furthermore, this chapter summarizes its applications in medicine and food industry, also a review of different skin models is listed here. The last section is focused on the skin anatomy and the characterization of selected microorganisms *C. glabrata*, *E. coli* and *S. epidermidis*.

In the experimental part, selected biopolymers with specific dyes for detection of active particles were prepared. Furthermore biopolymers were spot treated under different conditions leading to color changes in all biopolymers. This test confirmed a presence of active particles in the plasma. After that, the optimal parameters for active particles distribution over the entire surface were found. Also an experiment, which allowed the UV light to pass through but prohibited the passage of active particles, was made. In this experiment, no color change was noticed, which means, that the reaction of active particles with the colored biopolymer is responsible for the color change. The optimized parameters were used for treatment of agar plates with monoculture of *C. glabrata*, *E. coli*, *S. epidermidis* and with mixed culture *C. glabrata* + *E. coli*. Two different plasma torches were used – unipolar microwave discharge torch and surface wave microwave discharge jet. Treated samples were photographed after incubation. Software Aurora then calculated the surface area which was covered by the microbial culture. Based on the data, the microbial reduction was evaluated in comparison with untreated samples. The unipolar microwave discharge torch achieved higher efficiency than the surface wave microwave discharge jet, for all tested microorganisms.

Key words

Plasma discharge, atmospheric pressure plasma torch, low-temperature plasma, biopolymers, active particles distribution, inhibitory effects

KRUPÍČKOVÁ, Lucie. *Optimalizace distribuce aktivních částic generovaných nízkoteplotním plazmatem na povrchu biopolymerů*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148351>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce František Krčma.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. RNDr. Františku Krčmovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Stejně tak i konzultantkám Ing. Kateřině Smejkalové a Ing. Kristíně Trebulové za trpělivost, vstřícnost a příjemnou atmosféru v laboratoři. Poděkování patří také Janu Hrudkovi za pomoc při zpracovávání dat inhibičního účinku.

Dále bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia. V neposlední řadě patří dík mému partneru Petrovi, který mi byl velkou oporou od samého začátku až do úplného konce.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Plazma.....	10
2.2	Aktivní složky plazmatu	10
2.2.1	Reaktivní formy kyslíku	11
2.2.2	Reaktivní formy dusíku.....	12
2.3	Využití nízkoteplotního plazmatu.....	13
2.3.1	Využití nízkoteplotního plazmatu pro hojení ran	14
2.3.2	Antibakteriální působení plazmatu	14
2.3.3	Využití plazmatu ve stomatologii	15
2.3.4	Aplikace plazmatu pro transdermální podávání léčiv.....	15
2.4	Plazmatem ošetřená voda	16
2.4.1	Využití PAW v potravinářském průmyslu.....	17
2.4.2	Využití PAW v zemědělském průmyslu.....	17
2.5	Anatomie kůže	17
2.5.1	<i>Epidermis</i> – pokožka.....	18
2.5.2	<i>Dermis, corium</i> – škára	19
2.5.3	<i>Tela subcutanea</i> – podkožní vazivo.....	19
2.5.4	Barva kůže	19
2.6	Fyzikální modely umělé kůže	20
2.6.1	Kapalné suspenze.....	20
2.6.2	Želatinové substance	20
2.6.3	Elastomery	21
2.6.4	Epoxidové pryskyřice	21
2.6.5	Kovy.....	21
2.6.6	Textilie	22
2.7	Rány.....	22
2.7.1	Chronické rány	22
2.7.2	Hojení.....	23
2.8	Barviva využitá pro detekci aktivních částic plazmatu	24
2.8.1	Indigo	24
2.8.2	Jodid draselný	25

2.8.3	Test pro stanovení dusičnanů a dusitanů	25
2.9	Mikroorganismy	25
2.9.1	<i>Candida glabrata</i>	25
2.9.2	<i>Escherichia coli</i>	25
2.9.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
3	Experimentální část	26
3.1	Použité přístroje a pomůcky	26
3.2	Použité chemikálie	26
3.3	Příprava biopolymerů	27
3.3.1	Příprava biopolymeru na bázi agaru s barvivem indigo	27
3.3.2	Příprava biopolymeru na bázi agaru s KI	27
3.3.3	Příprava biopolymeru na bázi agaru s testem pro stanovení dusičnanů	27
3.3.4	Příprava biopolymeru na bázi agaru s testem pro stanovení dusitanů	27
3.4	Využití 3D stolu k optimální distribuci aktivních částic plazmatu na povrchu biopolymerů	27
3.4.1	Bodová aplikace plazmatu na biopolymery	28
3.4.2	Celoplošná aplikace plazmatu na biopolymery pomocí 3D stolu	29
3.4.3	Optimalizace vzdálenosti plazmového výboje od povrchu biopolymeru	29
3.5	Působení plazmatu na biopolymery přes křemenné sklo	30
3.6	Příprava vzorků s mikroorganismy	30
3.6.1	Příprava očkovacího inokula	30
3.6.2	Příprava kultivačního média	31
3.6.3	Kultivace mikroorganismů	32
3.6.4	Působení plazmatu na mikroorganismy	32
3.6.5	Vyhodnocení mikrobiálního poklesu	32
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Optimalizace přípravy biopolymeru na bázi agaru	33
4.2	Reakce plazmového výboje s biopolymery s přidanými barvivy	34
4.2.1	Bodové ošetření biopolymerů s indigem	34
4.2.2	Bodové ošetření biopolymerů s jodidem draselným	36
4.2.3	Bodové ošetření biopolymerů s detekcí dusičnanů	38
4.2.4	Bodové ošetření biopolymerů s detekcí dusitanů	39
4.3	Důkaz interakce aktivních částic plazmatu s biopolymery	40

4.4	Celoplošné plazmatické ošetření biopolymerů	41
4.5	Optimalizace vzdálenosti plazmového výboje od povrchu biopolymeru.....	44
4.6	Celoplošné plazmatické ošetření mikrobiálních kultur	45
5	Závěr	51
6	zdroje.....	53
7	Seznam použitých zkratk.....	58
8	Přílohy	59
8.1	Souřadnice pohybu mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu	59
8.1.1	Bodového ošetření Petriho misky Ø 55 mm	59
8.1.2	Bodové ošetření Petriho misky Ø 90 mm	59
8.1.3	Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 55 mm	59
8.1.4	Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm	60
8.2	Souřadnice pohybu mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou	61
8.2.1	Bodového ošetření Petriho misky Ø 55 mm	61
8.2.2	Bodového ošetření Petriho misky Ø 90 mm	61
8.2.3	Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm	61
8.2.4	Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm	62

1 ÚVOD

V dnešní době vykazuje stále více patogenních mikroorganismů resistenci, na již známé léčebné procesy. Proto jsou neustále vyvíjeny snahy o to najít nové metody léčby. Jednou z takovýchto možností je využití nízkoteplotního plazmatu.

Plazma je známé jako čtvrté skupenství hmoty, které se běžně vyskytuje v přírodě například ve formě blesku nebo polární záře. V medicíně se, ale využívá nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku. To je tvořeno celou řadou aktivních složek, mezi které patří UV (ultrafialové) záření, elektrony a elektrické pole, reaktivní formy kyslíku (mezi které patří ozón, hydroxylový radikál, peroxid vodíku, singletový kyslík, superoxidový anion a další) a reaktivní formy dusíku (dusičnany, dusitany a další). Tyto aktivní složky jsou zodpovědné za širokou škálu biochemických reakcí v organismech. Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) reagují s patogenními mikroorganismy na které mají inhibiční efekt. Vzhledem k rozdílné struktuře bakteriálních a lidských buněk, nedochází při plazmatickém ošetření k narušení zdravé tkáně. Mezitím, co jsou patogenní buňky inaktivovány, tak lidské buňky si stále zachovávají svou aktivitu. Tato skutečnost otevírá dveře pro použití v řadě medicínských oborů jako je dermatologie, stomatologie, podávání léčiv a další.

Nízkoteplotní atmosférické plazma nezpůsobuje termické reakce v ošetřovaných materiálech. Z toho důvodů je možné jej využít také v potravinářském průmyslu, kdy po ošetření potravin nedochází ke změně struktury potravin nebo k negativním vedlejším účinkům chemicky agresivních látek.

I když se plazma zdá být vhodným řešením léčby pro pacienty s komplikovanějším onemocněním je potřeba ještě udělat více studií, aby byla detailně prozkoumána jeho vysoká účinnost a také, aby byly vyvráceny veškeré negativní účinky, než bude jeho použití zavedeno do běžné praxe.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plazma

Pojem plazma představuje čtvrté skupenství hmoty. Dodáním energie plynu je způsobena jeho ionizace, což vede ke vzniku plazmatu. Charakteristickou vlastností plazmatu je jeho kvazineutralita. Jedná se o jev, který popisuje zdánlivou neutralitu náboje, kdy se množství záporně nabitých částic téměř rovná počtu kladně nabitých iontů. Důležitým aspektem je také přítomnost volných nosičů elektrického náboje, díky čemuž je plazma elektricky vodivé. Vykazuje také kolektivní chování, což znamená, že reakce celku je závislá na každé částici v plazmatu [1].

Plazma se na základě ionizace dělí na slabě a silně ionizované, nebo na základě teploty na nízkoteplotní a vysokoteplotní plazma. Pokud v plazmatu převládá koncentrace nabitých částic, tak se jedná o silně ionizované plazma. V takovém případě dochází hlavně k srážkám nabitých částic. Stupeň ionizace plazmatu ovlivňuje také fyzikální vlastnosti. Rozdělení plazmatu se váže ke střední energii částic. Tato definice je ovšem pouze formální a není nijak spjata s fyzikálními vlastnostmi, které by jasně označovaly hranici. Je-li střední energie částic vyšší než 100 eV, mluvíme o vysokoteplotním plazmatu. Tomu odpovídá teplota vyšší než 1 MK a jedná se vždy o silně ionizované plazma. Teplota elektronů u nízkoteplotního plazmatu se pohybuje v rozmezí 10^4 – $5 \cdot 10^4$ K, ale teplota molekul neutrálního plynu a kladných iontů se pohybuje v rozmezí 20–200 °C [2].

2.2 Aktivní složky plazmatu

Chemicky aktivní plazma představuje více složkový systém, který je vysoce reaktivní kvůli velké koncentraci nabitých částic, excitovaných atomů a molekul, aktivních atomů a radikálů a UV fotonů. Každá složka hraje významnou roli v plazmochemické kinetice [3].

Významnou součástí některých biochemických reakcí je přenos elektronů mezi reaktanty. Příkladem jsou reakce mezi kyslíkem a jinými látkami, acidobazické reakce, iontové reakce a reakce volných radikálů. Při biochemické reakci známé jako oxidativní fosforylace dochází k syntéze makroergní molekuly ATP. Tento proces probíhá v mitochondriích a je řízen termodynamicky upřednostňovaným přenosem elektronů na kyslík. Kyslík s elektrony následně reagují s atomy vodíku za vzniku vody. Někdy může být tato reakce označována jako řetězec přenosu elektronů [1].

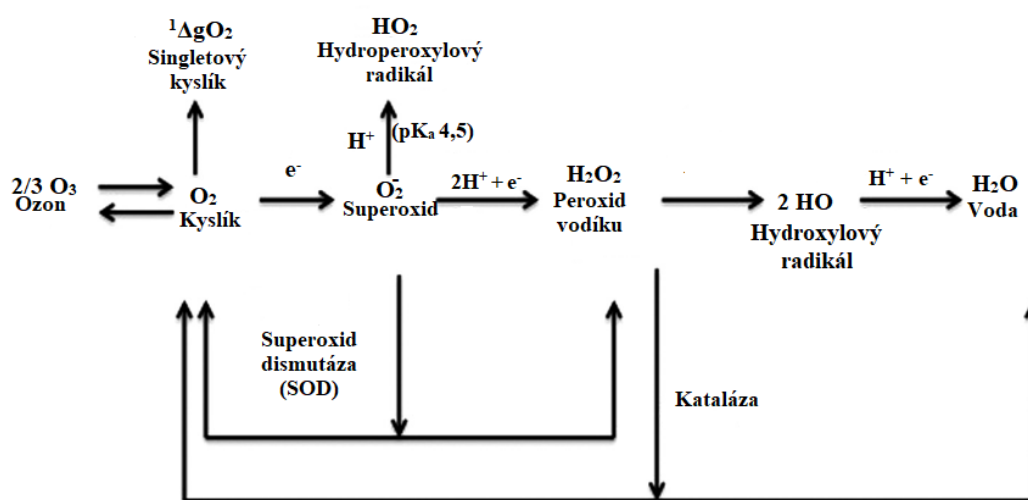
Řetězec může propustit elektrony, které reagují s rozpuštěným O_2 za vzniku superoxidového aniontu (O_2^-). Ten je důležitým zdrojem speciálního druhu reaktivních forem kyslíku. Superoxidový anion je součástí chemických látek nazývaných radikály nebo volné radikály, které mají jeden nebo více nespárovaných valenčních elektronů.

Jsou to nestabilní částice lehce reagující s jinými látkami. Mohou vznikat porušením kovalentní vazby (sdílení elektronů). To je způsobeno vysokými teplotami, absorpcí elektromagnetické radiace a řadou různých chemických reakcí [4]. V plazmatu je energie elektronů velmi vysoká a vlivem srážkových procesů s atomy a molekulami dochází i ke zvýšení disociace, excitace a ionizace a vzniku volných radikálů [5].

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku

Obecně se dá říct, že za poškození biomolekul *in vivo* mohou reaktivní formy kyslíku (ROS) v procesu známém jako oxidační stres. Na biochemickou přeměnu kyslíku na vodu je možno nahlížet jako na sérii reakcí přenosu elektronů. Přidáním jednoho elektronu k molekulárnímu kyslíku vzniká superoxidový anion O_2^- . Kyslík (O_2) může být přeměněn také na ozón (O_3). K tomu je potřeba dostatek energie k disociaci O_2 na atomy. Ozón může vznikat i při různých přírodních procesech jako je fotolýza v atmosféře nebo při výbojích v blesku [4].

Reakce O_2 s elektronem a dvěma protony (H^+ ionty) poskytne peroxid vodíku (H_2O_2), který může být při správných podmínkách rozštěpen na vodu a hydroxylový radikál [4]. Tvorba jakýchkoliv ROS je nezbytně nutná pro život a mechanismy ochrany před jejich toxickými účinky jsou dynamicky vyváženy [6].



Obrázek 1: Přenosy elektronů mezi různými formami kyslíku [4]

2.2.1.1 Superoxidový anion

Redukce kyslíku poskytuje superoxidový anion ($O_2^{\bullet -}$), který je vysoce reaktivní. Je vnímán jako silné oxidační činidlo a iniciátor radikálových reakcí. Je vysoce nestabilní, podle experimentů je stabilní pouze do teploty 348 K. V aprotických rozpouštědlech působí jako vynikající nukleofil, ale ve vodě žádnou takovou reaktivitu nevykazuje, což je pravděpodobně způsobeno silnou solvatací a spontánní disproportionací [6].

Biologicky může být produkován buďto skrz mitochondriální dýchací řetězec nebo fagocytární nikotinamid adenindinukleotid fosfát oxidázy. Jedná se o vedlejší produkt buněčného dýchání a je zásadní složkou obranného systému. Je využit v řadě biochemických reakcí, jako je proteinová denaturace nebo lipidová peroxidace. Za normálních okolností biologický systém produkuje enzym superoxid dismutázu (SOD), který udržuje koncentraci $O_2^{\bullet -}$ na optimální úrovni. Zvýšená koncentrace $O_2^{\bullet -}$ souvisí s nemocemi jako Parkinsonova choroba nebo rakovina [6].

Superoxidový anion může být definován jako částice odvozená od kyslíku, která je potenciálně cytotoxická a způsobuje poškození DNA. Kromě toho je superoxidovému anionu připisováno mnoho patologických účinků, proto několik vědců doporučilo použití SOD k jeho potlačení při

léčbě určitých degenerativních nemocí. Navzdory tomu je $O_2^{\bullet -}$ zásadní biologickou signální molekulou s významnými antibakteriálními účinky [6].

2.2.1.2 Hydroxylový radikál

OH^{\bullet} radikály se skládají z vodíku vázaného na kyslík, díky čemuž jsou vysoce reaktivní a vyhledávají atomy vodíku z jiných molekul, které by na sebe mohly navázat [7]. V živých organismech patří hydroxylový radikál a superoxidový radikál mezi dvě hlavní reaktivní formy kyslíku, které se tvoří nepřetržitě v procesu redukce kyslíku na vodu [8].

Jedná se o silné oxidační činidlo poškozující organické sloučeniny. Při nadměrné produkci může být škodlivý pro buňky. Reakce oxidačního stresu mohou mít řadu nepříznivých účinků [9]. V blízkosti DNA s ní reaguje, vznikají purinové a pyrimidinové produkty a ty způsobují poškození DNA [10]. Oxidační síla OH^{\bullet} může být příznivě využívána například při čištění odpadních vod, kdy hydroxylové radikály reagují se znečišťujícími látkami jako jsou organické a anorganické sloučeniny a pomáhají inhibovat mikroorganismy [7], [9].

2.2.1.3 Peroxid vodíku

Oxidační reakce mohou být způsobeny také neradikálovou cestou prostřednictvím peroxidu vodíku [8]. Peroxid vodíku je důležitý pro chemické aplikace, biologické funkce, domácí a terapeutické využití, včetně použití jako antimikrobiální a oxidační činidlo. Díky své vysoké reaktivitě má schopnost poškozovat buněčné makromolekuly, včetně proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Například peroxidace lipidů je proces, při kterém kyslíkové radikály reagují s nenasycenými mastnými kyselinami ve fosfolipidech buněčných membrán za vzniku peroxyradikálu, který následně může reagovat s jinými mastnými kyselinami nebo proteiny. Antimikrobiální účinek peroxidu vodíku je krátkodobý, a je omezen pouze na povrchovou aplikaci, protože nedochází k penetraci tkáně [10].

