VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHARAKTERIZACE A APLIKACE MIKROVLNNÉHO PLAZMATU PRO HOJENÍ RAN

CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF MICROWAVE PLASMA ON WOUND HEALING

DIPLOMOVÁ PRÁCE MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE AUTHOR Bc. Darina Truchlá

VEDOUCÍ PRÁCE SUPERVISOR

doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2020



Zadání diplomové práce

Akademický rok:

2019/20

Číslo práce:	FCH-DIP1417/2019
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka:	Bc. Darina Truchlá
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce:	doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

Název diplomové práce:

Charakterizace a aplikace mikrovlnného plazmatu pro hojení ran

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je charakterizace mikrovlnného plazmatu buzeného v argonu a jeho aplikace pro zlepšení hojení ran. Tato aplikace bude řešena ve spolupráci s Medicínskou univerzitou v Sofii. Detailní úkoly jsou následující:

- 1. Prostudujte současný stav aplikace nízkoteplotního plazmatu v oblasti hojení ran
- 2. Charakterizujte pomocí optické emisní spektrometrie rozdělení aktivních částic v mikrovlnném výboji
- 3. Pokuste se na modelu kůže verifikovat rozdělení aktivních částic po interakci s plazmatem
- 4. Aplikujte mikrovlnné plazma pro hojení uměle vytvořených ran na laboratorních myších

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Darina Truchlá student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

Abstract

Non-thermal plasma has a lot of ways for using in nowadays medicine. It presents many useful actions like charged particles, UV light, electric field, radicals, excited atoms and molecules. That complicated chemistry directs to uncountable synergistic interaction between cold plasma and biological systems, involve cells and tissues. This thesis is about effects of cold plasma to wound healing.

Two different microwave plasma systems were used for the presented study. The first one was argon plasma torch generated by surface wave using the quartz capillary, the second one was plasma torch with reverse vortex argon flow.

Diagnostics of plasma jet by optical emission spectroscopy shown the presence of active particles, which are responsible for a lot of impact of plasma treatment. Concentrations of active particles generated by plasma are dependent on conditions of plasma generation like power of generator and gas flow.

For visual evidence of effects on skin caused by active particles was created simulation of skin tissue. Interaction between plasma jet and artificial skin tissue shown that UV light and temperature are not responsible for all observed effects which are noticed after plasma treatment.

Some part of experiments was realized in collaboration with Medical University of Sofia in Bulgaria. The theory of positive effect to wound healing was supported by experiments based on treating artificially created wounds on laboratory mice by cold plasma.

It was proved, that process of wound healing is significantly shorter after using plasma treatment in comparison with normal wound healing. Plasma treating of wound for 10 seconds in two consequent days seems like more effectively than application of plasma only one day.

This Thesis was carried out as a part of international project PLASMABORDER that was supported by European commission under cohesion funds; programme INTEREG SK-CZ under contract No. 304011P709.

KEYWORDS

microwave cold atmospheric plasma, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, plasma medicine, wound healing, optical emission spectroscopy.

Abstrakt

Nízkoteplotná plazma nachádza veľké využitie v súčasnej medicíne. Predstavuje celú radu aktívnych častí ako sú nabité častice, UV žiarenie, elektrické pole, radikály, excitované atómy a molekuly. Táto komplikovaná chémia vedie k nespočetným interakciám medzi studenou plazmou a biologickými systémami, vrátane buniek a tkanív. Synergia účinkov týchto premenných ponúka široké spektrum priaznivých účinkov na organizmus. Táto práca sa venuje účinku studenej plazmy na hojenie rán.

V tejto štúdií boli použité dva rôzne typy systémov mikrovlnnej plazmy. Prvým bol plazmatický výboj generovaný povrchovou vlnou v argóne s použitím kremennej kapiláry, druhým bol fakľový výboj so spätným vírovým prúdením pracovného plynu.

Diagnostika plazmovej trysky prostredníctvom optickej emisnej spektroskopie ukázala prítomnosť aktívnych častíc vo výboji, ktoré sú zodpovedné za mnohé z účinkov plazmy. Koncentrácie aktívnych častíc generovaných plazmou závisia na podmienkach generácie plazmy, ako sú výkon generátora a prietok pracovného plynu.