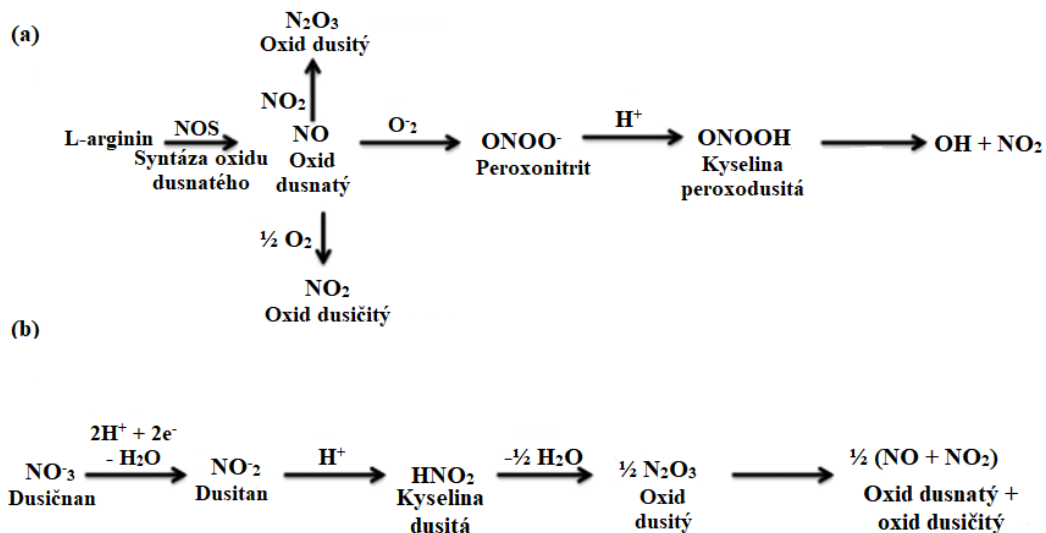
V přítomnosti tranzitních kovů (Cu^+ , Fe^{2+}) se peroxid vodíku fentonovou reakcí štěpí na vysoce reaktivní $2 OH^{\bullet}$ [11].

2.2.1.4 Singletový kyslík

Singletový kyslík představuje elektronicky excitovanou formu kyslíku. Jde o vysoce reaktivní látku, která interaguje s biologickou tkání za účelem její oxidace. Rychle a bez rozdílu může reagovat s různými biologickými materiály, jako jsou proteiny, nenasycené lipidy nebo nukleové kyseliny. Bylo prokázáno, že při obraně buněk před bakteriemi dochází pomocí protilátek nebo aminokyselin k přeměně singletového kyslíku na ozón [12], [13].

2.2.2 Reaktivní formy dusíku

Další důležitou třídou reaktivních částic jsou reaktivní formy dusíku. Na obrázku 2 jsou vybrané reakce RNS, kdy v části (a) je popsána enzymatická syntéza klíčového oxidu dusnatého. V části (b) jsou znázorněny další klíčové reakce zahrnující NO_x , kdy oxid dusnatý může vzniknout z prvotního dusičnanu, který je redukován na dusitan. Dusičnany vstupují do krevního řečiště člověka prostřednictvím různých potravin. Mohou být redukovány na dusitany pomocí symbiotických bakterií žijících na jazyku. Dusitany jsou také přítomny například v lidském potu a mírně kyselé prostředí kůže uvolňuje určité množství NO , čímž chrání před mikrobiální infekcí [4].



Obrázek 2: Přenosy elektronů mezi různými formami dusíku [4]

2.2.2.1 Oxid dusnatý

Volný radikál oxid dusnatý (NO^\bullet) je zodpovědný za velkou škálu biologických funkcí. Váže se například na hemové železo rozpustného enzymu guanylátcyklázy (sGC), čímž podporuje jeho aktivaci a funguje tak jako signální molekula. Podobně jako H_2O_2 je i NO^\bullet nezbytný pro homeostázu buněk a organismů, protože využitím druhých posílů mohou reaktivní částice regulovat hlavní fyziologické a patofyziologické funkce [14].

2.2.2.2 Peroxynitrit

Jedná se o oxidační činidlo s velmi krátkou dobou života. Je významným stimulatorem buněčné smrti a je produkován reakcí oxidu dusnatého a superoxidového radikálu. Předpokládá se, že místa tvorby peroxydusitanu jsou prostorově propojeny se zdroji superoxidu (plazmatické membrány nebo mitochondriální respirační komplexy). Vystavení živého systému peroxidusitanu může mít nepříznivé účinky na životaschopnost a funkci jeho buněk. Může způsobit například oxidaci deoxyribózy a přetržení vláken DNA [15].

2.3 Využití nízkoteplotního plazmatu

Plazma je v technologiích využíváno už delší dobu, například při výrobě televizních obrazovek nebo zářivek. Na základě antibakteriálních vlastností se využívá také při sterilizaci zdravotnických prostředků nebo balení potravin. Vývoj nízkoteplotního plazmatu umožňuje jeho použití i v medicíně [16].

Zatímco se v minulosti využívaly tepelné vlastnosti plazmatu ($>80^\circ\text{C}$) – kauterizace, sterilizace žáruvzdorných nástrojů, kosmetické a rekonstrukční zákroky, dnešní výzkum je zaměřen především na netepelné účinky plazmatu. Aplikace nízkoteplotního plazmatu vede k různým reakcím ve tkáni, a to bez poškození zdravé tkáně. Na těchto efektech se podílí reaktivní formy kyslíku a dusíku, nabitě částice, elektrická pole nebo i záření v oblasti UV(C) [16].

2.3.1 Využití nízkoteplotního plazmatu pro hojení ran

Experimenty prokazují, že je možné využít nízkoteplotní atmosférické plazma (CAP) k účinnému, bezkontaktnímu a bezbolestnému ošetření ran, aniž by došlo k poškození zdravé tkáně. Je prokázáno že nízkoteplotní plazma působí různě na bakteriální buňky a buňky pokožky. Po aplikaci plazmatu mohou být bakteriální buňky inaktivovány, ale kožní buňky si stále zachovávají svou vysokou aktivitu [16], [17]. Tato lišící se aktivita je založena na rozdílech v buněčném metabolismu v přítomnosti reaktivních částic (RONS). Eukaryotické buňky vykazují ochranu před RONS, zatímco prokaryotické buňky takový ochranný mechanismus nevykazují [18]. Plazma ovlivňuje velkou řadu biochemických procesů, a proto umožňuje aplikaci individuálně navržených lékařských látek. V dermatologii se tak otvírají nové možnosti pro hojení ran a popálenin, regeneraci tkání, terapii kožních infekcí a mnoho dalších nemocí [16].

Velkou výhodou je, že při použití CAP není nutné brát v úvahu alergické nebo toxické reakce. Jedná se o neinvazivní aplikaci, která umožňuje ošetření tepelně citlivých nehomogenních povrchů nebo živých tkání. Studie na buněčných kulturách dokazují, že plazma ovlivňuje hojení ran snížením pravděpodobnosti bakteriální infekce, ale taky přímým účinkem na epidermální a dermální buňky [16].

CAP podporuje hojení ran svými antimikrobiálními účinky a aktivaci kožních buněk, jako jsou fibroblasty, keratinocyty a melanocyty, aktivací biologických receptorů a stimulací nebo regulací imunitních buněk. Studie ukazují, že počty kolonií bakterií, které jsou zodpovědné za chronické rány, byly při působení CAP sníženy za méně než 60 s a zcela dezinfikovány za více než 120 s. Další využití CAP v dermatologii je při léčbě popálenin a dekubitních ran [19], [20]. Pro správné využití CAP pro léčbu ran je důležité nastavení optimálního výkonu, teploty plazmatu, řízení vstupního napětí a vzdálenosti od povrchu plazmového zařízení [19].

Nízkoteplotní plazma se v poslední době používá také nepřímo při ošetření krycího materiálu. Alginátové krytí na rány ošetřené plazmatem prokázalo silné antiseptické a antibakteriální vlastnosti proti rezistentním mikrobům [21].

2.3.2 Antibakteriální působení plazmatu

Každý den dochází v nemocnicích a jiných zdravotnických pracovištích k různým chirurgickým zákrokům. Chirurgické nástroje, které jsou během těchto úkonů použity, přichází do kontaktu s tkání nebo sliznicí pacienta, a jsou tak spojeny se zvýšeným rizikem zavlečení patogenů do těla pacienta. Sterilizace je definována jako proces úplné eliminace nebo zničení všech forem mikrobiálního života (tj. vegetativních i spórových forem), který se provádí různými fyzikálními a chemickými metodami, kdežto dekontaminace je snížení počtu mikroorganismů v daném objemu nebo na daném povrchu [22]. Pokud by byly zdravotnické nástroje špatně sterilizovány, hrozí také možnost přenosu infekce z pacienta na pacienta (např. virus hepatitidy B). Velké množství infekcí bývá způsobeno použitím kontaminovaných endoskopů. Z těchto důvodů je potřeba zabezpečit adekvátní dekontaminační techniky pro lékařské nástroje [23].

V současné době se stále častěji objevují multirezistentní patogeny, pro které je k dispozici pouze málo léčebných postupů [22]. Proti takovýmto patogenům je možné použít například

dekontaminaci plazmatem, což je metoda vhodná pro inaktivaci patogenů na povrchu lékařských a dentálních zařízeních [23].

Za antibakteriální působení plazmatu jsou zodpovědné její aktivní složky, mezi které patří radikály, nabitě částice, ROS, RNS, UV záření a elektrické pole. ROS a RNS vykazují silné oxidační účinky na vnější buněčnou strukturu. Působení ROS na buněčné úrovni může vést k peroxidaci lipidů, poškození DNA, modulaci proteinů a buněčné smrti organismů. Zásadní roli při protržení vnější buněčné stěny hrají také nabitě částice. Elektrostatická síla vytvořená nahromaděním náboje na vnější buněčné membráně překoná její pevnost a dojde k vytvoření pórů, čímž se změní permeabilita membrány. Doposud nebylo prokázáno, že by multirezistentní bakterie byly vůči tomuto účinku odolné [24].

2.3.3 Využití plazmatu ve stomatologii

Paradentóza je onemocnění, které postihuje podpůrné zubní tkáně a je hlavní příčinou ztráty zubů v dospělém věku. Je známo, že jsou do tohoto onemocnění zapojeny bakterie *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*. Při zkoumání působení plazmatu proti tomuto onemocnění došlo ke snížení počtu bakterií a k opětovnému propojení tkáně [25], [26].

Endodontická infekce (zánět zubních kořenových kanálků) se vyskytuje v systému zubního kořenového kanálku. Primární endodontické infekce jsou způsobeny polymikrobiálními biofilmy, kde převládají aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. Léčba endodontické infekce zahrnuje odstranění zbytků vitálních nebo nekrotických tkání a odstranění mikroorganismů v systému kořenového kanálku. Dezinfekce kořenových kanálků je považována za stěžejní bod této terapie. I proti tomuto onemocnění je možné využít plazmatického ošetření, jehož cílem je eliminovat patogenní mikroorganismy a zabránit reinfekci. Je možné také použít plazmatem ošetřenou vodu (PAW) s význačnými antibakteriálními vlastnostmi, jako vhodný endodontický výplach [25].

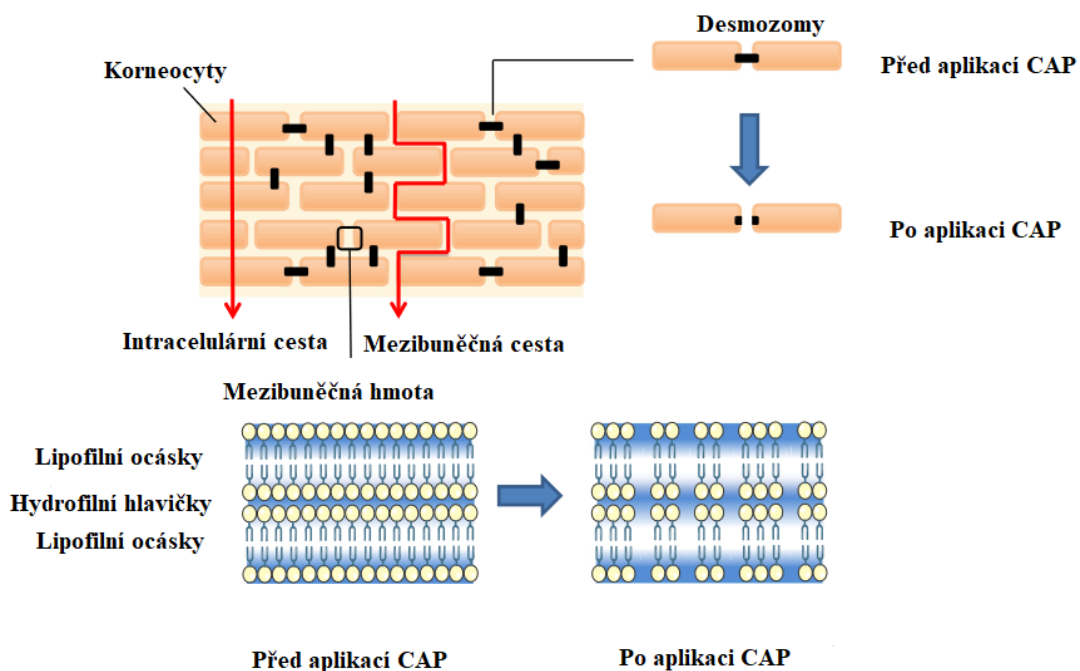
Kariózní zubní tkáň je obvykle odstraněna pomocí rotačních nástrojů, které mohou pacientovi způsobit bolest, a proto je snaha najít jiné řešení, jak ji odstranit. Pro svou antimikrobiální účinnost se zdá být plazma vhodné pro použití v kariologii (obor zabývající se zubním kazem). Vědci dospěli k závěru, že nízkoteplotní plazma představuje účinnou techniku, která podporuje dezinfekci nepravidelných struktur a kanálků uvnitř zubu. Generované RONS pronikají do dentálních kanálků a inhibují kariogenní mikroorganismy. Kromě toho má plazma tu výhodu, že inhibuje mikrobiální biofilmy bez toho, aby poškodila normální tkáň [27]. Tato metoda léčby umožňuje také řídit vlhkost demineralizovaných povrchů dentinu, zlepšit penetraci adheziva a mechanické vlastnosti na rozhraní adhezivo/dentin [25], [28].

2.3.4 Aplikace plazmatu pro transdermální podávání léčiv

Transdermální podání léčiv spočívá v aplikaci na kůži a jeho následné difuzi jejími strukturami do cévního řečiště. Absorpce je tedy založena na penetraci léčiva vrstvou kůže, která je zodpovědná za bariérovou funkci. Tato skutečnost je znázorněna na obrázku 3. Mezi výhody transdermálního podání patří: cílené podávání léčiv, nižší systémová expozice a nižší toxicita ve srovnání se systémovým podáváním. Jedná se o nejpoužívanější aplikaci léčivých látek v dermatologii [18].

Bylo vyvinuto několik chemických a fyzikálních technik pro zlepšení penetrace. Patří mezi ně i působení nízkoteplotního plazmatu. Po ošetření části pokožky plazmatem, dochází k transepidermální ztrátě vody, což vede k přechodnému narušení kožní bariéry. Působením CAP dochází také ke zvýšení smáčivosti, což je běžně využíváno v povrchových úpravách materiálu [29]. To způsobuje lepší absorpci léčiv i s vyšší molekulovou hmotností, které normálně prochází kožní bariérou jen velmi obtížně. Mezi důvody, proč k tomu dochází, patří například interakce aktivních částic nízkoteplotního plazmatu s lipidovou maticí pokožky, vytvoření oxidovaných derivátů mastných kyselin, což způsobuje permeabilitu kůže, peroxidaci lipidů a následné vytvoření pórů nebo poškození těsného spojení keratinocytů [18].

Všechny pozorované efekty jsou přechodné povahy, kdy dochází k vytvoření dočasných kanálků nebo pórů, které se během několika minut uzavřou. Je známo, že UV záření je zodpovědné za nástup celé řady kožních onemocnění. To, které je produkováno plazmatem, je absorbováno odumřelými buňkami keratinocytů na povrchu pokožky, přes které se nedostane do hlubších vrstev k živým buňkám. Proto není pro zdraví kůže nijak nebezpečné. Kromě toho může způsobit také reverzibilní modifikace lipidů, což napomáhá ke změně permeability kůže [18], [30].



Obrázek 3: Bariérová funkce pokožky

2.4 Plazmatem ošetřená voda

Působením nízkoteplotního plazmatu na vodu za atmosférického tlaku dochází ke vzniku plazmatem ošetřené vody (PAW). Ta si v posledním desetiletí získala pozornost díky svému netepečnému a netoxickému působení [31].

Plazmová úprava vody vytváří kyselé prostředí, které má za následek změny redoxních potenciálů, vodivosti a tvorbu RONS. Se zvyšující se dobou ošetření PAW se její pH snižuje v závislosti na použití zdroje CAP. V důsledku toho se PAW svým složením liší od běžné vody.

Z toho důvodu může sloužit jako alternativní metoda mikrobiální dezinfekce, anebo účinná kontrola růstu bakterií. Její výhodou je snadná aplikace roztoku [32].

Existují 2 hlavní přístupy pro generování PAW. Jeden využívá interakci plynného plazmatu s roztoky (nad hladinou), zatímco druhý zajišťuje přímé generování plazmatu v kapalině. Chemické a reakční procesy PAW se výrazně liší v závislosti na metodě přípravy [33].

Uplatnění plazmatem aktivované vody v lékařství je teprve na počátku. V dnešních době ale přibývá stále více seriózních studií, kde je PAW uplatněna v příbuzných oborech [31], [34], [35].

2.4.1 Využití PAW v potravinářském průmyslu

Zkažení potravin je problémem potravinářského průmyslu, kdy kvůli ztrátě trvanlivosti dochází k ekonomickým ztrátám. Zkažené potraviny končí na kompostech a ve spalovnách, což vede k nadměrnému plýtvání potravinami. To je problém, který negativně ovlivňuje životní prostředí. Dalším úskalím potravinářského průmyslu je otrava jídlem v důsledku růstu bakterií v potravinách. Stále rostoucí populace poukazuje na potřebu inovativních přístupů k výrobě a zpracování potravin [31].

Většina studií antimikrobiálních vlastností plazmatu byla provedena při aplikaci plynového plazmatu přímo na potraviny, aby se dosáhlo maximální účinnosti mikrobiální inaktivace. Někteří výzkumníci uvádějí přítomnost negativních účinků, jako je ztráta barvy nebo změna topografie povrchu. K překonání těchto problémů by mohla být aplikována PAW, která slouží jako antimikrobiální roztok. Omytí syrových produktů hned po sklizni patří mezi zásadní součást programu pro prodloužení trvanlivosti potravin [32].

2.4.2 Využití PAW v zemědělském průmyslu

Další potenciální aplikací PAW je její použití pro zlepšení klíčení semen a vývoje rostlin. Mezi hlavní důvody ztráty výnosu plodin patří úmrtí semene v důsledku kontaminace a delší doba klíčení. Po aplikaci PAW bylo prokázáno, že došlo ke zvýšení rychlosti klíčení, a také zvýšení počtu vyklíčených semen. Spolu s hormony se RONS podílejí na několika signálních drahách zapojených do klíčení [32].