Pre vizuálny dôkaz účinkov aktívnych častíc na kožu bola pripravená simulácia kožného tkaniva. Interakcia medzi plazmatickou tryskou a umelým kožným tkanivom ukázala, že UV žiarenie a teplota nie sú zodpovedné za všetky efekty, ktoré sú pozorované po aplikácii plazmy.

Časť experimentov bola realizovaná v spolupráci s Lekárskou univerzitou v Sofii v Bulharsku. Teória urýchleného liečenia rán spôsobeného plazmou bola podporená pozorovaním účinkov plazmy na umelo vytvorené rany laboratórnych myší.

Bolo dokázané, že proces hojenia rán je významne kratší po použití plazmovej terapie v porovnaní s prirodzeným hojením. Aplikácia plazmy v trvaní 10 sekúnd, opakovaná s odstupom jedného dňa sa javí ako efektívnejšia ako aplikácia plazmy len jeden deň.

Táto práca je súčasťou medzinárodného projektu PLASMABORDER, programu Interreg V-A Slovenská republika – Česká republika, s registračným číslom 304011P709, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

mikrovlnná nízkoteplotná atmosférická plazma, reaktívne častice kyslíka, reaktívne častice dusíka, plazma v medicíne, hojenie rán, optická emisná spektroskopia

TRUCHLÁ, Darina. *Charakterizace a aplikace mikrovlnného plazmatu pro hojení ran.* Brno, 2020. Diplomová práce. 66 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. RNDr. František Krčma, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z pohľadu obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať pánovi doc. RNDr. Františkovi Krčmovi, Ph.D za profesionálny prístup, cenné rady a trpezlivosť pri vypracovávaní mojej diplomovej práce. Práca bola vypracovaná v spolupráci s Lekárskou univerzitou v Sofii, kde pôsobí asst. prof. Todor Bogdanov a doc. Lubomir Traikov, ktorým tiež patrí veľká vďaka. Možnosť zúčastniť sa odbornej stáži v Bulharsku bola sprostredkovaná programom CEEPUS.

Výsledky experimentálnej časti diplomovej práce budú prezentované v projekte pod názvom Posilnenie výskumno-vývojovej kapacity Slovensko-českého cezhraničného regiónu v oblasti plazmových technológií pre medicínske použitie, s reg. číslom 304011P709 pod akronymom PLASMABORDER, operačného programu Interreg V-A Slovenská republika – Česká republika, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Cieľom projektu je vývoj funkčného plazmového pera pre medicínske použitie.

Obsah

Ab	stract		3	
Ab	strakt		4	
Ob	sah		6	
1	Úvod		7	
2	TEORE	TICKÁ ČASŤ	9	
	2.1	Definícia plazmy	9	
	2.2	Generácia plazmy		
	2.3	Reaktívne častice kyslíka a dusíka	12	
	2.4	Diagnostika plazmy	16	
	2.5	Interakcia plazmy s mikroorganizmami	16	
	2.6	Plazma v zubnom lekárstve		
	2.7	Antitumorový účinok plazmy	19	
	2.8	Hojenie rán	19	
	2.9	Účinky plazmy pri hojení rán		
	2.10	Zvieracie experimentálne modely v procese hojenia rán		
3 Experimentálna časť		24		
	3.1	Diagnostika plazmy optickou emisnou spektroskopiou		
	3.2	Verifikácia účinkov plazmy na modeli kože		
	3.3	Priama aplikácia plazmy na zvieraciu kožu		
4	Výsledky			
	4.1	Diagnostika plazmy optickou emisnou spektroskopiou		
	4.2	Vizuálny dôkaz prítomnosti aktívnych častíc		
	4.3	Aplikácia plazmy na hojenie umelo vytvorených rán na koži myší		
5	Záver		50	
6	Zoznam	použitých skratiek		
7	Literatúra 53			
0				
8	Priloha			

1 Úvod

V súčasnosti sa venuje veľká pozornosť nízkoteplotnej, alebo tiež studenej plazme (CAP). Stále populárnejšou sa stáva najmä vo svete medicíny. Toto štvrté skupenstvo hmoty totiž disponuje mnohými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, ktoré by mohli mať v medicíne nejedno využitie.

Plazma je veľkým prínosom pre medicínu hneď v troch rôznych spôsoboch použitia, a to sterilizácou povrchov, pri syntéze a modifikácií medicínskych materiálov, ale aj priamou interakciou s organizmom. Studená plazma dokáže inaktivovať široké spektrum mikroorganizmov bez použitia toxických látok a účinku tepla, a je teda vhodným prostriedkom na sterilizáciu nástrojov a termosenzitívnych materiálov využívaných v medicíne.

Využitie nachádza plazma aj pri syntézach a modifikáciách rôznych materiálov používaných pre biomedicínske aplikácie. Takými látkami sú napríklad nanočastice. Je známe využitie nanočastíc drahých kovov ako Au, Ag, Pt a Pd. Najčastejšou formou výroby nanočastíc je chemická syntéza, pri ktorej sú často používané toxické látky ako oxidačné alebo redukčné činidlá. Syntézou nanočastíc pomocou účinkov plazmy je možné dosiahnuť veľmi dobrú uniformitu veľkosti týchto častíc, a zároveň je ich veľkosť jednoducho modulovaná zmenou podmienok prípravy. V neposlednom rade poskytuje takáto syntéza kontrolu nad toxicitou nanomateriálov. Reaktívne častice kyslíka a dusíka vytvorené v nízkoteplotnej plazme poskytujú redukciu kovových iónov v kvapaline, a teda zabezpečujú vznik kovových nanočastíc bez použitia redukčných činidiel. Syntézou nanočastíc pomocou plazmy sú znížené náklady na prípravu, a zároveň je znížená toxicita takto vytvorených častíc [1, 2].

Vďaka viacerým efektom, ku ktorým dochádza pri kontakte s biologickými objektmi, je ďalšou oblasťou výskumu prínosu studenej plazmy v medicíne priama interakcia s ľudským organizmom. Plazmová medicína prináša alternatívy liečby mnohých ochorení. Princípom biologických účinkov je fakt, že nízkoteplotná plazma indukuje v bunkách zmeny vnútorného prostredia. V plazme sa tvoria reaktívne častice kyslíka (ROS) a dusíka (RNS). Medzi ďalšie komponenty plazmy patrí UV žiarenie a elektrické pole [3].

Niekoľko štúdií zameraných na liečbu nádorových ochorení s použitím nízkoteplotnej plazmy, označuje tento spôsob terapie za veľmi perspektívny. Štúdie dokazujú, že pri vyšších expozičných časoch dokáže nízkoteplotná plazma selektívne inhibovať bunkovú proliferáciu v nádorových bunkách, alebo v nich dokáže spustiť apoptózu vo vyššej miere v porovnaní s normálnymi bunkami [4 - 13].

Ďalší potenciál plazmovej technológie v priamej interakcii s ľudským organizmom je v zubnom lekárstve. Už spomínané dekontaminačné účinky plazmy môžu byť využívané aj v dutine ústnej. Vďaka schopnosti plazmy prenikať aj do veľmi členitých a zložitých útvarov, je dezinfekcia koreňových kanálikov plazmou efektívnejšia ako čistenie doteraz používanými technológiami [14 – 16].

Táto práca je zameraná na preukázanie zlepšenia hojenia rán účinkami plazmy. Pozitív plazmovej terapie na hojenie rán je niekoľko. Medzi prvé patrí dezinfekcia rany. Infekcia rany spôsobená mikroorganizmami hojenie komplikuje a spomaľuje. Je preukázané, že bežne vyskytujúce sa baktérie pri infekciách rany ako sú *Staphylococcus aureus, Staphylococcus*

epidermidis, Bacillus cereus atď., sú účinne inaktivované po pôsobení nízkoteplotnej plazmy. Baktérie nevykazujú ani po viacnásobnom pôsobení plazmou žiadnu rezistenciu, na rozdiel od antibiotík [17,18]. Ďalším pozitívom liečby rán plazmou je fakt, že plazmy výrazne urýchľuje koaguláciu krvi. Plazmový výboj taktiež podporuje regeneráciu tkanív a urýchľuje hojenie rán [19, 20].