Amoniak a dusičnany jsou převládajícími zdroji dusíku absorbovaného rostlinami pro svůj růst z půdy. Generované dusičnany v PAW mohou sloužit jako alternativní zdroj dusíku pro rostliny. Bylo prokázáno, že ředkev pěstovaná v PAW byla o 100 mm delší než ředkve v kontrolních skupinách [32].

Přestože má PAW negativní vliv na mikrobiální kontaminanty, není tomu tak u rostlinných buněk. Důležitou roli hraje složení a tloušťka buněčné stěny. Bakteriální buněčná stěna je vytvořena z peptidoglykanu, který prochází membránovou lipidovou peroxidací, zatímco stěny rostlinných buněk jsou vyrobeny z celulózy a hemicelulózy, které jsou odolné vůči reaktivním částicím přítomným v plazmatu. To vše vede k rozdílné elektrické vodivosti buněčných membrán a smrti mikroorganismů [32].

2.5 Anatomie kůže

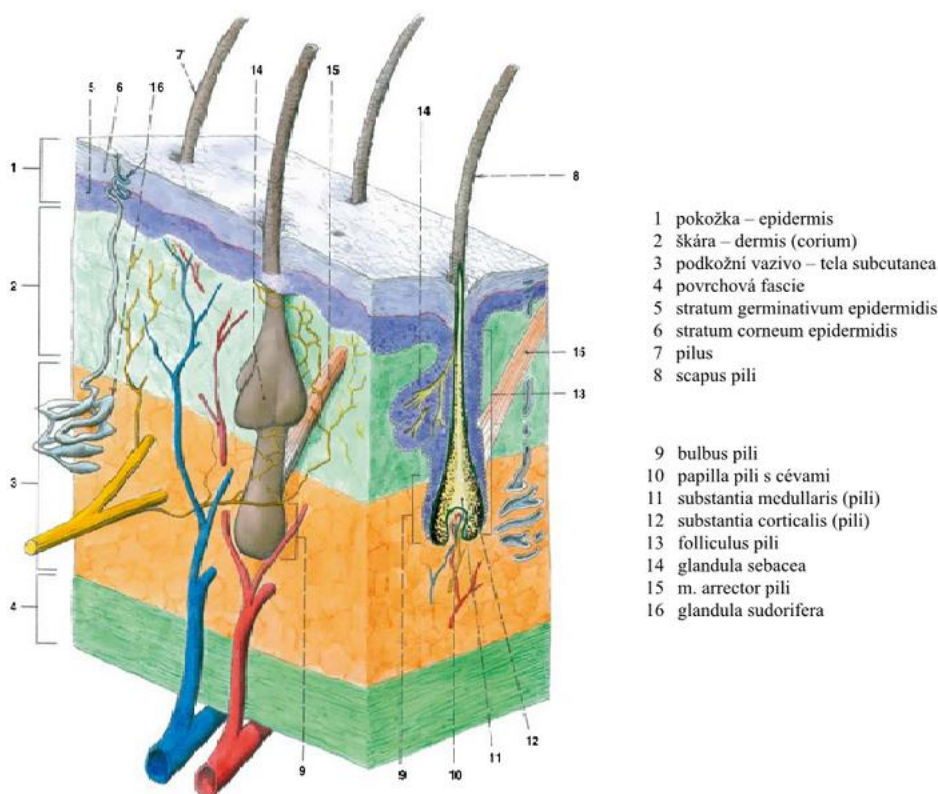
Kůže, *cutis*, je nejrozsáhlejší plošný orgán, který představuje zevní povrch organismu. Tvoří bariéru mezi organismem a jeho okolím. Její stavbu můžeme vidět na obrázku 4. Účinně chrání před fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými škodlivinami z prostředí. V důsledku

uspořádání cévního řečiště, žláz a tím, že se jedná o špatný vodič tepla, zajišťuje kůže termoregulaci. K ovládní tepelných ztrát využívá potních žláz (skrz odpařování) a změny průtoku krve v cévním řečišti [36].

Kůže se podílí na látkové výměně skrz dýchání (i když se jedná u savců o malý efekt, přesto ho nemůžeme zanedbat) a sekreční orgány, které představují potní a mazové žlázy. Obsahuje také imunokompetentní buňky, které spolupracují s imunitním systémem. Je důležitým zdrojem vitamínu D, který vzniká po ozáření sluncem z prekursoru tokoferolu nacházejícího se v kůži. Pomocí mimických svalů se z ní stává prostředník pro vyjádření psychiky jedince. Melanin zabraňuje průniku ultrafialového záření. Pomocí nervových receptorů přenáší styk s okolním prostředím [36], [37].

Celková plocha, kterou kůže pokrývá, se v průměru pohybuje okolo 2 m². Tloušťka kůže se může lišit v závislosti na tom, kde se nachází, ale pohybuje se v rozmezí od 0,5 mm do 4 mm. Nejtenčí kůže se vyskytuje na očích víčkách a nejtlustší na zádech. Hmotnost se obvykle pohybuje okolo 3 kg, vyskytují se však extrémní případy, kdy je kůže zesílena tukovým polštářem a dosahuje hmotnosti až 20 kg [36].

V pokožce se nachází volná nervová zakončení vnímající bolest, a ve škáře jsou přítomny opouzdrěná nervová zakončení, která vytváří terminální nervová tělíska (Krauseova – vnímání chladu, Ruffiniho – vnímání tepla, Vater-Paciniho – vnímání tlaku a tahu) [36].



Obrázek 4: Stavba kůže [36]

2.5.1 *Epidermis* – pokožka

Struktura pokožky je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem a je ektodermálního původu. Dělí se na povrchovou vrstvu a zárodečnou vrstvu [36].

Povrchová vrstva (*stratum corneum*) je složena z postupně se zplošťujících, zrohovatělých, odumírajících buněk, které obsahují kreatin. Buňky se postupně odlupují a jsou nahrazovány novými, které vznikají v zárodečné vrstvě. Vrstevnatý epitel tvoří do určité výšky *stratum germinativum* [36], [37].

Zárodečnou vrstvu (*stratum germinativum*) tvoří cylindrické buňky a polymorfni buňky s cípovými výběžky zplošťující se směrem k povrchu. Mimo vlastních buněk keratinocytů jsou zde obsaženy také melanocyty (obsahují hnědý pigment melanin, může z nich vznikat zhoubný nádor melanom), Langerhansovy buňky (jsou schopné fagocytózy) a Merkelovy buňky (mechanoreceptory). Součástí pokožky jsou také útvary, které z ní vznikají, a to chlupy, nehty a kožní žlázy [36], [37].

2.5.2 Dermis, corium – škára

Jedná se o vazivově elastickou vrstvu kůže mezenchymového původu, která je bohatě prokrvená. Povrchová vrstva (*stratum reticulare*) vybíhá ve vyvýšené papily. Těch si můžeme všimnout na prstech, dlaních a chodidlech, kde vytvářejí individuální znaky, díky kterým můžeme jednotlivé osoby identifikovat. Hlubší vrstva (*stratum reticulare*) je tvořena svazečky kolagenních a elastických vláken, která mají určitý směr a udávají tím štěpitelnost kůže. Tento jev je využíván v chirurgii při vedení řezu, protože se lineární jizva hojí podstatně lépe [36], [37].

2.5.3 Tela subcutanea – podkožní vazivo

Spojuje kůži s povrchovou fascií. Jeho složení je závislé hlavně na výživě, ale z velké části je tvořeno převážně tukem. U mužů se tuk ukládá hlavně na břicho, kdežto u žen, které mají tukové tkáně relativně více, se ukládá na horních částech stehen, hýždích a prsech. Jedná se o skladiště zásobních látek s ochrannou a izolační funkcí při termoregulaci. Na některých místech se vyznačuje také mechanickou funkcí (tukové výplně na dlaních) [36], [37].

2.5.4 Barva kůže

Je závislá na mnoha faktorech, jako je tloušťka kůže, hustota prokrvení nebo množství pigmentu. Melanin bývá přítomen ve formě drobných zrněk v buňkách hlubších vrstev epidermu. Dodává kůži nažloutlou až temně hnědou barvu. Množství pigmentu není stálé a mění se s věkem, kdy kůže novorozence je mnohem méně pigmentovaná než kůže dospělého člověka. Další vliv na barvu kůže má také prokrvení, které přidává červenou složku [36].

2.6 Fyzikální modely umělé kůže

Pro sledování interakcí mezi různými materiály a kůží se řadu let využívali živí i zemřelí lidé, zvířata nebo rostliny. Takovéto studie byly velice nápomocné pro zlepšení charakterizace kůže. Používání těchto metod ovšem vyvolává značné etické otázky, a navíc dochází k vysoké variabilitě výsledků z důvodu různých povah vzorků. V dnešní době jsou využívány komerčně dostupné buněčné kultury simulující kůži. Navzdory pokroku studia buněčné kultivace *in vitro*, mají tyto modely kůže svá omezení. Jedním z nich jsou například fyzikální vlastnosti, které se nepodobají vlastnostem pravé kůže. Dalším omezením je náročnost těchto modelů na skladování a manipulaci. Z těchto důvodů se častěji používají modely založené na biologicky neaktivních materiálech, které jsou nazývány jako *fyzikální modely kůže*. Jedná se o neživé materiály nebo fyzikální systémy, které jsou schopny zreprodukovat vlastnosti, funkce nebo chování pokožky. Fyzikální modely kůže byly vyvinuty pro potřeby testování, kalibrace a kontroly kvality zařízení [38].

Při vývoji umělé kůže je třeba si stanovit hlavní požadavky na model, mezi které patří charakteristika pokožky (věk, pohlaví, zdraví, hydratace, ...), simulované vlastnosti (optické, mechanické, termální, chemické, ...) a funkce (vnímání, ochlazování, zahřívání, ...), podmínky prostředí (teplota, vlhkost prostředí, ...) a experimentální podmínky (rychlost, čas, tlak, ...). Na základě stanovených požadavků se vybírá materiál a způsob zpracování [38].

Z materiálové stránky lze pokožku chápat jako velmi komplexní aktivní otevřený systém, který se skládá z vysoce nehomogenních anizotropních materiálů, přičemž kůže navíc vyměňuje teplo a hmotu se svým okolím. Fyzikální modely kůže mohou být připravovány pomocí mnoha kombinací materiálů, struktur a morfologií. Existují například modely pokožky založené na kapalných suspenzích, želatinových látkách, pryskyřicích, elastomerech, kovech nebo textiliích [38].

2.6.1 Kapalná suspenze

Tekuté suspenze jsou používány pro simulaci optických vlastností tkání. Do určité míry jsou tak simulovány absorpční a rozptylové vlastnosti kůže. Mezi nejvíce používané rozptylovače patří lipidové roztoky, monodispergované částice polystyrénu a oxidu titaničitého. Absorpce světla je závislá především na povaze kapaliny, ale lze ji ovlivnit také použitím absorbérů a fluoroforů biologického i syntetického původu [38].

2.6.2 Želatinové substance

Želatinové modely mají schopnost reagovat s vodou za reversibilní tvorby gelů. Tato schopnost umožňuje měnit a kontrolovat řadu fyzikálních, chemických a mechanických vlastností, jako je například modul pružnosti, tvrdost, optické nebo mechanické vlastnosti. Tlak, teplota nebo pH ovlivňuje chování želatiny a příbuzných polymerů. Do této skupiny patří například želatiny, agaróza a agar, kolagen a polyvinylalkohogely [38].

2.6.2.1 Želatina

Jedná se o látku, která vzniká částečnou hydrolyzací kolagenu a je značně zastoupena v kůži, pojivových tkáních a kostech. Roztoky vody a želatiny vhodně napodobují pružnost a viskozitu lidské tkáně [38]. Jedním z modelů je tzv. balistická želatina, která se používá pro balistické rekonstrukce tržných ran [39].

Další oblast využití želatinových roztoků jako modelů kůže je při testování opalovacích krémů, samoopalovacích přípravků nebo zvlhčovačů. Želatina poskytuje základ s podobnou hustotou, tuhostí, absorpcí a rozptylem světla jako má lidská pokožka. Každou z těchto vlastností je navíc možné ovlivnit podle potřeby využitím chemických nebo fyzikálních modifikací [38].

2.6.2.2 Agar

Jde o polysacharid získávaný z mořských řas. I přesto, že mají roztoky agaru omezenou životnost a nejsou příliš stabilní, tak jsou univerzální, snadno se vyrábějí a mají hustotu a akustickou impedanci podobnou lidské pokožce. K výrobě modelu dojde smícháním agaru s destilovanou vodou. Mohou být přidány látky ovlivňující řadu různých vlastností. K úpravě optických vlastností jsou často využívány chromofory a rozptylová média. Pro kontrolu vodivosti se přidává chlorid sodný. Vhodným začleněním magnetických částic je možné studovat tepelný přenos. Magnetické částice se zahřívají pomocí proměnných elektromagnetických polí [38].

2.6.3 Elastomery

Elastomery jsou polymery vykazující viskoelastické vlastnosti. Tato skupina je zastoupena velkou řadou syntetických a přírodních materiálů, jako jsou silikony, polyuretany, polyeterové amidové bloky, polyisopreny a polybutadieny [38].

Silikonové modely umělé kůže se často využívají při nutnosti docílit povrchu s podobnou drsností jako lidská pokožka. Silikon sám o sobě má také podobný index lomu jako kůže, ten se dá ale ještě upravit přidáním dalších látek, což umožňuje vhodně napodobit optické vlastnosti pokožky. Silikonové modely je možné tvarovat do různých anatomicky přesných struktur a byly využity při studiu podávání léků nebo vpichování jehly [38].

Polyuretanové modely jsou používány k simulaci tření lidské pokožky [38]. Byly využity při konstrukci hmatové snímací robotické kůže [40]. Tento typ modelů je vhodné použít například při trénování různých medicínských úkonů, jako je intradermální injekce, kožní chirurgie nebo k predikci měkkosti kožní tkáně, kdy polyuretany simulují epidermis [38].

2.6.4 Epoxidové pryskyřice

Vlastnosti epoxidových pryskyřic jsou silně závislé na typu pryskyřice. Jejich tepelná difuzivita se pohybuje v rozmezí 0,070 – 0,084 mm²/s, což je velmi blízké lidské kůži, která má tepelnou difuzivitu 0,11 mm²/s. Z tohoto důvodu jsou epoxidové modely často používány jako termální modely pokožky nebo modely teplotního senzoru pro předpověď popálenin [38]. Tepelná difuzivita vyjadřuje změnu teploty v jednotkovém objemu materiálu v důsledku toku tepla za jednotku času skrz jednotkovou plochu vrstvy s jednotkovou tloušťkou a s jednotkovým teplotním rozdílem mezi jejími stěnami. Jedná se tedy o rychlost šíření tepla během změny teploty v průběhu času a jednotky jsou udávány v mm²/s [41].

2.6.5 Kovy

Jedná se o modely, které jsou často využívány při studiu tepelných vlastností oděvů. Vyznačují se vysokou teplotní odezvou, stabilními vlastnostmi, robustností a dostupností technologií, které jsou schopny z nich vytvářet tvary. Nevýhoda těchto modelů spočívá v nerealistickém simulování některých mechanických vlastností a tepelné setrvačnosti [38].

2.6.6 Textilie

Textilní modely mohou být přírodní (bavlna) nebo syntetické (polyamid, polyester) a jsou často využívány při studiu distribuce potu u lidí. Pro takovéto studium existují 3 základní modely: navlhčená textilní kůže, textilní kůže s vodou dodávanou potíci tryskami a voděodolná textilní kůže propustná pro páry. Pomocí tohoto typu modelů je zkoumán transport kapalin a vodních par, tepelná izolace a jejich kombinovaný vliv na pohodlí a ochranné vlastnosti oděvů [38].

Pro experimenty realizované v další části této práce byl vybrán agarový typ fyzikálního modelu umělé kůže. Tento typ byl zvolen pro svou univerzálnost, nízkou cenu a fyzikální vlastnosti, které jsou podobné lidské kůži.

2.7 Rány

Rány jsou definovány jako narušení celistvosti kožního krytu. Můžeme je dělit podle mechanismu vzniku (mechanické, chemické, termické, aktinické), hloubky (povrchové, hluboké) nebo délky léčby (akutní, chronické). Nejčastěji vznikají působením tlaku, záření nebo nedostatečného prokrvení. Jednoduché kožní rány sahají do pokožky, škára a podkožního tuku, ale ty komplikovanější zasahují mnohem hlouběji a mohou poškozovat důležité nervově-cévní svazky a orgány. V případě průniku rány do tělní dutiny je označována jako penetrující. Všechny rány jsou popisovány z hlediska lokalizace, velikosti, hloubky, směru a tvaru. Jedná se o zásadní informace při sledování procesu hojení a při volbě optimálního způsobu léčby [42], [43].

Akutní rány porušují integritu tkání v důsledku mechanického, chemického nebo termického poškození. Vznikají ve zdravé kožní tkáni a hojí se obvykle v krátkém čase bez komplikací. Nejčastěji jsou způsobeny úrazem nebo chirurgickým zákrokem [42].

2.7.1 Chronické rány

Chronické rány jsou sekundární rány, které vznikají v prostředí troficky změněných tkání, kterým předchází onemocnění. Doba hojení se značně prodlužuje a je narušený samotný proces hojení. Časově se dají specifikovat jako rány, které ani při správně zvolené léčbě, nevykazují po dobu 6–9 týdnů tendenci k hojení [42].

Bývají často zaměňovány s komplikovanými nebo obtížně zhojitelnými akutními ránami. Základní rozdíl mezi těmito dvěma typy je ve schopnosti fibroblastů, endotelií a keratinocytů dostatečně replikovat a produkovat mezibuněčnou hmotu [42].

Proces hojení chronických ran spočívá ve výstavbě nové tkáně s odpovídající anatomickou strukturou. Z toho důvodu bývá hojení časově náročné a individuálně podmíněné příčinou a rozsahem poškozené tkáně. Mezi chronické rány patří například bérkové vředy, diabetická noha, nádory s vředovitým rozpadem, komplikovaně hojící se pooperační rány nebo proleženiny [42], [44].

2.7.2 Hojení

Jedná se o proces obnovy tkání a patří mezi základní děje pro přežití organismů. Je úzce spojený s dalšími metabolickými ději a ovlivňuje ho tak celá řada faktorů. Jde o kontinuální proces, v němž se jednotlivé fáze vzájemně prolínají. Buněčné pochody jsou spuštěny ve chvíli, kdy dojde k porušení integrity tkáně. Důležitým předpokladem k určení adekvátní léčby je rozpoznání fáze hojení [42], [43].

Při hojení ran je potřeba se vyhnout také sekundární infekcím. Jedná se o infekce, které vznikají jako komplikace při jiném onemocnění. Mohou být způsobeny celou řadou mikroorganismů jako jsou bakterie, viry, houby nebo paraziti. Vznikají převážně u pacientů s oslabeným imunitním systémem, jako jsou pacienti po operaci, pacienti s chronickými ránami nebo pacienti s imunodeficiencí [45].