Takáto terapia môže byť naordinovaná pacientom s ochorením Diabetes mellitus, ktoré okrem iného prináša problémy so zle hojacimi sa ranami. Pacienti sú často postihnutí problémom nehojacich sa ulcerácií na dolných končatinách. Chronické rany v mnohých prípadoch vyústia do stavu, kedy jediným riešením pre pacienta je amputácia dolných končatín. Toto ochorenie je známe pod názvom diabetická noha. Na jej vzniku sa podieľa mnoho imunitných faktorov ako zvýšená náchylnosť na infekciu, oslabená systémová odpoveď na zápal a dysfunkcia imunitného systém [21].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Definícia plazmy

Plazma je ionizovaný kvazineutrálny plyn, zložený z nabitých a neutrálnych častíc. V prostredí plazmy je koncentrácia kladne nabitých častíc vzhľadom k časticiam, záporne nabitým iónom a elektrónom približne rovnaká, čo je označované ako kvazineutralita. Vďaka tomu sa v dostatočne veľkom objeme plazma javí ako elektricky neutrálne prostredie. Častice, nachádzajúce sa v plazme vykazujú kolektívne správanie, teda ich pohyb je závislý na lokálnych podmienkach a stave plazmy vo vzdialených oblastiach [22-28].

Okrem kvazineutrality a kolektívneho správania častíc, musí ionizovaný plyn spĺňať ďalšie podmienky, aby mohol byť považovaný za plazmu.

Lineárne rozmery plazmy *l* musia byť oveľa väčšie ako charakteristická dĺžka *h_D* –
 Debeyova dĺžka

$$h_D = \frac{1}{e} \sqrt{\frac{\varepsilon_0 k T_e}{n_e}}, \qquad (1)$$

kde T_e je teplota elektrónov, n_e je koncentrácia elektrónov, k je Boltzmannova konštanta, ε_0 je permitivita vákua a e je náboj elektrónu.

- Celkový počet nabitých častíc v Debeyovej sfére N_D musí spĺňať podmienku

$$N_D >>> 1, \tag{2}$$

mechanizmus Debeyovho tienenia platí, ak je v Debeyovej sfére dostatočné množstvo častíc

$$N_D = \frac{4}{3}\pi h_D^3 n.$$
(3)

 Frekvencia elektrónových fluktuačných oscilácií plazmy, takzvaná plazmová frekvencia, musí byť väčšia ako zrážková frekvencia [23, 27, 29, 30].

V závislosti na strednej kinetickej energii častíc plazmy, delíme plazmu na nízkoteplotnú a vysokoteplotnú. Plazmu považujeme za vysokoteplotnú v prípade, keď je stredná energia nabitých častíc väčšia ako 100 eV, teda teplota väčšia ako 1 MK. Takáto plazma je aj silne ionizovaná a nachádza využitie v experimentoch s riadenou termonukleárnou syntézou [23].

Nízkoteplotná plazma má nízky podiel ionizovaných častíc, teplota iónov je takmer rovná teplote okolia, avšak rýchlosť pohybu elektrónov odpovedá teplote až niekoľko tisíc stupňov. Výhodou takejto plazmy sú nízke energetické náklady a vďaka teplote blízkej teplote ľudského tela je možné takúto plazmu použiť na biomedicínske aplikácie [31].

Keďže plazma obsahuje voľné elektrické náboje je elektricky vodivá. Elektrická vodivosť slabo ionizovanej plazmy je priamo úmerná koncentrácií nabitých častíc v plazme. Pri konštantnej koncentrácii vodivosť klesá s rastúcou teplotou elektrónov. Elektrická

vodivosť silne ionizovanej plazmy je nezávislá na koncentrácií nabitých častíc ale narastá s teplotou elektrónov, čím sa môže stať plazma vodivejšou ako kovové vodiče.

Na pohybujúce sa voľné elektrické náboje pôsobí Lorentzova sila, ktorá bráni pohybu nabitých častíc plazmy v kolmom smere na magnetické siločiary. Na plazmu teda pôsobí aj magnetické pole. V smere siločiar, sa účinky magnetického poľa neprejavujú [23].