První zmínky o hojení ran pocházejí ze starého Egypta, kde se k ošetření používaly přírodní látky – med, cukr, mléko, rozmačkaná semena, ovoce, pryskyřice nebo zvířecí trus. Jsou zaznamenány také výhody použití vlhkého krytí jako zvlhčených plátěných obvazů nebo přiloženého čerstvého masa [42].

V letech 1962 provedl profesor Winter sérii pokusů vlhké terapie hojení ran [42]. Výsledkem bylo, že ve vlhkém prostředí se nová epidermis tvoří až o 40 % rychleji než v suchém prostředí. Tekutina vylučovaná ranou je složena z růstových faktorů a výživných látek, které přispívají k úspěšnému hojení. Proto jsou moderní materiály pro hojení ran určené k tomu, aby udržovaly vlhké prostředí. Mezi hlavní výhody vlhkého hojení patří úspora času, menší počet převazů, snadnější manipulace, účinnější léčba, kratší doba hojení, omezení rizika recidivy nebo menší bolest [42].

Existují dvě skupiny faktorů, které mohou negativně ovlivnit hojení. Jsou to lokální faktory (porucha krevního zásobení, působení tlaku, teplota, pH, přítomnost infekce, otok, ...) a celkové faktory (věk, zdravotní stav, anémie, vliv léků, ...). Hojení můžeme rozdělit do 3 fází – čistící, granulační a epitelizační. Každá z fází je specifikována odlišnými biochemickými a biologickými pochody. V průběhu fází dochází ke sražení krve, vyčištění rány a výstavbě nové tkáně, která vyplní defekt a změní se v jizevnatou tkáň. Jedná-li se o chronickou ránu, dochází k narušení fyziologického procesu hojení, formuje se v méněcennou tkáň nebo vzniká nehojící se chronický defekt [42].

2.7.2.1 Čistící fáze

Může být nazývána také jako fáze exsudativní, erudační nebo zánětlivá. Jedná se o zásadní fázi, při které jde o to, co nejrychleji zastavit krvácení a odstranit nečistoty, s cílem zamezit lokálním komplikacím. Poškozené části tkání jsou odbourávány a jsou navozeny vhodné podmínky pro růst nových. Dochází proto ke vzniku zánětu, pro který je charakteristický otok, zarudnutí, bolest a zvýšená teplota postiženého místa. Může dojít také k rozvoji nekrózy, která brání v uzavření rány, proto musí být odstraněna. Doba trvání je okolo 3 dnů [42], [43].

2.7.2.2 Granulační fáze

Tato fáze je známá také pod názvem proliferativní, protože zde dochází k proliferaci buněk – vytvoření nových cév za účelem vyplnění defektu granulační tkáně, díky čemuž mohou být tkáň vyživovány kyslíkem a živinami. Fáze začíná zhruba 4. den od vzniku rány. Nově vzniklé kapiláry jsou málo odolné a musí tak být chráněny před možnou traumatizací. Při rozkladu krevní sraženiny vznikají aminokyseliny, které slouží jako výživný substrát pro narušené tkáň [42], [43].

Do rány přicházejí také fibroblasty, které produkují kolagen, a ten následně vyzrává v pevná kolagenní vlákna. Rána kontrahuje a dochází k epitelizaci. V okamžiku, kdy ránu vyplní granulační tkáň, začne se rána uzavírat. Právě v tuto chvíli je nezbytné udržet ránu ve vlhkém prostředí. Je nutné se také vyhnout nadměrnému růstu granulační tkáň, infekci nebo traumatizaci rány [42], [43].

2.7.2.3 Epitelizační fáze

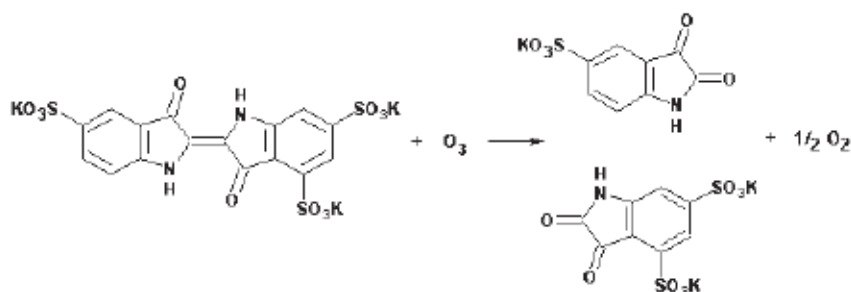
Jedná se o konečnou fázi procesu hojení. Epitelizace probíhá nerovnoměrně od krajů rány nebo ostrůvků. Doprovází granulační fázi, která vytváří nosnou plochu pro tvorbu nového pojivového tkaniva a pokožky bez kožních přívesků. Fáze může být zpomalena nebo dokonce až potlačena, pokud dojde k nadměrnému růstu granulační tkáň. Finálním stádiem hojení je jizva. Jde o avaskulární a acelulární masu kolagenu, jejíž účel spočívá v obnově tkáňové integrity a funkce [42], [43].

2.8 Barviva využitá pro detekci aktivních částic plazmatu

V experimentální části této práce byla využita 4 různá barviva pro důkaz aktivních částic v plazmatu, které jsou popsány v kapitole 2.2. Mezi použitá barviva patří indigo, jodid draselný a Griessovy testy pro stanovení dusitanů a dusičnanů test pro stanovení dusitanů a test pro stanovení dusičnanů.

2.8.1 Indigo

Indigová modř reaguje s ROS, které jsou produkovány plazmatem a dochází k jejímu odbarvení. Molekula indiga ve své struktuře obsahuje 1 uhlíkovou dvojnou vazbu, která reaguje s ozónem. Za správných reakčních podmínek reaguje 1 molekula indiga s 1 molekulou ozónu. Průběh reakce je znázorněn na obrázku 5 [46], [47].



Obrázek 5: Reakce ozónu s indigovou modří

2.8.2 Jodid draselný

Jodový test na škrob patří mezi široce používanou metodu dokazování škrobu v potravinářství. Tato jednoduchá metoda byla objevena v roce 1814. V této reakci dochází k oxidaci jodidu na jód, který je následně vázán do komplexu se škrobem. Takto vzniklý komplex je typický pro své tmavě modré zbarvení [48]. Tuto metodu je vhodné použít pro detekci ROS v plazmatu.

2.8.3 Test pro stanovení dusičnanů a dusitanů

Pro stanovení dusičnanů je možné využít Griessovo činidlo, které obsahuje N-(1-naftyl)etylendiamin a sulfanilamid. Jednotlivé složky reagují s NO_2^- za vzniku růžového zbarvení. Následně může být stanovena jejich koncentrace pomocí spektrofotometru při UV-VIS $\lambda = 540 \text{ nm}$. Při stanovení NO_3^- je nejdříve potřeba zoxidovat NO_2^- například pomocí VCl_3 . Griessovo činidlo tak po zoxidování reaguje s NO_2^- a vzniká žlutohnědé zbarvení. To je možné spektrofotometricky pozorovat při $\lambda = 526 \text{ nm}$ [49].

2.9 Mikroorganismy

2.9.1 *Candida glabrata*

Candida glabrata patří mezi kvasinky rodu *Candia* a jde o lidský oportunní patogen, který je zodpovědný až za 29 % celkových infekcí krevního řečiště. Je také původcem infekcí močových cest a pochvy. Původně byla tato kvasinka známá pod jménem *Torulopsis glabrata*, ale to bylo později změněno. Klinicky je diagnostikována pomocí kultivačních testů a mikroskopických vyšetření [50].

2.9.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli se řadí mezi gramnegativní bakterie do čeledi *Enterobacteriaceae*. Běžně se vyskytuje ve střevech obratlovců, kde není patogenní a napomáhá trávení potravy. Existují také skupiny *E. coli*, které jsou patogenní a mohou způsobovat řadu nebezpečných onemocnění nebo kažení mléčných výrobků [51], [52].

2.9.3 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je grampozitivní bakterie rodu *Staphylococcus*. Dříve byl považován za neškodný mikroorganismus přítomný na lidské kůži. Dnes už patří mezi oportunní patogeny, které doprovázejí jiné patogenní infekce. Velmi často bývá původcem infekcí, ke kterým došlo při pobytu ve zdravotnických zařízeních. Ve výjimečných případech se mohou infekce způsobené touto bakterií rozvinout v život ohrožující onemocnění [53].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Automatické pipety různého objemu
Křemenné sklo
Mikrovlnný generátor – Sairem (GMS 200 W)
Petriho misky Ø 90 mm
Petriho misky Ø 55 mm
Počítač
Pomůcky pro běžnou mikrobiologickou praxi
Regulátor hmotnostního průtoku – Bronkhorst (NL)
Termostat s inkubátorem Heidolph Unimax 1010
Těsný transformátor
Tlakový hrnec
Zrcadlový fotoaparát

3.2 Použité chemikálie

Agar, HiMedia (SRN)
Argon 4.6 – Linde Gas (SRN)
Bakteriální kultura *Escherichia Coli* CCM 3954 z České sbírky mikroorganismů
Masarykovy univerzity v Brně
Bakteriální kultura *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 z České sbírky mikroorganismů
Masarykovy univerzity v Brně
D–glukóza monohdrát p.a., Lach:Ner (ČR)
Jodid draselný – Penta (ČR)
Kukuřičný škrob – Amylon (ČR)
Kvasinková kultura *Candida Glabrata* CCM 8270 z České sbírky mikroorganismů
Masarykovy univerzity v Brně
Peptone aus Casein, Carl Roth (SRN)
Tekuté kultivační médium BHI (Brian Heart Infusion), Himedia (IND)
Tekuté kultivační médium LB (Lennox Broth), Sigma Aldrich (DE)
Tekuté kultivační médium NB (Nutrient Broth), Himedia (IND)
Tekuté kultivační médium YPD (Yeast Extract – Peptone – Dextrose/Glucose)
Test pro stanovení dusičnanů ve sladké vodě – kyselina boritá, kyselina sulfanilová,
kadmiový prášek, Merck (SRN)
Test pro stanovení dusitanů ve sladké a slané vodě – kyselina sulfanilová, Merck (SRN)
Yeast Extract Powder, Himedi (IND)

3.3 Příprava biopolymerů

3.3.1 Příprava biopolymeru na bázi agaru s barvivem indigo

Bylo smícháno 3,5 g agaru se 100 ml destilované vody a 0,002 g barviva indigo. Směs byla zahřívána na teplotu 85 °C a neustále míchána. Po dosažení teploty byla připravená směs nalita do přichystaných Petriho misek s průměrem 55 mm. Po 15 min došlo ke ztuhnutí, kdy mohlo být se směsí dále pracováno.

3.3.2 Příprava biopolymeru na bázi agaru s KI

Bylo smícháno 2,2 g agaru, 100 ml destilované vody, 0,5 g jodidu draselného a 0,4 g kukuřičného škrobu. Směs byla zahřívána na teplotu 85 °C a neustále míchána. Po dosažení teploty byla připravená směs nalita do přichystaných Petriho misek s průměrem 55 mm. Po 15 min došlo ke ztuhnutí, kdy mohlo být se směsí dále pracováno.

3.3.3 Příprava biopolymeru na bázi agaru s testem pro stanovení dusičnanů

Bylo smícháno 3,5 g agaru se 100 ml destilované vody. Směs byla zahřívána na teplotu 85 °C a neustále míchána. Po dosažení teploty byla směs ochlazena na teplotu 50 °C. Následně byly do směsi přidány 4 odměrné lžičky činidla. Vše bylo promícháno a připravená směs byla nalita do přichystaných Petriho misek s průměrem 55 mm. Po 15 min došlo ke ztuhnutí, kdy mohlo být se směsí dále pracováno.

3.3.4 Příprava biopolymeru na bázi agaru s testem pro stanovení dusitanů

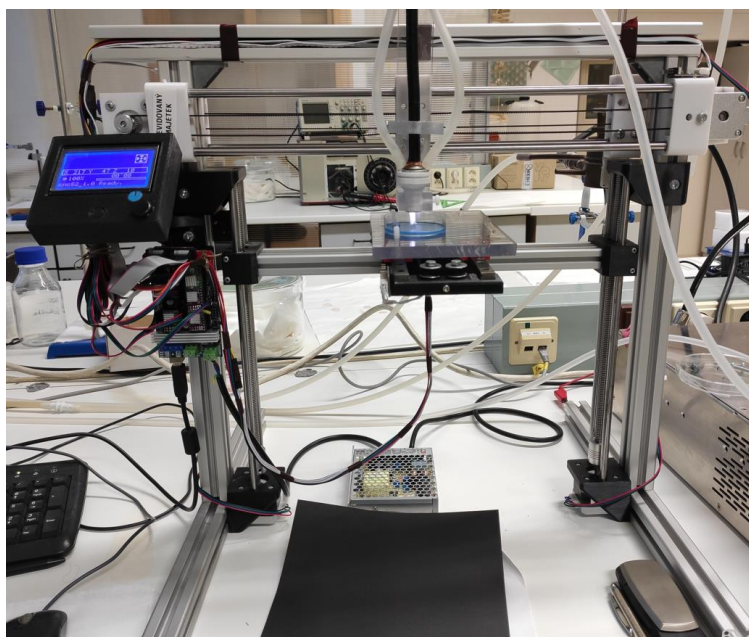
Bylo smícháno 3,5 g agaru se 100 ml destilované vody. Směs byla zahřívána na teplotu 85 °C a neustále míchána. Po dosažení teploty byla směs ochlazena na teplotu 50 °C. Následně bylo do směsi přidáno 8 odměrných lžiček činidla. Vše bylo promícháno a připravená směs byla nalita do přichystaných Petriho misek s průměrem 55 mm. Po 15 min došlo ke ztuhnutí, kdy mohlo být se směsí dále pracováno.

3.4 Využití 3D stolu k optimální distribuci aktivních částic plazmatu na povrchu biopolymerů

Aparatura určená pro pohyb plazmového výboje nad vzorky biopolymerů je složena ze 2 pohyblivých částí, a to ramene, ve kterém je uchycena plazmová tryska, a držáku, na kterém jsou uchyceny Petriho misky. Rameno se pohybuje doleva a doprava ve směru osy y pro mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu nebo osy u pro mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou a držák se pohybuje do stran ve směru osy x a nahoru a dolů ve směru osy z . Aparaturu je možné ovládat pomocí počítačového programu Repetier host. Program rozpožhuje aparaturu podle zadaných souřadnic. Je možné ovlivnit pozici ramene a držáku, rychlost pohybu a dobu setrvání v dané pozici. V tabulce 1 jsou uvedeny kódy pro komunikaci s programem. Fotografii 3D stolu je možné vidět na obrázku 6.

Tabulka 1: Přehled kódů pro komunikaci s programem

G1	Pohyb
G4	Setrvání na místě souřadnic
G28	Navrácení do výchozí polohy
F	Rychlost pohybu
S	Doba setrvání na místě souřadnic



Obrázek 6: 3D stůl

3.4.1 Bodová aplikace plazmatu na biopolymery

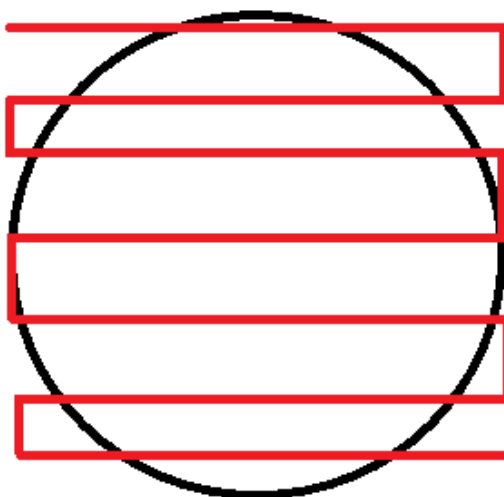
Podle postupů uvedených v kapitole 3.3 byly připraveny biopolymery s příslušnými barvivy. Následně bylo bodově působeno plazmatem pomocí 2 plazmatických výbojů (mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu a mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou) při výkonech 9 W a 12 W, průtoku argonu 5 slm, při 3 různých časech v závislosti na výkonu. Detailní popis parametrů je uveden v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled parametrů používaných pro bodové ošetření biopolymerů

	Mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu		Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou	
Výkon [W]	9	12	9	12
čas [s]	30	30	30	30
	60	60	60	60
	300	120	300	120

3.4.2 Celoplošná aplikace plazmatu na biopolymery pomocí 3D stolu

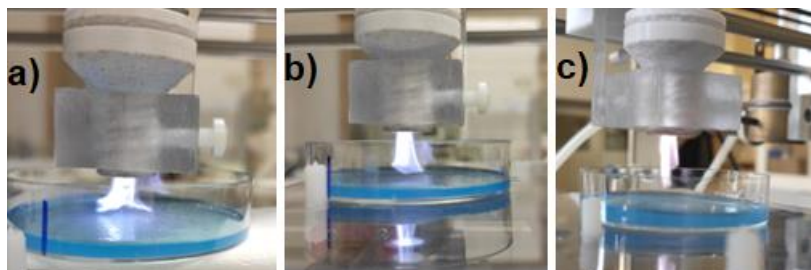
Podle postupů uvedených v kapitole 3.3 byly připraveny biopolymery s příslušnými barvivy. Následně byla pomocí počítačového programu Repetier Host nastavena rychlost pohybu společně se souřadnicemi pro pohyb pohyblivého ramene a držáku s Petriho miskou. Znárodnění pohybu je možné vidět na obrázku 7. Biopolymer v Petriho misce byl uchycen v držáku a byl spuštěn program. Po dokončení pohybu, byl biopolymer vyjmut ze stojanu a výsledek měření byl pomocí zrcadlového fotoaparátu zaznamenán. Pro jednotlivé biopolymery byly měněny parametry rychlosti pohybu, typu pohybu a počtu opakování ošetření.