2.2 Generácia plazmy

Pre vznik plazmy je dôležité dodať plynu energiu aby došlo k jeho ionizácii, pričom zdrojom môže byť tepelná energia, svetelná energia alebo elektrická energia.

Zvyšovaním teploty plynu rastie kinetická energia molekúl a pri ich vzájomných zrážkach dochádza k ich ionizácii. Ionizáciou vznikne dvojica elektrón a kladný ión. U molekulových plynov nastáva po zahriatí najskôr disociácia molekúl na atómy a následne ionizácia zrážkami atómov [23].

Pri fotoionizácii dochádza k absorpcii fotónu atómom a molekulou plynu. Energia fotónu musí byť však rovnaká alebo vyššia ako ionizačná energia atómu, ktorý fotón absorbuje.

Generácia plazmy elektrickým výbojom je založená na vzniku elektrického poľa v plazme. V elektrickom poli získavajú elektróny kinetickú energiu, ktorou ionizujú atómy a molekuly plynu.

Plazma je udržiavaná pomocou elektrického a magnetického poľa, použitím jednosmerného alebo striedavého napätia s rôznymi frekvenciami. V prípade jednosmerného napätia vzniká DC plazma budená elektrickým poľom a striedavé napätie tvorí plazmu budená elektromagnetickým poľom. Podľa frekvencie poľa môžeme ďalej plazmu budenú striedavým napätím rozdeliť na nízkofrekvenčnú, rádiofrekvenčnú a mikrovlnnú [32].

Na generáciu plazmy sa používajú rôzne plyny ako dusík a hélium no najčastejšie je to argón. Existuje niekoľko spôsobov generácie nízkoteplotnej plazmy ako dielektrický bariérový výboj (DBD), plazmová tryska pri atmosférickom tlaku (APPJ), plazma generovaná výbojom s povrchovou vlnou, plazmová ihla alebo plazmová ceruzka.

2.2.1 Dielektrický bariérový výboj (DBD)

Princíp dielektrického bariérového výboja, spočíva v prítomnosti dielektrika medzi dvoma elektródami. DBD pozostáva z dvoch kovových elektród, ktoré sú pokryté dielektrickým materiálom. Nosný plyn sa pohybuje medzi týmito dvomi elektródami a jeho ionizáciou vzniká plazma. Jedna elektróda je vysokonapäťová a druhá je uzemnená. Na vytvorenie plazmy je potrebné vysoké napätie najčastejšie s frekvenciami v rozsahu kHz.

Neskôr boli vyvinuté dielektrické bariérové výboje s pohyblivou elektródou (FE-DBD). Rozdiel medzi FE-DBD a DBD je v tom, že druhá elektróda nie je uzemnená, teda druhou elektródou môže byť ľudská koža, vzorka alebo orgán. Schéma oboch zariadení je znázornená na obrázku 1. V medicíne sa takýmto výbojom pôsobí na bunky melanómu, endotelové bunky, na koaguláciu krvi alebo na sterilizáciu živých tkanív [33].



Obrázok 1:Schéma A – zariadenie pre dielektrické bariérové výboje; schéma B – zariadenie pre dielektrické bariérové výboje s pohyblivou elektródou [33].

2.2.2 Plazmová tryska pracujúca pri atmosférickom tlaku

Ďalším typom prístroja na generáciu plazmy je plazmová tryska za atmosférického tlaku (APPJ). APPJ pozostáva z dvoch koaxiálnych elektród, medzi ktorými prúdi nosný plyn. Prístroj je schematicky znázornený na obrázku 2. Katóda vyrobená z volfrámu alebo nehrdzavejúcej ocele je pripojená na rádiofrekvenčný zdroj (13,56 MHz) a anóda je uzemnená. Nosným plynom je najčastejšie hélium. Takto generovaná plazma je vhodným nástrojom na deaktiváciu mikroorganizmov ako napríklad *E.coli* [33].



Obrázok 2: Schéma zariadenia plazmovej trysky pracujúcej pri atmosférickom tlaku [33].