Obrázek 7: Schéma pohybu plazmového výboje nad povrchem biopolymeru

3.4.3 Optimalizace vzdálenosti plazmového výboje od povrchu biopolymeru

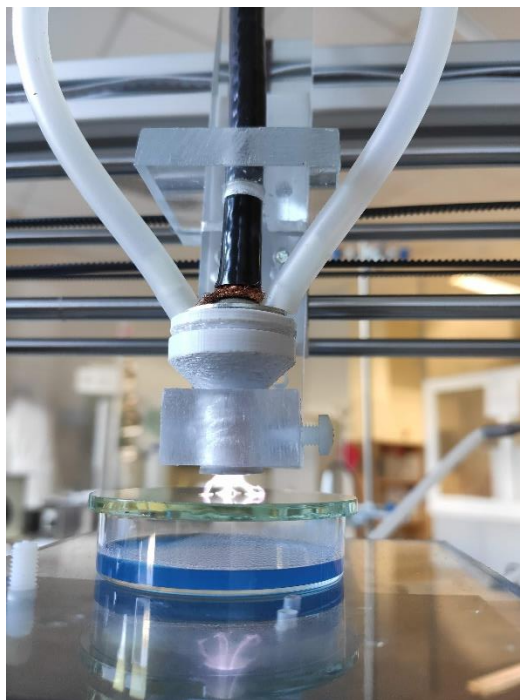
Podle postupů uvedených v kapitole 3.3.1 byl připraven biopolymer s barvivem indigo. Následně byly provedeny 3 testy pro určení nejideálnější vzdálenosti výboje od povrchu biopolymeru. Nejdříve bylo provedeno přímé dotýkání plazmového výboje s povrchem, poté byl proveden těsný dotyk, a nakonec byl proveden test, kdy se výboj vůbec povrchu nedotýká. Pro lepší představu je uveden obrázek 8.



Obrázek 8: Test vzdálenosti výboje od povrchu a) 0 mm, b) 1,5 mm c) 10 mm

3.5 Působení plazmatu na biopolymery přes křemenné sklo

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1 byl připraven biopolymer. Následně došlo k bodovému působení plazmatu na biopolymer, který byl zakrytý křemenným sklem. Při tomto měření byl použit mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu, průtok argonu 5 slm a výkon 12 W. Výboj působil na biopolymer po dobu 300 s. Experiment je znázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9: Bodové působení plazmatu na biopolymer zakrytý křemenným sklem

3.6 Příprava vzorků s mikroorganismy

Schopnost plošné dekontaminace a její korelace s rozložením aktivních částic byla zkoumána na následujících mikroorganismech: *Candida glabrata*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*, byl pozorován celoplošný účinek plazmatu, které pomocí pohyblivého ramene ošetřilo celou plochu Petriho misky s průměrem 90 mm.

3.6.1 Příprava očkovacího inokula

Pro jednotlivé mikroorganismy byla zvolena specifická živná média, která odpovídají jejich nárokům. Přehled médií a mikroorganismů můžeme vidět v tabulce 3. Postup přípravy jednotlivých médií je přehledně znázorněn v následujících tabulkách 4, 5 a 6.

Tabulka 3: Přehled mikroorganismů a jejich specifických živných médií

Mikroorganismus	Živné médium
<i>Candida glabrata</i>	Yeast Extract – Peptone – Dextrose/Glucose
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Brain Heart Infusion
<i>Escherichia coli</i>	Lennox Broth

Tabulka 4: Složení kultivačního média pro *C. glabrata*

Složení	Obsah [g/l]
Kvasničný extrakt	10
Pepton z kaseinu	20
D-glukóza monohydrát	20

Tabulka 5: Složení kultivačního média pro bakterii *S. epidermidis*

Složení	Obsah [g/l]
BHI	37

Tabulka 6: Složení kultivačního média pro bakterii *E. coli*

Složení	Obsah [g/l]
LB	20

Inokulum bylo vždy připraveno do 50 ml živného média. Sterilní kličkou byla do média přidána kultura jednotlivých mikroorganismů *C. glabrata*, *E. coli* nebo *S. epidermis*. Takto připravená inokula byla inkubována v termostatu s třepáním při teplotě 37 °C po dobu 24 h.

3.6.2 Příprava kultivačního média

Pro výše uvedené mikroorganismy bylo připraveno živné médium, které obsahovalo glukózu a komplexní živné médium NB (Nutrient Broth). Pro přípravu tuhého média bylo do směsi přidáno 20 g/l agaru. Přesně uvedené poměry, podle kterých bylo médium připraveno, můžeme vidět v tabulce 7. Navážena směs byla doplněna destilovanou vodou a vše bylo sterilizováno v autoklávu nebo tlakovém hrnci.

Postup přípravy kultivačních i živných médií byl optimalizován v diplomové práci Bc. Veroniky Petrové [54].

Tabulka 7: Složení živného média pro mikroorganismy *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermis*

Složení	Obsah [g/l]
NB	25
D-glukóza monohydrát	20

3.6.3 Kultivace mikroorganismů

Předem připravená inokula byla naředěna na koncentraci 10^4 CFU/ml. Při přípravě společných kultur byly nejdříve zvolené naředěné kultury smíchány v poměru 1:1 pro získání požadované směsné kultury. Pevné médium, které bylo připraveno podle postupu uvedeného v kapitole 3.6.2, bylo nalito po 10 ml na Petriho misky s průměrem 90 mm. Po zatuhnutí došlo k zaočkování 100 μ l jednotlivých kultur *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermidis* nebo kombinace *C. glabrata* + *E. coli*. Z každého vzorku bylo připraveno 12 misek, 3 misky byly ponechány na kontrolu a zbytek byl ihned ošetřen plazmovým výbojem. Po ošetření byly misky inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 h, poté byly jednotlivé vzorky vyfoceny fotoaparátlem a nahrány k dalšímu zpracování. Výsledky byly zpracovány ve spolupráci s VŠCHT Praha.

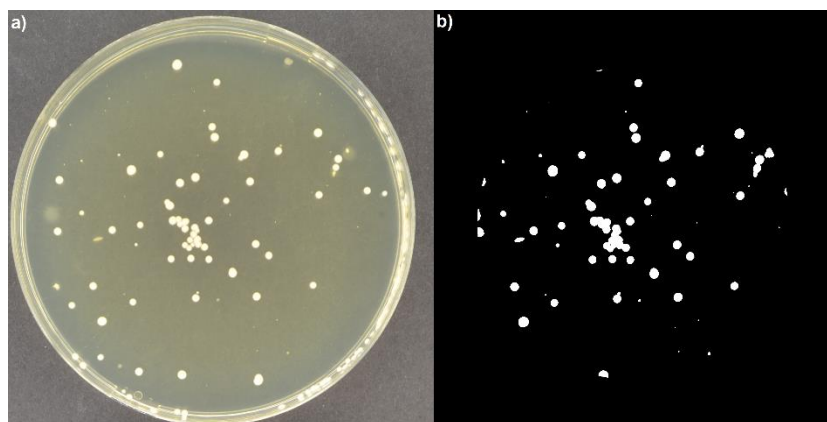
3.6.4 Působení plazmatu na mikroorganismy

Na jednotlivé vzorky byl aplikován mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu s výkonem 9 W nebo 12 W anebo mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou s výkonem 9 W. Průtok nosného plynu byl 5 slm. Na ošetření naočkovaných Petriho misek s průměrem 90 mm, bylo využito pouze 1 opakování cyklu, který v průměru trval 9 min. Měření bylo prováděno vždy po triplicátech. U každé kultury byly sledovány také neošetřené kontrolní vzorky, aby bylo možné porovnat inhibiční rozdíly

3.6.5 Vyhodnocení mikrobiálního poklesu

Všechny vzorky byly po 24 hodinách kultivace nafoceny a vyhodnoceny ve spolupráci s HexTech Research s.r.o. Pro analýzu plochy Petriho misky zarostlé mikroorganismy byl využit software Aurora, vytvořený Janem Hrudkou. Vícekrokový algoritmus Aurora využívá principy umělé inteligence a strojového učení. Ve vstupním obrazu jsou pomocí spektrální intenzity detekovány ty pixely, které zachycují významné částice (např. agar). Tyto pixely jsou rozděleny do shluků na základě své relativní pozice. Z těchto dat je pak možné určit, jakou plochu Petriho misky zaujímají mikroorganismy.

Na obrázku 10 je uvedeno a) jak vypadala mikrobiální kultura po kultivaci a b) jak tutéž fotografii zobrazil software Aurora.



Obrázek 10: Vyhodnocená data pomocí softwaru Aurora

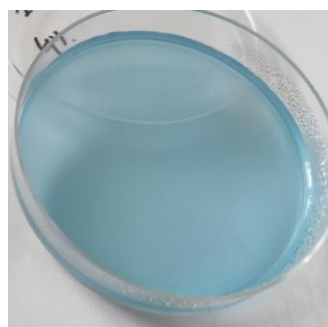
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace přípravy biopolymeru na bázi agaru

Bylo smícháno 1,5 g agaru se 100 ml destilované vody. Směs byla nepřetržitě míchána a zahřívána na teplotu 85 °C. Po dosažení této teploty, bylo 10 ml odlito na Petriho misku s průměrem 5,5 cm. Vzhledem k malému obsahu agaru ve směsi nedošlo ani po 24 h ke ztuhnutí. Biopolymer byl proto připraven stejným postupem ještě jednou, ovšem tentokrát s navýšením agaru na 4,0 g. V tomto případě bylo pozorováno zatuhnutí už po 1 h. Porovnání takto připravených biopolymerů můžeme vidět na obrázku 11 a 12, kdy byly agary umístěny na nakloněnou rovinu. U biopolymeru s nižším obsahem agaru je jasně viditelné, že nedošlo k zatuhnutí.

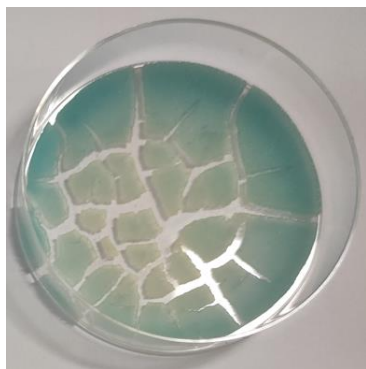


Obrázek 11: Biopolymer s 1,5 g agaru

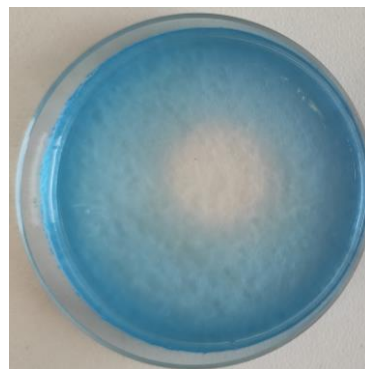


Obrázek 12: Biopolymer s 4,0 g agaru

U biopolymerů bylo pozorováno také, po jak dlouhé době je ještě možné vzorky ošetřit plazmatem po celé ploše. Pokud byly vzorky starší 7 dnů, došlo k odpaření vody a popraskání povrchu. U vzorků, které byly ošetřeny už po 3 dnech od přípravy, byl povrch i po ošetření celistvý. Porovnání biopolymeru připraveného před 7 dní a biopolymeru připraveného před 3 dny, které byly ošetřeny plazmatem, můžeme vidět na obrázku 13 a 14. Z tohoto důvodu bylo v následujících experimentech pracováno s biopolymerem, které byly staré maximálně 3 dny.



Obrázek 13: Biopolymer připravený před 7 dny



Obrázek 14: Biopolymer připravený před 3 dny


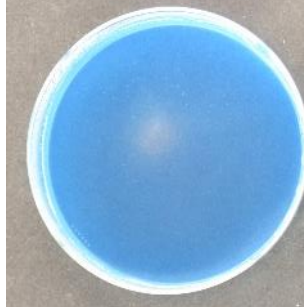
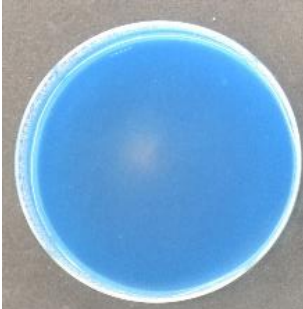
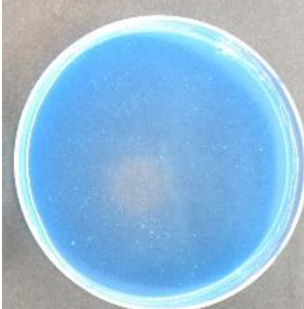
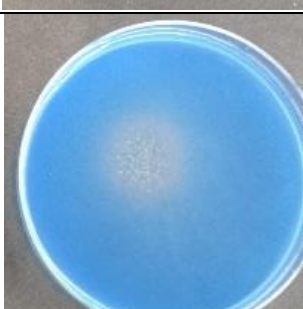
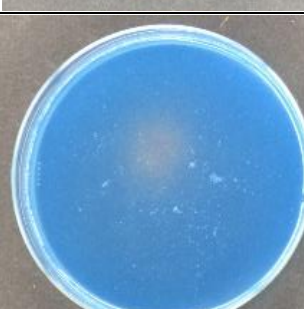
4.2 Reakce plazmového výboje s biopolymery s přidanými barvivy

Jak už bylo popsáno v teoretické části, plazma obsahuje velké množství aktivních částic dusíku a kyslíku. V rámci této práce byla využita barviva, která dokazovala přítomnost RONS v plazmatu. Tato barviva byla přimíchána do biopolymerů podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.

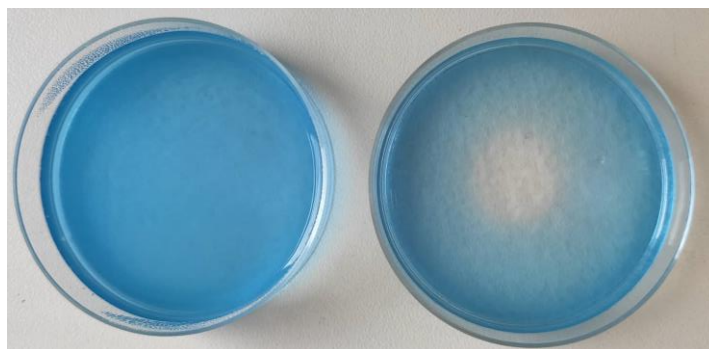
4.2.1 Bodové ošetření biopolymerů s indigem

Jedním z barviv byla indigová modř. Při reakci tohoto barviva s ozónem dochází k jeho odbarvení. Výsledky experimentu jsou uvedeny v tabulce 8. Můžeme pozorovat, že na obrázcích jsou jasně patrné odbarvené zóny. Při použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou bylo patrné odbarvení biopolymeru po 60 s při výkonu 9 W a už po 30 s při výkonu 12 W.

Tabulka 8: Výsledky bodového ošetření biopolymerů s indigem

Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou					
Doba expozice	Výkon 9 W		Doba expozice	Výkon 12 W	
	30 s			30 s	
60 s		60 s			
300 s		120 s			

Stejné parametry byly použity i pro ošetření plazmatem s mikrovlnným pochodňovým výbojem s přímým přívodem plynu, ale v takovémto případě bylo pozorováno odbarvení až po 300 s při výkonu 12 W. Výsledek tohoto testu je znázorněn na obrázku 15.



Obrázek 15: Porovnání neošetřeného biopolymeru s příměsí indiga s ošetřeným biopolymerem s využitím mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu (doba expozice 300 s, výkon 12 W)

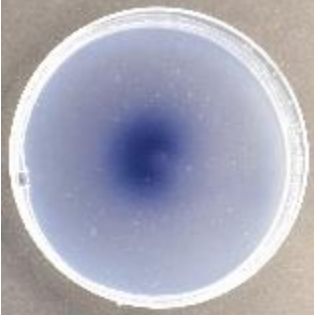
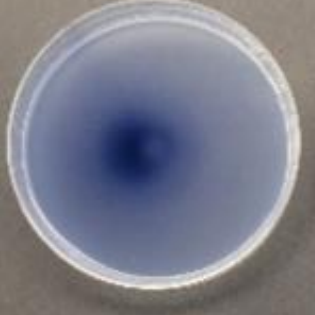

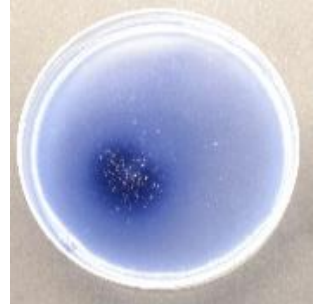


Na základě tohoto experimentu můžeme potvrdit, že v plazmovém výboji je přítomný ozón, který je zodpovědný za změnu barvy indigové modři. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.8.1, 1 molekula indiga je oxidována přibližně 1 molekulou ozónu, což může svědčit o vysoké přítomnosti ozónu v plazmatu tvořeném pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou. Naopak v plazmatu tvořeném pochodňovým výbojem bylo množství ozónu velmi malé, jelikož k odbarvení indiga docházelo až po velmi dlouhých expozičních časech.

4.2.2 Bodové ošetření biopolymerů s jodidem draselným

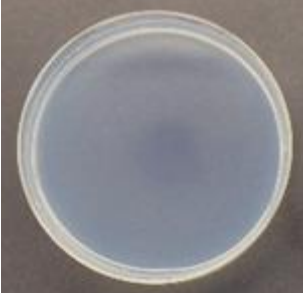


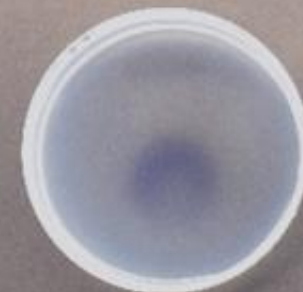
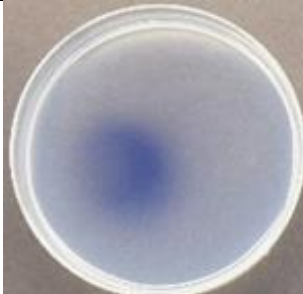
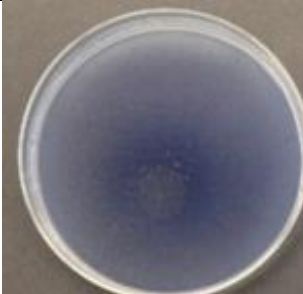
Další testy byly provedeny na základě biopolymeru, ke kterému byl přidán jodid draselný a škrob. V tomto případě docházelo k rozkladu jodidu na jód, který následně reagoval se škrobem za vzniku komplexu s tmavě modrým zbarvením. Na rozdíl od biopolymeru s indigem, tato oxidace už není specifická jenom pro ozón nebo jinou částici, ale dochází k ní pomocí všech ROS. Z tohoto důvodu došlo k barevné změně biopolymeru mnohem rychleji než u experimentu uvedeného v kapitole 4.2.1. Biopolymery byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Na obrázcích můžeme vidět porovnání ošetřených biopolymerů, kdy byly použity 2 různé výboje, a to mikrovlnný s povrchovou vlnou a mikrovlnný pochodňový s přímým přívodem plynu.