2.2.3 Mikrovlnná plazma udržiavaná povrchovou vlnou

Frekvencie budiaceho poľa sú v rozmedzí od 10 MHz do 10 GHz. Energia je dodávaná z výkonového toku elektromagnetických vĺn, šíriacich sa plazmatickým stĺpcom. Mikrovlny energiu predajú plazmovým elektrónom, a tie sa zrážajú s ťažšími časticami. Elektromagnetické vlny šíriace sa médiom, môžu byť priestorové alebo povrchové. Rozdiel medzi priestorovými a povrchovými je ten, že povrchové vlny sa šíria pozdĺž hranice média, zatiaľ čo priestorové sa šíria vo všetkých smeroch. Zdrojom povrchových vĺn na generáciu a udržiavanie mikrovlnných plazmových stĺpcov je surfatron. Povrchová vlna vzniká prierazom vo výbojovej trubici v ose surfatronu. Surfatron je znázornený na obrázku 3. Keď elektrónová hustota n v mieste zapálenia prekročí hodnotu elektrónovej hustoty odpovedajúcej rezonancii povrchovej vlny n_d , povrchová vlna sa rozšíri. Vlna sa šíri až

do vzdialenosti, kde $n = n_d$, a následne sa odrazí naspäť. Elektróny sú vďaka pozdĺžnym gradientom elektrického poľa vypudzované vpred, formujú ionizačné čelo, ktoré predlžuje plazmový stĺpec, ktorého dĺžka je závislá od energie dodanej zdrojom. Elektrónová kinetická teplota plazmy generovanej mikrovlnne je vyššia, od 5 do 15eV, na rozdiel od plazmy generovanej rádiofrekvenčne alebo jednosmerným prúdom, vďaka čomu je schopná dosiahnuť vyšší stupeň ionizácie a disociácie [32–44].



Obrázok 3: Surfatron [45].

Zdroj mikrovlnnej plazmy sa skladá z:

- Zdroja mikrovlnného výboja;
- Mikrovlnnej trasy (vlnovody, ladiace systémy, cirkulátor, reflektometer);
- Systém dodávajúci pracovný plyn;
- Plazmový aplikátor (prenos energie do plazmy).

2.3 Reaktívne častice kyslíka a dusíka

Excitáciou a disociáciou atómov a molekúl zo vzduchu vznikajú v plazme voľné radikály. Sú to veľmi reaktívne častice, ktoré majú vo svojom elektrónovom obale jeden alebo viac nespárených voľných elektrónov, ktoré sa snažia poskytnúť do páru a vytvoriť tak stabilizovaný stav. Radikály sú schopné reagovať s biomolekulami a vytvárajú tak ďalšie voľné radikály. Následkami zrážkových procesov v plazme vznikajú z okolitého vzduchu reaktívne častice kyslíka a dusíka. Zvýšená koncentrácia reaktívnych častíc kyslíka a dusíka v organizme má za následok bunkový oxidačný stres.

Generácia ROS v plazme: [46]

$$O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M \tag{4}$$

$$O^* + H_2 O \to OH^{\bullet} + OH^{\bullet}$$
(5)

$$OH \bullet + O_3 \to HO_2 \bullet + O_2 \tag{6}$$

$$H\bullet + O2 + N_2 \rightarrow HO_2 \bullet + N_2 \tag{7}$$

$$\mathrm{H}^{\bullet} + \mathrm{HO}_{2}^{\bullet} \to 2 \mathrm{OH}^{\bullet} \tag{8}$$

$$OH \bullet + OH \bullet + M \to H_2O_2 + M (N_2, O_2)$$
(9)

Generácia oxidov dusíka v plazme:

$$N^* + O_2 \rightarrow NO + O \tag{10}$$

$$N + OH \bullet \rightarrow NO + H \bullet$$
(11)
$$N + O \to NO + O$$
(12)

$$N + O_2 \rightarrow NO + O \tag{12}$$
$$N + O_2 \rightarrow NO + O_2 \tag{13}$$

$$O + NO_2 \rightarrow NO + O_2$$
(13)
(14)

$$O + NO_2 + M \rightarrow NO_3 + M \tag{15}$$

$$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2 \tag{16}$$

$$O + N_2O_5 \rightarrow NO_2 + NO_2 + O_2$$

$$NO_2 + O_2 \rightarrow NO_2 + O_2$$
(17)
(18)