Z výsledků je jasně patrné, že při použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou došlo k odbarvení větší plochy než při použití mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu. Na vzorku při použití mikrovlnného pochodňového výboje s výkonem 12 W a dobou expozice 120 s je také patrná neobarvená zóna, která se nachází přímo uprostřed obarvené plochy. Jedná se o místo, na které nedopadly aktivní částice. Tento fakt vypovídá o tom, že aktivní částice proudí ve tvaru tornáda a uprostřed tak vzniká tzv. oko, ve kterém bylo přítomno pouze minimum aktivních částic. V porovnání s mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou, kde je plazmový paprsek fokusován do úzkého svazku, na jehož špici je nejvyšší koncentrace aktivních částic. Tento fakt je možné vidět na vzorku, kdy byl pro ošetření použit mikrovlnný výboj s povrchovou dobou s výkonem 12 W a dobou expozice 120 s, kde nejtmaší vybarvená zóna je právě ve středu a po okrajích bledne. V tabulkách 9 a 10 níže je možné vidět výsledky experimentu.

Tabulka 9: Bodové ošetření biopolymeru s KI pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou

Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou				
Doba expozice	Výkon 9 W		Výkon 12 W	
30 s		30 s		
60 s		60 s		
300 s		120 s		

Tabulka 10: Bodové ošetření biopolymeru s KI pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu


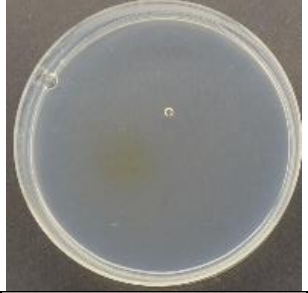




Mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu					
Doba expozice	Výkon		Doba expozice	Výkon	
	9 W			12 W	
30			30		
60			60		
300			120		

4.2.3 Bodové ošetření biopolymerů s detekcí dusičnanů

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3 byly připraveny biopolymery, které jsou schopny zaznamenat přítomnost dusičnanů v plazmovém výboji.

Přítomnost dusičnanů byla prokázána v plazmatu tvořeném mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou, avšak nikoli v plazmatu tvořeném pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu. Na obrázcích uvedených v tabulce 11 jsou patrné žlutě zbarvené zóny, které jednoznačně vypovídají o přítomnosti dusičnanů v plazmatu tvořeném mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou. Je možné pozorovat opakující se trend pro všechny studované aktivní částice, a to že se zvyšující se dobou ošetření a vyšším výkonem, dochází ke vzniku větších barevných změn. Při ošetření biopolymeru plazmatem s výkonem 12 W po dobu 120 s jsou patrné známky narušení biopolymeru z důvodu lokálního přehřátí povrchu, při použití příliš vysokého času u velkého výkonu. Tento experiment byl prováděn také pomocí pochodňového výboje, ale v takovémto případě nedošlo k prokázání přítomnosti dusičnanů pro žádné výkony nebo doby ošetření. Z toho vyplývá, že plazmový mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou poskytuje mnohem vyšší koncentraci dusičnanů než mikrovlnný pochodňový výboj.


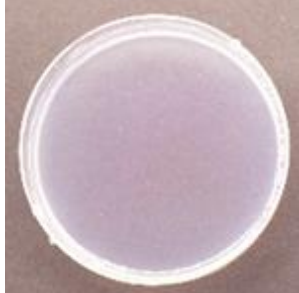

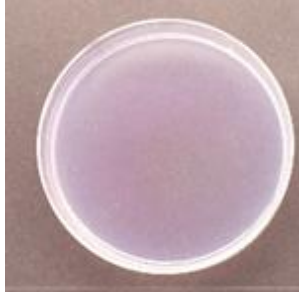
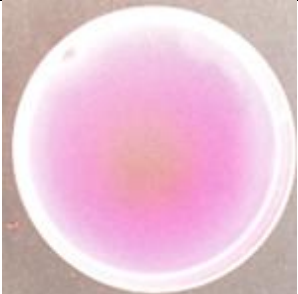
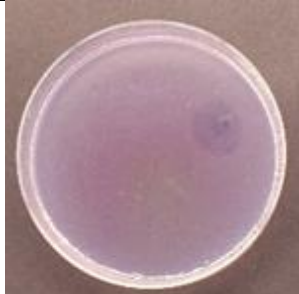
Tabulka 11: Bodové ošetření biopolymeru s barvivem pro detekci dusičnanů pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou

Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou					
Doba expozice	Výkon		Doba expozice	Výkon	
	9 W			12 W	
30 s			30 s		
60 s			60 s		
300 s			120 s		

4.2.4 Bodové ošetření biopolymerů s detekcí dusitanů

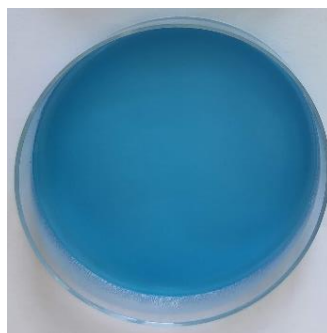
Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4 byly připraveny biopolymery, které jsou schopny zaznamenat přítomnost dusitanů v plazmovém výboji. Z výsledků, které je možné vidět v tabulce 12, je patrné růžové zbarvení ošetřených vzorků, které vypovídá o přítomnosti dusitanů v plazmatu. Toto zbarvení se začalo objevovat až po delší době ošetření, lehké náznaky jsou viditelné po 60 s. Tyto barevné změny byly pozorovány jenom u mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu. V případě mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou ke změně barvy nedošlo u žádného z ošetřovaných biopolymerů, co může svědčit o velice nízké koncentraci dusitanů v tomto typu plazmatu. Když vezmeme do úvahy, že při testu na dusičnany byly dosaženy úplně opačné výsledky (viz. kapitola 4.2.3), dalo by se tvrdit, že v plazmatu tvořeném pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou se většina dusitanů oxiduje až na dusičnany, které lze následně stanovit (žluté zbarvení). Na druhé straně u pochodňového výboje s přímým přívodem plynu zůstává většina dusitanů v této formě (detekované růžové zbarvení), a proto testy na dusičnany nebyly úspěšné (nedocházelo k tvorbě žlutého zbarvení).

Tabulka 12: Bodové ošetření biopolymeru s barvivem pro detekci dusitanů pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu

Mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu					
Doba expozice	Výkon		Doba expozice	Výkon	
	9 W			12 W	
30 s			30 s		
60 s			60 s		
300 s			120 s		

4.3 Důkaz interakce aktivních částic plazmatu s biopolymery

Při ošetření indigového biopolymeru bylo využito křemenné sklo na překrytí biopolymeru, jak je popsáno v kapitole 3.5. Díky tomu nedošlo ke styku aktivních částic plazmatu s biopolymerem, ale UV záření plazmatického výboje bylo propuštěno. Výsledkem bylo neodbarvení indigového biopolymeru, z čehož je možné usoudit, že aktivní částice jsou zodpovědné za probíhající reakce v biopolymerech, které vedou ke změně jejich barev. Neodbarvený biopolymer, na který bylo působeno mikrovlnným pochodňovým výbojem s přímým přívodem plynu s výkonem 12 W a expozičním časem 300 s, je možné vidět na obrázku 16.



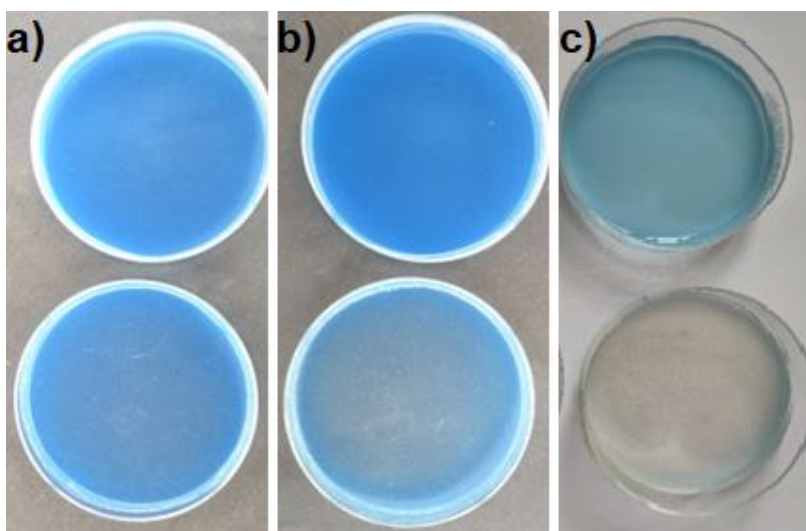
Obrázek 16: Výsledek bodového ošetření biopolymeru překrytého křemenným sklem

4.4 Celoplošné plazmatické ošetření biopolymerů

Pomocí 3D stolu bylo možné aplikovat plazma po celé ploše Petriho misek. Na základě barevných změn vzorků tak byly vyhodnoceny optimální podmínky pro rovnoměrnou distribuci aktivních částic. Během tohoto experimentu byly měněny následující parametry: přesné souřadnice pohybu plazmového výboje nad povrchem biopolymeru, rychlost pohybu plazmového výboje, průtok nosného plynu, výkon, typ plazmatického výboje a počet opakování celoplošného ošetření. Nejprve bylo provedeno celoplošné ošetření biopolymeru s přidavkem indiga.

U pochodňového výboje došlo po 1 opakování k velmi slabému odbarvení, které je na fotkách špatně viditelné. Po 5 opakováních je už výsledek výraznější, ale stále se nedá hovořit o tom, že by byla odbarvená celá plocha. Aby bylo docíleno optimální distribuce ozónu po celé ploše biopolymeru, muselo být ošetření zopakované celkem 8x. Malé neodbarvené zóny zůstaly u krajů Petriho misky, což mohlo být způsobeno prouděním plazmatu.

Výsledky můžeme vidět na obrázku 17. Nejvhodnější nastavení podmínek pro mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu je uvedeno v tabulce 13.

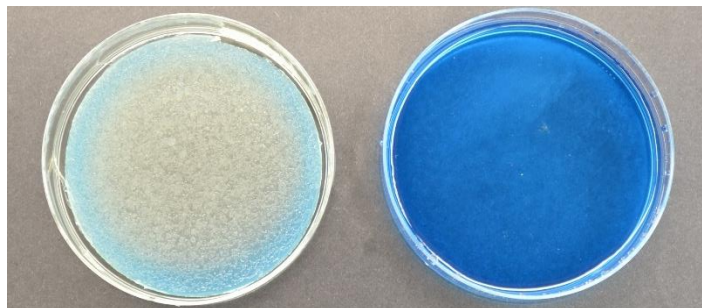


Obrázek 17: Celoplošné ošetření biopolymeru s příměsí indiga při použití mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu s výkonem 12 W a počtem opakování a) 1 opakování, b) 5 opakování, c) 8 opakování

Tabulka 13: Nastavení nejvhodnějších podmínek pro ošetření biopolymerů s příměsí indiga

Rychlost pohybu ($\mu\text{m/s}$)	250
Průtok plynu (slm)	5
Počet opakování (-)	8
Výkon (W)	12

Při následném použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou byly použity stejné podmínky, jako jsou uvedeny v tabulce 13. I v tomto případě byl biopolymer dostatečně odbarven až po 8. opakování, a i zde jsou viditelné špatně odbarvené zóny na krajích misky. Při použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou došlo k narušení struktury biopolymeru kvůli agresivnějšímu proudění v porovnání s ošetřenými vzorky pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu. Výsledek experimentu je znázorněn na obrázku 18.



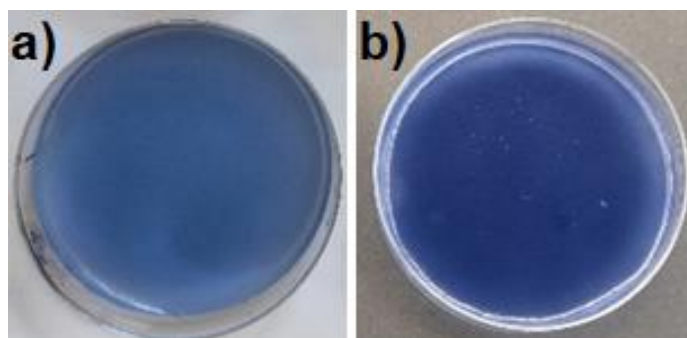
Obrázek 18: Porovnání ošetřeného biopolymeru po 8 opakování a neošetřeného biopolymeru

Celoplošné ošetření biopolymeru pomocí plazmatického výboje bylo provedeno také na vzorcích obsahujících jodid draselný a škrob. Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 byl připraven biopolymer. V tabulce 14 jsou uvedeny parametry ošetření. Tento experiment byl proveden s oběma využívanými výboji a jeho výsledky můžeme vidět na obrázku 19.

Tabulka 14: Nastavení nejvhodnějších podmínek pro ošetření biopolymerů s příměsí KI

Rychlost pohybu ($\mu\text{m/s}$)	500
Průtok plynu (slm)	5
Počet opakování (-)	1
Výkon (W)	12

Ze srovnání těchto dvou vzorků je patrné, že došlo k rychlejší barevné změně (1 opakování) u biopolymerů obsahující KI než u biopolymerů s obsahem indiga. To je způsobeno přispěním více částic než jen ozónu k rozkladu KI.



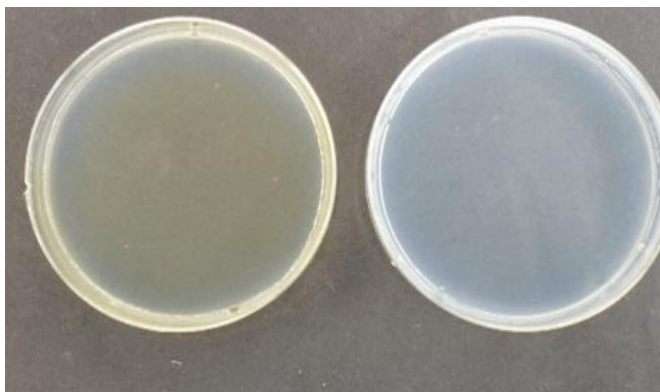
Obrázek 19: Celoplošně ošetřené biopolymery s příměsí KI a) pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu, b) pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou

V rámci této části experimentu byly celoplošně ošetřeny také biopolymery s příměsí barviv, která detekovala přítomnost RNS. Biopolymery byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3 a 3.3.4. Optimální podmínky ošetření jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Nastavení nejvhodnějších podmínek pro ošetření biopolymerů s příměsí barviv pro detekci RNS

Rychlost pohybu ($\mu\text{m/s}$)	250
Průtok plynu (slm)	5
Výkon (W)	12

Jak již bylo zmíněno výše, dusitany byly prokázány pouze u mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu a dusičnany jenom u mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou, což bylo potvrzeno i u celoplošného ošetření. Pro biopolymery s obsahem barviva pro detekci dusitanů byla zvolena 3 opakování ošetření a mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu, kdežto pro biopolymery s obsahem barviva pro detekci dusičnanů bylo zvoleno pouze 1 ošetření a mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou. Už po 1. ošetření je patrné žluté zbarvení biopolymeru s příměsí barviva pro detekci dusičnanů po celé ploše Petriho misky, což dokazuje přítomnost dusičnanů v plazmovém výboji. Po 3. ošetření biopolymeru s příměsí barviva pro detekci dusitanů je možné vidět růžové zbarvení po celé ploše biopolymeru, čímž můžeme potvrdit přítomnost dusitanů v plazmovém výboji. Výsledky můžeme vidět na obrázcích 20 a 21.



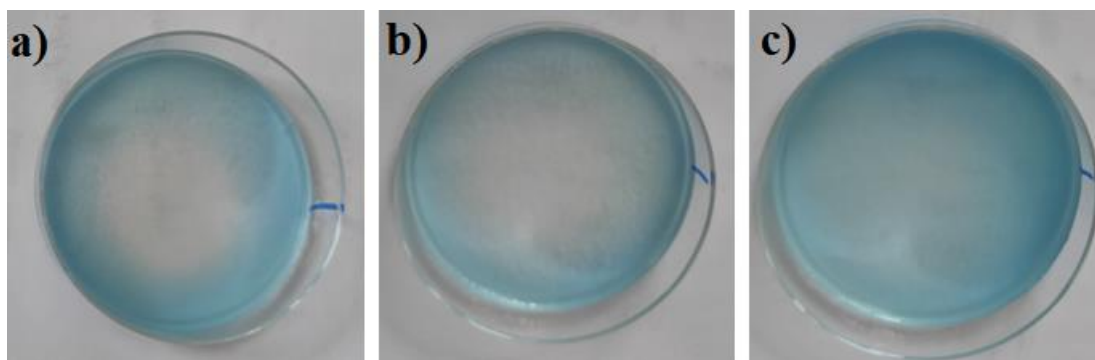
Obrázek 20: Celoplošně ošetřený biopolymer s příměsí barviva pro detekci dusičnanů pomocí mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou po 1 opakování v porovnání s neošetřeným biopolymerem



Obrázek 21: Celoplošně ošetřený biopolymer s příměsí barviva pro detekci dusitanů pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu po 3 opakováních

4.5 Optimalizace vzdálenosti plazmového výboje od povrchu biopolymeru

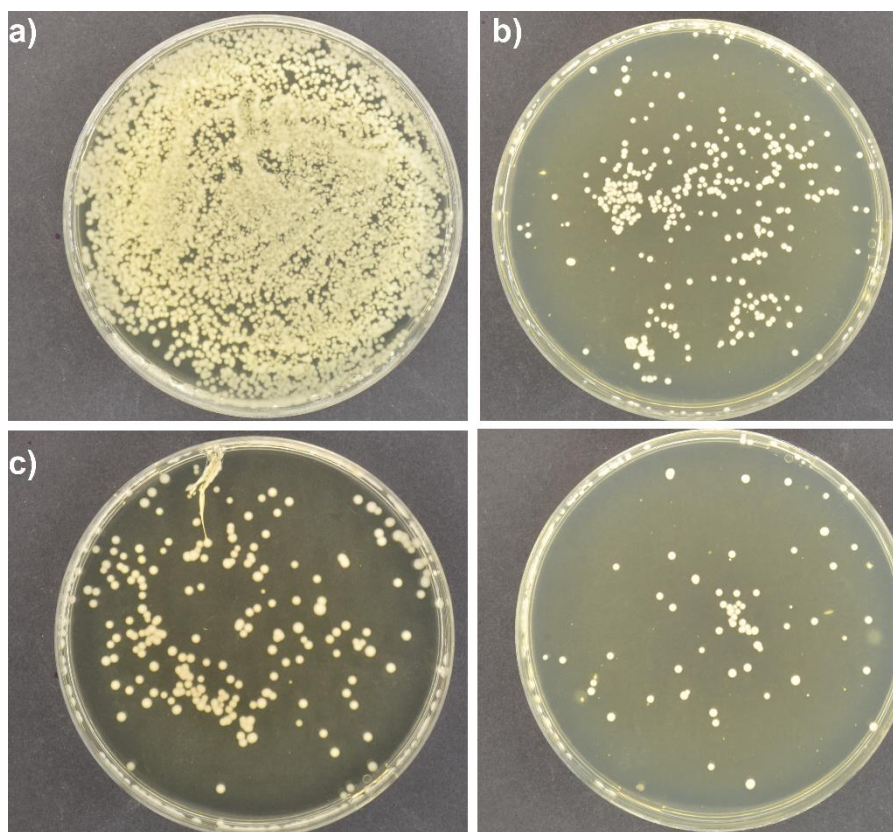
Podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.3 byl proveden experiment pro určení nejvhodnější vzdálenosti plazmového výboje od povrchu. Zatímco u vzorku a) byl přímý kontakt výboje s polymerem, u vzorku b) byl výboj vzdálen od povrchu 1,5 mm a u vzorku c) byl výboj vzdálen od povrchu vzdálen 10 mm. Výsledky měření můžeme vidět na obrázku 22, kde je patrné, že k největšímu rozptylu aktivních částic, a tak i k největšímu odbarvení plochy, došlo při 1,5 mm vzdálenosti plazmového výboje a povrchu biopolymeru.