$$NO_2 + O_3 \rightarrow NO_3 + O_2 \tag{18}$$
$$NO_2 + NO_2 + M \rightarrow N_2O_5 + M \tag{19}$$

$$NO_2 + NO_3 + M \rightarrow N_2O_5 + M$$

$$NO + NO_3 \rightarrow NO_2 + NO_2$$
(19)
(19)

$$N_2O_5 + M \rightarrow NO_2 + NO_2 + NO_2$$
 (20)
 $N_2O_5 + M \rightarrow NO_2 + NO_3 + M$ (21)

$$O + NO_3 \rightarrow O_2 + NO_2 \tag{22}$$

2.3.1 Reaktívne častice kyslíka

Reaktívne častice kyslíka (ROS) sú radikály, molekuly a zlúčeniny kyslíka, ktoré sa podieľajú na mnohých procesoch v organizme.

Medzi reaktívne častice kyslíka patria:

Voľné radikály:

- superoxidový anión,
- hydroxylový radikál,
- peroxyl,
- alkoxyl.

Ostatné reaktívne častice kyslíka:

- peroxid vodíka,
- kyselina chlórna,
- ozón,
- singletový kyslík,
- atomárny kyslík.

ROS sa môžu chovať ako signálne molekuly. Signálne molekuly prenášajú signál z bunky do bunky za účelom zdieľania informácií medzi sebou, čím je ovplyvnená aktivita enzýmov a ďalšie pochody v bunke. Najskôr dochádza k prijatiu informácií z okolitého prostredia do bunky prostredníctvom primárnych poslov. Primárne posli sú neurotransmitery, hormóny, cytokiny atď.

Voľné kyslíkové radikály môžu poškodiť štruktúry na subcelulárnej aj celulárnej úrovni, dôsledkom čoho sú rôzne poruchy v organizme. Voľné kyslíkové radikály iniciujú mnohé biochemické reakcie a ovplyvňujú ich rýchlosť. Ich fyziologická úloha spočíva najmä v mikrobicídnom účinku. Pri fagocytóze dochádza k odstráneniu zvyškov mŕtvych buniek alebo k usmrteniu baktérií. Fáza fagocytózy, v ktorej vznikajú reaktívne častice kyslíka, sa nazýva oxidačné vzplanutie [47]. Na vzniku ROS v organizme sa podieľajú enzýmy NADPHoxidáza a myeloperoxidáza. Generácia týchto častíc predstavuje imunitnú odpoveď proti patogénom napádajúcich organizmus. Vznik superoxidu účinkom NADPH-oxidázy:

$$2O_2 + \text{NADPH} \rightarrow O_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$$
(23)

Dismutáciou superoxidu vznikne peroxid vodíka a ten následne oxiduje chloridové anióny na kyselinu chlórnu

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \to H_2O_2 + O_2$$
 (24)

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HClO + OH^-$$
(25)

Pôsobením reaktívnych častíc kyslíka dochádza niekoľkými spôsobmi k poškodeniu biomolekúl:

a) Oxidačné poškodenie lipidov – lipoperoxidácia

Polynenasytené mastné kyseliny lipidov sú pôsobením voľných radikálov a kyslíku poškodzované za vzniku hydroperoxidov. Najintenzívnejšie na lipidy pôsobí hydroperoxylový a hydroxidový radikál, v menšej miere aj superoxid. Citlivá je najmä fosfolipidová dvojvrstva všetkých biologických membrán a v nich najmä miesta dvojitých väzieb nenasýtených mastných kyselín, kyseliny linolovej a linolénovej. Takto poškodené membrány vykazujú zmenu permeability, čo ovplyvní bunkový metabolizmus a dôjde k porušeniu homeostázy bunky [3].

b) Oxidačné poškodenie proteínov

ROS reagujú s proteínmi buď priamo, alebo prostredníctvom oxidačných produktov cukrov a lipidov. Napádajú peptidovú väzbu alebo postranné reťazce aminokyselín. Citlivé sú najmä prolín, tyrozín, histidín, arginín, lysín, methionín, a cysteín. Takéto oxidatívne poškodenie môže viesť k strate funkcie proteínu alebo k aktivácii proteínu. Poškodené proteíny prispievajú k indukcii apoptózy bunky.