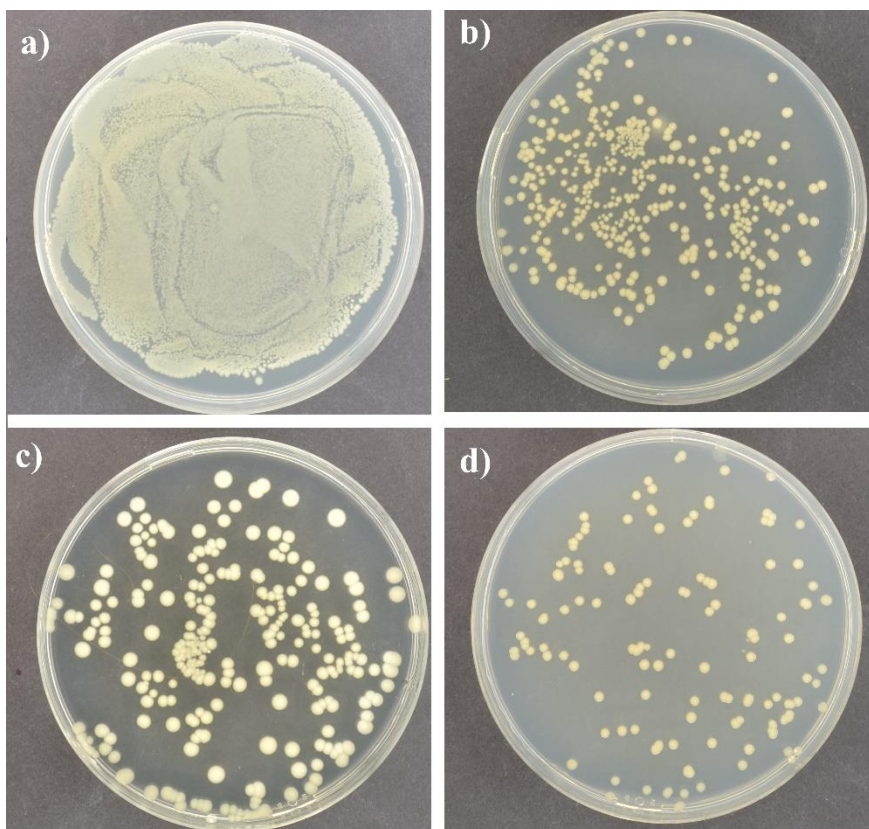
Obrázek 22: Bodové ošetření biopolymeru s přidavkem indiga pomocí mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu s výkonem 12 W a expozičním časem 500 s a s rozdílnými vzdálenostmi výboje od povrchu biopolymeru a) 0 mm, b) 1,5 mm, c) 10 mm

4.6 Celoplošné plazmatické ošetření mikrobiálních kultur

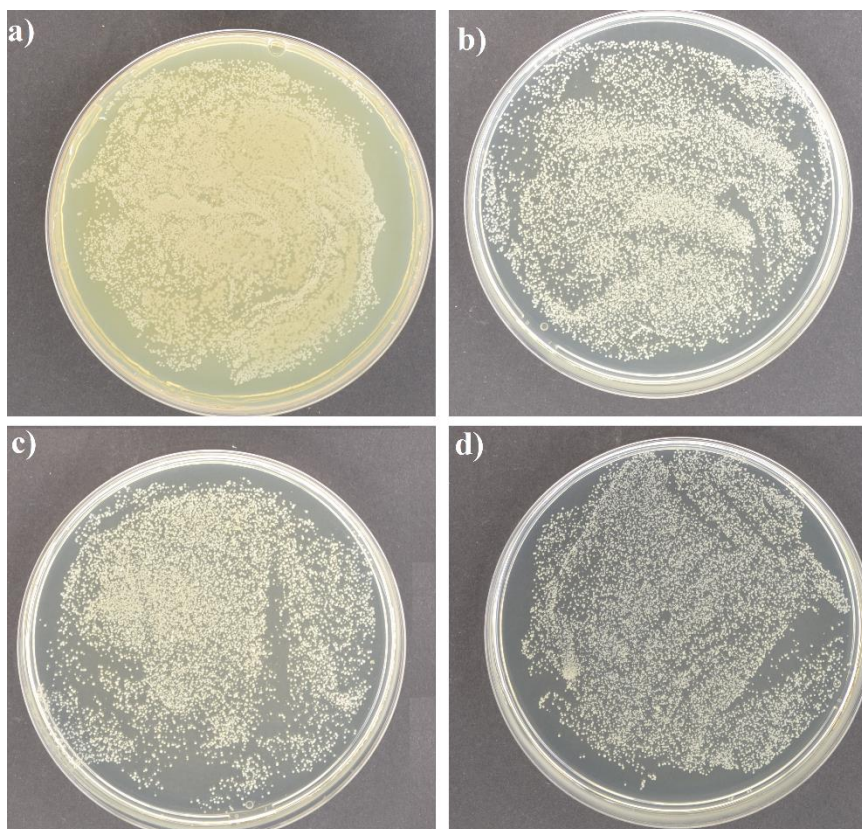
Podle postupu uvedeného v kapitole 3.6 byly na agarových plotnách připraveny mikrobiální kultury. Takto připravené kultury byly následně po celé ploše ošetřeny nízkoteplotním plazmatem využitím 3D stolu. Nejdříve byly ošetřeny samostatné kultury *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermidis*, poté byla ošetřena směsná kultura *C. glabrata* + *E. coli*. Na obrázcích níže (23–26) je uvedena vždy 1 reprezentativní fotografie z každého tripletu. Porovnáním pokryté plochy u kontroly a ošetřených vzorků můžeme jednoznačně vyhodnotit, že plazmový výboj má na kvasinky a bakterie značný inhibiční účinek. Vzorky ošetřené mikrovlnným pochodňovým výbojem s přímým přívodem plynu dosáhly vyššího inhibičního účinku než vzorky ošetřené mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou. Vzhledem k tomu, že dusitany byly prokázány pouze v mikrovlnném pochodňovém výboji s přímým přívodem plynu, je možné usoudit, že na inhibiční účinek mají mnohem větší vliv než dusičnany, které byly naopak prokázány pouze v mikrovlnném výboji s povrchovou vlnou. Při použití mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu došlo se zvýšením výkonu také ke zvýšení inhibičního účinku, což bylo prokázáno i bodovým ošetřením v předchozích pracích [55]. V případě mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu byly nejvíce na ošetření náchylné kultury *C. glabrata* s inhibičním účinkem 77,22 % a směsná kultura, která vykazovala inhibiční účinek 83,56 %. V případě mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou vykazovala největší inhibiční účinek 61,17 % opět kvasinka *C. glabrata*.



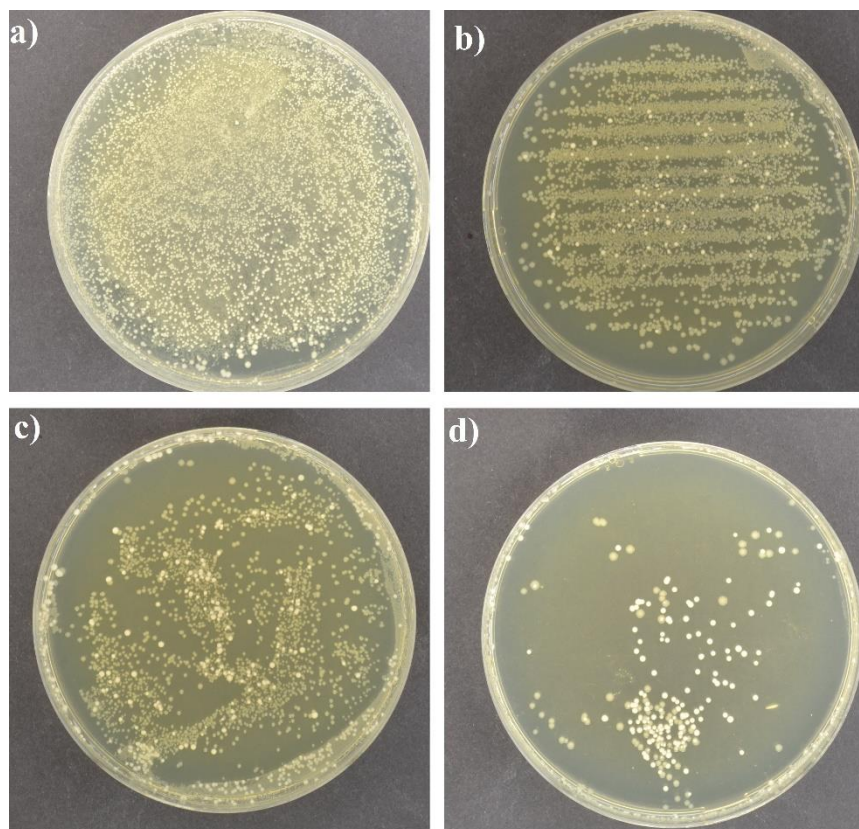
Obrázek 23: Vyobrazení inhibičního účinku plazmatu na kvasinku *C. glabrata* a) kontrolní vzorek, b) mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou – 9 W, c) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 9 W, d) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 12 W



Obrázek 24: Vyobrazení inhibičního účinku plazmatu na kvasinku *S. epidermidis* a) kontrolní vzorek, b) mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou – 9 W, c) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 9 W, d) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 12 W



Obrázek 25: Vyobrazení inhibičního účinku plazmatu na kvasinku *E. coli* a) kontrolní vzorek, b) mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou – 9 W, c) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 9 W, d) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 12 W



Obrázek 26: Vyobrazení inhibičního účinku plazmatu na směsnou kulturu *C. glabrata* + *E. coli*
 a) kontrolní vzorek, b) mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou – 9 W, c) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 9 W, d) mikrovlnný pochodňový výboj s přímým přívodem plynu – 12 W

S využitím algoritmu Aurora byl vyhodnocen průměrný účinek inhibice, který je uveden v tabulkách 16–19. Pro lepší přehlednost byly výsledky znázorněny také do grafu, který je možné vidět na obrázku 27.

Tabulka 16: Inhibiční účinek *Candida glabrata*

Vzorek CG	Mikrovlnný pochodňový výboj 12 W	Mikrovlnný pochodňový výboj 9 W	MW výboj s povrchovou vlnou 9 W
Účinek inhibice [%]	75,78	77,22	61,27
Odchylka [%]	0,07	0,08	0,15

Tabulka 17: Inhibiční účinek *Escherichia coli*

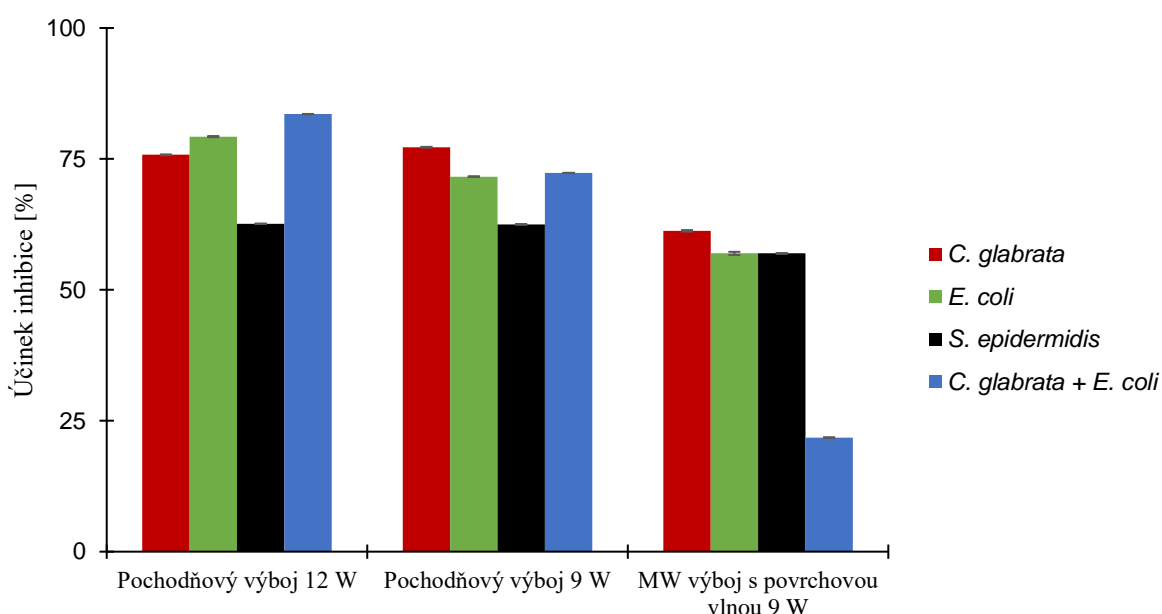
Vzorek EC	Mikrovlnný pochodňový výboj 12 W	Mikrovlnný pochodňový výboj 9 W	MW výboj s povrchovou vlnou 9 W
Účinek inhibice [%]	79,26	71,62	56,96
Odchylka [%]	0,11	0,06	0,30

Tabulka 18: Inhibiční účinek *Staphylococcus epidermidis*

Vzorek SE	Mikrovlnný pochodňový výboj 12 W	Mikrovlnný pochodňový výboj 9 W	MW výboj s povrchovou vlnou 9 W
Účinek inhibice [%]	62,62	62,49	56,96
Odchylka [%]	0,03	0,05	0,02

Tabulka 19: Inhibiční účinek *Escherichia coli* + *Candida glabrata*

Vzorek CG+EC	Mikrovlnný pochodňový výboj 12 W	Mikrovlnný pochodňový výboj 9 W	MW výboj s povrchovou vlnou 9 W
Účinek inhibice [%]	83,56	72,32	21,78
Odchylka [%]	0,03	0,03	0,01



Obrázek 27: Grafické znázornění inhibičního účinku plazmatu na mikrobiální kultury

Na obrázcích 23–26 je vidět, jak moc narostly neošetřené kultury po 24h kultivaci v teplotě 37 °C oproti ošetřeným kulturám. Porovnáním účinku inhibice můžeme jednoznačně vyhodnotit, že plazmový výboj má na kvasinky a bakterie inhibiční účinek, protože mikrobiální pokrytí na Petriho miskách neošetřené kultury je mnohem vyšší než u kultur ošetřených. Vzorky ošetřené mikrovlnným pochodňovým výbojem s přímým přívodem plynu dosáhly vyššího účinku inhibice než vzorky ošetřené mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou. U všech zkoumaných mikroorganismů došlo při zvýšení výkonu také ke zvýšení účinku inhibice. Dle naměřených dat možno také konstatovat, že gramnegativní bakterie (*E. coli*) jsou na ošetření náchylnější než grampozitivní (*S. epidermidis*). Tento trend je obecně platný i při léčbě antibiotiky a je způsoben odlišnou strukturou buněčné membrány grampozitivních a gramnegativních bakterií. Zatímco grampozitivní bakterie mají v membráně silnou vrstvu peptidoglykanu (mureinu) protkanou kyselinou teichovou, grampozitivní mají tuto vrstvu velmi tenkou a aktivní částice (RONS nebo jiné účinné látky) snáze penetrují dovnitř buňky

a způsobují tak její poškození [56]. Můžeme si také povšimnout vysoké účinnosti na kvasinku *C. glabrata* a také na kombinaci kvasinky *C. glabrata* a bakterie *E. coli*. Tato vysoká účinnost dokazuje účinnost plazmatu na široké spektrum mikroorganismů i jejich kombinace. V porovnání s bodovým ošetřením (30–300 s), které bylo detailně poměřeno v pracích kolegyně Petrové, Šrámkové, Kociánové a Trebulové, je plošné ošetření mnohem účinnější, ale i mnohem delší (1 opakování = 8 minut) [54], [55], [57], [58]. Výběr bodového nebo plošného ošetření tedy závisí na celkové ploše, kterou je nutné dekontaminovat.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na ošetření povrchu biopolymerů pomocí plazmatu. Cílem práce bylo najít optimální podmínky pro distribuci aktivních částic plazmatu na povrchu biopolymerů. S vybranými parametry bylo uskutečněno také celoplošné ošetření mikrobiálních kultur, na kterém byl sledován účinek inhibice.

Na základě předchozích prací byl vybrán biopolymer na bázi agaru, který adekvátně imituje fyzikální vlastnosti pokožky. Nejdříve bylo potřeba optimalizovat postup přípravy tohoto biopolymeru. Následně byly k biopolymeru přidána 4 různá barviva, která potvrdila přítomnost RNS i ROS v plazmatu. Při správně zvolených podmínkách došlo v průběhu bodového ošetření ke změně barvy u všech 4 druhů biopolymeru. Při odbarvení barviva indiga se potvrdila přítomnost ozónu, který způsobuje rozpad tohoto barviva, a tak i ztrátu charakteristického modrého zbarvení. Pokud byl k agaru a destilované vodě přidán také škrob a KI vznikl bezbarvý biopolymer, který se po plazmatickém ošetření začal tmavomodře zbarvovat. Tmavomodré zbarvení indikuje přítomnost ROS v plazmatu, které jsou zodpovědné za rozpad KI a následnou reakci jodu se škrobem. Ke vzniku zbarvení došlo mnohem rychleji než k odbarvení indiga. Při použití mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu se první známky tmavě modré barvy u KI biopolymerů začaly objevovat už po 30 s při výkonu 9 W, naproti tomu indigo se začalo odbarvovat až po 300 s při výkonu 12 W. Tato skutečnost je způsobena tím, že indigo reaguje pouze na ozón, kdežto KI reaguje na více druhů ROS. Při bodovém ošetření biopolymeru s přidavkem barviva pro detekci dusitanů bylo dosaženo růžového zbarvení, které potvrzuje přítomnost dusitanů v plazmatu. Dusitany byly pomocí testu potvrzeny pouze v pochodňovém výboji s přímým přívodem plynu a nikoli v plazmatu tvořeném mikrovlnným výbojem s povrchovou vlnou. Bylo také prokázáno rozložení částic v bodovém působení na základě proudění. Vzhledem k povaze výboje při použití mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou jsou aktivní částice více soustředěny do jednoho bodu. V případě pochodňového výboje jde o princip tornáda a uvnitř vyfukovaného plazmatu se tvoří „oko“, kde je koncentrace aktivních částic minimální.

V rámci experimentální části byla zkoumána také ideální vzdálenost výboje od povrchu biopolymeru. Při tomto testu byly porovnávány 3 různé vzdálenosti – přímý dotyk výboje s biopolymerem, 1,5 mm a 10 mm. Pokud byl výboj vzdálen od povrchu biopolymeru 1,5 mm, tak došlo k největšímu rozptylu částic po povrchu.

Aby byl vyvrácen vliv UV záření na barevnou změnu biopolymerů, tak byl biopolymer s obsahem indiga překryt křemenným sklem, které propouští UV záření, ale nepropouští RONS. Pokud byl biopolymer překryt tímto sklem, tak nedošlo k odbarvení modelu. Díky tomu můžeme potvrdit, že RONS jsou zodpovědné za reakce, které vedou ke změně barev.

Další částí experimentální práce bylo zjištění optimálních parametrů pro distribuci aktivních částic plazmatu po celé ploše biopolymeru. Pohybu plazmového výboje nad povrchem bylo dosaženo využitím 3D stolu. Toto zařízení umožňovalo měnit rychlost pohybu, souřadnice pohybu, průtok nosného plynu a výkon. Pro každý biopolymer byly nalezeny vhodné podmínky a jejich přehled je uveden v kapitole 4.4. U některých biopolymerů muselo být ošetření vícekrát opakováno, aby došlo k adekvátní distribuci částic po celé ploše. Při ošetření biopolymeru s příměsí indiga muselo být ošetření provedeno celkem 8x jak v případě mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu, tak i v případě mikrovlnného výboje

s povrchovou vlnou. Při ošetření biopolymeru s přísadkou KI a biopolymeru s přísadkou barviva pro detekci dusičnanů stačilo pouze 1 ošetření pro možné sledování změny barvy. V případě biopolymeru s přísadkou barviva pro detekci dusitanů, bylo nutné provést 3 ošetření.

Následně byly celoplošně ošetřené agarové plotny s jednotlivými kulturami *E. coli*, *C. glabrata* a *S. epidermidis* a směsná kultura *E. coli* + *C. glabrata*. Při tomto experimentu byly vždy použity 2 různé výkony a 2 různé výboje. Pomocí programu Aurora byla z fotografií vyhodnocena plocha, kterou porostly dané mikroorganismy. Byl potvrzen trend, že při zvýšeném výkonu dochází k navýšení mikrobiálního poklesu [55]. Ošetřené vzorky byly po 24h inkubaci vyfoceny. Ve všech případech bylo dosaženo vyššího mikrobiálního poklesu při použití mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu než mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou, jejíž výboj je více cílený na 1 bod. Z tohoto důvodu by bylo lepší v budoucnu zvolit nižší rychlost posuvu výboje nad povrchem. Zároveň by bylo výhodnější používat mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou při ošetření malých ploch. Veškeré výsledky tohoto měření byly přehledně zaznamenány do grafů.

Na závěr je možné shrnout, že cíle práce byly naplněny a došlo k nalezení optimálních podmínek distribuce aktivních částic plazmatu bodově i plošně. Po aplikaci těchto podmínek na ošetření agarových ploten s naočkovanými kulturami byly prokázány inhibiční účinky plazmatu na celé ošetřované ploše již po 1 opakování nastaveného cyklu.

6 ZDROJE

- [1] MARTIŠOVITŠ, V. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [2] KULHÁNEK, P. *Úvod do teórie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80-904582-2-2.
- [3] FRIDMAN, A. *Plasma chemistry*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008. ISBN 978-0-521-84735-3.
- [4] GRAVES, D. B. Low temperature plasma biomedicine: A tutorial review. *Physics of Plasmas*. 2014, **21**(8). ISSN 1070-664X. Dostupné z: doi:10.1063/1.4892534
- [5] LAROUSSE, M. Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art. *Plasma Processes and Polymers*. 2005, **2**(5), 391-400. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.200400078
- [6] HAYYAN, M., M. HASHIM a I. ALNASHEF. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*. 2016, **116**(5), 3029-3085. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00407
- [7] GLIGOROVSKI, S., R. STREKOWSKI, S. BARBATI a D. VIONE. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals (\bullet OH). *Chemical Reviews*. 2015, **115**(24), 13051-13092. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr500310b
- [8] LIPINSKI, B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011, **2011**, 1-9. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2011/809696
- [9] LYNGSIE, G., L. KRUMINA, A. TUNLID a P. PERSSON. Generation of hydroxyl radicals from reactions between a dimethoxyhydroquinone and iron oxide nanoparticles. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-29075-5
- [10] ABDOLLAHI, M. a A. HOSSEINI. Hydrogen Peroxide. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, 967-970. ISBN 9780123864550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00736-3
- [11] SOLÍS-LÓPEZ, M., A. DURÁN-MORENO, F. RIGAS, A.A. MORALES, M. NAVARRETE a R.M. RAMÍREZ-ZAMORA. Assessment of Copper Slag as a Sustainable Fenton-Type Photocatalyst for Water Disinfection. *Water Reclamation and Sustainability*. Elsevier, 2014, 199-227. ISBN 9780124116450. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-411645-0.00009-2
- [12] ONYANGO, A. N. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, **2016**, 1-22. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2016/2398573
- [13] GLAESER, J., A.M. NUSS, B.A. BERGHOFF a G. KLUG. *Singlet Oxygen Stress in Microorganisms*. Elsevier, 2011, 141-173. Advances in Microbial Physiology. ISBN 9780123810434. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381043-4.00004-0

- [14] TOLEDO, J. a O. AUGUSTO. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. *Chemical Research in Toxicology*. 2012, **25**(5), 975-989. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx300042g
- [15] SZABÓ, C., H. ISCHIROPOULOS a R. RADI. Peroxynitrite. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007, **6**(8). ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2222
- [16] HEINLIN, J., G. MORFILL, M. LANDTHALER, W. STOLZ, G. ISBARY, J. ZIMMERMANN, T. SHIMIZU a S. KARRER. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2010, **8**(12), 968-976. ISSN 16100379. Dostupné z: doi:10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x
- [17] LI, Y., L. NIE, S. JIN, C. SUN, X. LU a M. ADNAN. The Effect of Plasma on Bacteria and Normal Cells in Infected Wound. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022, **2022**, 1-11. ISSN 1942-0994. Dostupné z: doi:10.1155/2022/1838202
- [18] WEN, X., Y. XIN, M. HAMBLIN a X. JIANG. Applications of cold atmospheric plasma for transdermal drug delivery: a review. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021, **11**(3), 741-747. ISSN 2190-393X. Dostupné z: doi:10.1007/s13346-020-00808-2
- [19] CHOI, E., H. UHM a N. KAUSHIK. Plasma bioscience and its application to medicine. *AAPPS Bulletin*. 2021, **31**(1). ISSN 2309-4710. Dostupné z: doi:10.1007/s43673-021-00012-5
- [20] CHATRAIE, M., G. TORKAMAN, M. KHANI, H. SALEHI a B. SHOKRI. In vivo study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-24049-z
- [21] POOR, A., U. ERCAN, A. YOST, A. BROOKS a S. JOSHI. Control of Multi-Drug-Resistant Pathogens with Non-Thermal-Plasma-Treated Alginate Wound Dressing. *Surgical Infections*. 2014, **15**(3), 233-243. ISSN 1096-2964. Dostupné z: doi:10.1089/sur.2013.050
- [22] MOHAPATRA, S. Sterilization and Disinfection. *Essentials of Neuroanesthesia*. Elsevier, 2017, 929-944. ISBN 9780128052990. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805299-0.00059-2
- [23] SAKUDO, A., Y. YAGYU a T. ONODERA. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(20). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20205216
- [24] GUPTA, T. a H. AYAN. Application of Non-Thermal Plasma on Biofilm: A Review. *Applied Sciences*. 2019, **9**(17). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9173548
- [25] BORGES, A., K. KOSTOV, R. PESSOA, G. DE ABREU, G. LIMA, L. FIGUEIRA a C. KOGA-ITO. Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dentistry. *Applied Sciences*. 2021, **11**(5). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11051975

- [26] NARAYANAN, L. a C. VAISHNAVI. Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry*. 2010, **13**(4). ISSN 0972-0707. Dostupné z: doi:10.4103/0972-0707.73386
- [27] SLADEK, R. E. J., E. STOFFELS, R. WALRAVEN, P. J. A. TIELBEEK a R. A. KOOLHOVEN. Plasma Treatment of Dental Cavities: A Feasibility Study. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2004, **32**(4), 1540-1543. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2004.832636
- [28] MINČÍK, J. *Kariologie*. Praha: StomaTeam, 2014. ISBN 978-80-904377-2-2.
- [29] IZDEBSKA-PODSIADŁY, J. a E. DÖRSAM. Effects of argon low temperature plasma on PLA film surface and aging behaviors. *Vacuum*. 2017, **145**, 278-284. ISSN 0042207X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vacuum.2017.09.001
- [30] PASQUAL-MELO, G., T. NASCIMENTO, L. SANCHES et al. Plasma Treatment Limits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Development In Vitro and In Vivo. *Cancers*. 2020, **12**(7). ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12071993
- [31] THIRUMDAS, R., A. KOTHAKOTA, U. ANNAPURE, K. SILIVERU, R. BLUNDELL, R. GATT a V. VALDRAMIDIS. *Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture*. 2018, **77**, 21-31. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.05.007
- [32] SONI, A., J. CHOI a G. BRIGHTWELL. Plasma-Activated Water (PAW) as a Disinfection Technology for Bacterial Inactivation with a Focus on Fruit and Vegetables. *Foods*. 2021, **10**(1). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010166
- [33] ZHOU, R., R. ZHOU, P. WANG et al. Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2020, **53**(30). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab81cf
- [34] GUO, D., H. LIU, L. ZHOU, J. XIE a C. HE. Plasma-activated water production and its application in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, **101**(12), 4891-4899. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11258
- [35] ABUZAIRI, T., S. RAMADHANTY, D. PUSPOHADININGRUM, A. RATNASARI, N. POESPAWATI a R. PURNAMANINGSIH. *Investigation on physicochemical properties of plasma-activated water for the application of medical device sterilization*. 040017-. Dostupné z: doi:10.1063/1.5023987
- [36] ČIHÁK, R. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011-2016. ISBN 978-802-4756-363.
- [37] FIALA, P., J. VALENTA a L. EBERLOVÁ. *Stručná anatomie člověka*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-802-4626-932.
- [38] DąBROWSKA, A., G.-M. ROTARU, S. DERLER et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. *Skin Research and Technology*. 2016, **22**(1), 3-14. ISSN 0909752X. Dostupné z: doi:10.1111/srt.12235
- [39] JUSSILA, Jorma. Preparing ballistic gelatine—review and proposal for a standard method. *Forensic Science International*. 2004, **141**(2-3), 91-98. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2003.11.036

- [40] HWANG, H. Y. Piezoelectric particle-reinforced polyurethane for tactile sensing robot skin. *Mechanics of Composite Materials*. 2011, **47**(1), 137-144. ISSN 0191-5665. Dostupné z: doi:10.1007/s11029-011-9192-z
- [41] SALAZAR, A. On thermal diffusivity. *European Journal of Physics*. 2003, **24**(4), 351-358. ISSN 0143-0807. Dostupné z: doi:10.1088/0143-0807/24/4/353
- [42] BRABCOVÁ, S. *Péče o rány: pro sestry a ostatní nelékařské profese*. Praha: Grada Publishing, 2021. Sestra (Grada). ISBN 978-80-271-3133-4.
- [43] KOUŘILOVÁ, I. *Lokální ošetřování ran a defektů na kůži*. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4726-823.
- [44] HLINKOVÁ, E., J. NEMCOVÁ a E. HUĽO. *Management chronických ran*. Praha: Grada Publishing, 2019. Sestra (Grada). ISBN 978-80-271-0620-2.
- [45] BARTUŇKOVÁ, J., A. ŠEDIVÁ a A. JANDA. *Imunodeficiency*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1980-1.
- [46] FELIX, E., K. DE SOUZA, C. DIAS a A. CARDOSO. Measurements of Ambient Ozone Using Indigo Blue-Coated Filters. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2006, **89**(2), 480-485. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/89.2.480
- [47] BADER, H. a J. HOIGNÉ. Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Research*. 1981, **15**(4), 449-456. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/0043-1354(81)90054-3
- [48] WANG, H., L. JIANG, H. WU et al. *Biocompatible Iodine–Starch–Alginate Hydrogel for Tumor Photothermal Therapy*. 2019, **5**(7), 3654-3662. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00280
- [49] GIUSTARINI, D., R. ROSSI, A. MILZANI a I. DALLE-DONNE. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Nitric Oxide, Part F*. Elsevier, 2008, 361-380. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780123739674. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(07)00823-3
- [50] KUMAR, K., F. ASKARI, M. SAHU a R. KAUR. *Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye*. *Microorganisms*. 2019, **7**(2). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7020039
- [51] JNANI, D. a S. RAY. *Escherichia coli*. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2022. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824315-2.00190-1
- [52] DESMARCHELIER, P. a N. FEGAN. *Pathogens in Milk: Escherichia coli*. *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016. ISBN 9780081005965. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.00989-6
- [53] OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis — the 'accidental' pathogen*. *Nature Reviews Microbiology*. 2009, **7**(8), 555-567. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2182
- [54] PETROVÁ, V. *Studium přímé aplikace nízkoteplotního plazmatu na kvasinky Candida Glabrata a bakterie*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav->

- prace/detail/147928. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce František Krčma.
- [55] TREBULOVÁ, K., F. KRČMA, Z. KOZÁKOVÁ a P. MATOUŠKOVÁ. Impact of Microwave Plasma Torch on the Yeast *Candida glabrata*. *Applied Sciences*. 2020, **10**(16). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165538
- [56] KAKOULLIS, L., E. PAPACHRISTODOULOU, P. CHRA a G. PANOS. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics*. 2021, **10**(4). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10040415
- [57] ŠRÁMKOVÁ, S. *Využití plazmatu a plazmatem aktivované vody pro podporu hojení ran*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147866>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
- [58] KOČIANOVÁ, M. *Využití plazmatu a plazmatem aktivované vody v kosmetice*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147865>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Zdenka Kozáková.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	–	Adenosintrifosfát
CAP	–	Studené atmosférické plazma
DNA	–	Deoxyribonukleová kyselina
LB	–	Lennox Broth
NB	–	Nutrient Broth
PAW	–	Plazmatem ošetřená voda
RNS	–	Reaktivní formy kyslíku
RONS	–	Reaktivní částice
ROS	–	Reaktivní formy kyslíku
sCG	–	Guanylátcyklázy
SOD	–	Superoxid dismutáza
YDP	–	Yeast Extract

8 PŘÍLOHY

8.1 Souřadnice pohybu mikrovlnného pochodňového výboje s přímým přívodem plynu

8.1.1 Bodového ošetření Petriho misky Ø 55 mm

G28 X Y Z

G1 Z0

G1 F3000

G1 X217 Y47

G4 S30

G28 X Y Z

8.1.2 Bodové ošetření Petriho misky Ø 90 mm

G28 X Y Z

G1 Z0

G1 F3000

G1 X190 Y47

G4 S30

G28 X Y Z

8.1.3 Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 55 mm

G28 X Y Z

G1 Z0

G1 X186 Y80 G1 F3000

G1 X248 F250

G1 Y75

G1 X186

G1 Y70

G1 X248

G1 Y65

G1 X186

G1 Y60

G1 X248

G1 Y55

G1 X186

G1 Y50

G1 X248

G1 Y45

G1 X186

G1 Y40

G1 X248

G1 Y35

G1 X186

G1 Y30
G1 X248
G1 Y25
G1 X248
G28 X Y Z F3000

8.1.4 Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm

G28 X Y Z
G1 Z0
G1 X137 Y100 G1 F3000
G1 X243 F250
G1 Y95
G1 X137
G1 Y90
G1 X243
G1 Y85
G1 X137
G1 Y80
G1 X243
G1 Y75
G1 X137
G1 Y70
G1 X243
G1 Y65
G1 X137
G1 Y60
G1 X243
G1 Y55
G1 X137
G1 Y50
G1 X243
G1 Y45
G1 X137
G1 Y40
G1 X243
G1 Y35
G1 X137
G1 Y30
G1 X243
G1 Y25
G1 X137
G1 Y20
G1 X243

G1 Y15
G1 X137
G1 Y10
G1 X243
G1 Y5
G1 X137
G1 Y0
G1 X243
G28 X Y Z F3000

8.2 Souřadnice pohybu mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou

8.2.1 Bodového ošetření Petriho misky Ø 55 mm

G28 U X Y Z
G1 Z0
G1 F3000
G1 U205 Y137
G4 S30
G28 U X Y Z

8.2.2 Bodového ošetření Petriho misky Ø 90 mm

G28 U X Y Z
G1 Z0
G1 F3000
G1 U175 Y138
G4 S30
G28 U X Y Z

8.2.3 Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm

G28 U X Y Z
G1 Z0
G1 U171 Y165 G1 F3000
G1 U239 F250
G1 Y160
G1 U239
G1 Y155
G1 U171
G1 Y150
G1 U239
G1 Y145
G1 U171
G1 Y140
G1 U239
G1 Y135

G1 U171
G1 Y130
G1 U239
G1 Y125
G1 U171
G1 Y120
G1 U239
G1 Y115
G1 U171
G1 Y110
G1 U239
G1 Y105
G28 U X Y Z F3000

8.2.4 Celoplošné ošetření Petriho misky Ø 90 mm

G28 U Y Z
G1 Z0
G1 U133 Y190 G1 F3000
G1 U237 F250
G1 Y185
G1 U130
G1 Y180
G1 U237
G1 Y175
G1 U130
G1 Y170
G1 U237
G1 Y165
G1 U130
G1 Y160
G1 U237
G1 Y155
G1 U130
G1 Y150
G1 U237
G1 Y145
G1 U130
G1 Y140
G1 U237
G1 Y135
G1 U130
G1 Y130
G1 U237

G1 Y125
G1 U130
G1 Y120
G1 U237
G1 Y115
G1 U130
G1 Y110
G1 U237
G1 Y105
G1 U130
G1 Y100
G1 U237
G1 Y95
G1 U130
G1 Y90
G1 U237
G1 Y85
G1 U130
G28 U Y Z F3000