c) Poškodenie DNA

Voľné radikály a najmä hydroxylový radikál môžu výrazne zmeniť štruktúru nukleových kyselín. Hydroxylový radikál je veľmi silné oxidačné činidlo s oxidačným potenciálom 2,8 V. Je schopný oxidovať nielen bázy v nukleových kyselinách, ale aj aminokyseliny, cukry a nenasýtené mastné kyseliny v lipidoch. V plazme vzniká rozkladom vody na hydroxylový radikál a atómy vodíka v dôsledku pôsobenia UV žiarenia. Reakciou hydroxylového radikálu s DNA vznikajú rôzne produkty so zmenenou štruktúrou a porušenými väzbami. Dochádza k štiepeniu reťazca DNA a k modifikáciám báz, čoho výsledkom je napríklad mutácia spôsobená nesprávnym poradím párovaných báz. Medzi ďalšie makromolekuly, ktoré môžu byť poškodené, patria polysacharidy a glykosaminoglykány.

2.3.1.1 Ozón

Jednou z reaktívnych častíc generovaných v plazme je aj veľmi silné oxidačne činidlo, ozón. Je známe, že ozón môže mať negatívne účinky na živý organizmus, napriek tomu ponúka aj mnoho terapeutických účinkov. Ozónová terapia je stále viac využívaná a intenzívne študovaná. Používa sa pri dezinfekcii ale aj pri liečbe rôznych ochorení. Je účinný pri inaktivácií baktérií, vírusov, plesní, a tiež aktivuje imunitný systém. Môže byť užitočný pri liečení infikovaných rán, pri poruchách obehového systému, rakovine, a pri vírusových ochoreniach ako SARS, Covid-19 alebo AIDS [48]. Jeho antimikrobiálny účinok sa potvrdil napríklad u baktériálnych druhoch *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*. Mechanizmus inaktivácie baktérií spočíva v narušení integrity bunkovej steny oxidáciou fosfolipidov a lipoproteínov. V prípade vírusov ide o poškodenie

vírusovej kapsuly a zastavenie reprodukčného cyklu. Je taktiež užitočný pri onkologických ochoreniach, či už vlastným antitumorovým účinkom alebo synergicky s chemoterapeutikami [49].

2.3.2 Reaktívne častice dusíka

Medzi reaktívne častice dusíka patrí:

- atomárny dusík,
- excitovaný atomárny dusík,
- elektrónovo excitovaná molekula dusíka,
- vibračne excitovaná molekula dusíka,
- oxid dusnatý a ďalšie oxidy dusíka,
- kyselina dusitá,
- peroxynitril.

2.3.2.1 Oxid dusnatý

Z medicínskeho hľadiska je spomedzi RNS veľmi zaujímavá najmä molekula oxidu dusnatého. Oxid dusnatý je signálna molekula, známa ako EDRF (Endothelium derived relaxing factor). V tele vzniká pôsobením enzýmu NO-syntázy na aminokyselinu arginin za súčasného vzniku aminokyseliny citrulin. Oxid dusnatý má jeden nespárený elektrón, ktorý mu umožňuje silnú väzbu na železo v hemových skupinách. Vďaka tomu, dokáže aktivovať enzým guanylátcyklázu (GC) nachádzajúci sa v cytoplazme buniek hladkého svalstva, čo je podstatou stimulácie syntézy cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP). Syntéza cGMP vedie k relaxácii hladkého svalstva stien ciev, vazodilatácii, čím je zvýšený prietok krvi, a tak reguluje tonus krvných ciev.

 $GC-hem-Fe(II) + NO \rightarrow GC-hem-Fe(II)-NO$ (26)

Oxid dusnatý má v organizme mnoho biologických funkcií. Podieľa sa na zrážaní krvi, na imunitnom systéme a skorej apoptóze, nervovej komunikácii a pamäti, na hormonálnych a sexuálnych funkciách. Má hlavnú úlohu pri adaptácií a pri strese. NO má tiež antimikrobiálny a antitumorový účinok. Počas zápalu makrofágy a ostatné bunky produkujú NO prostredníctvom inducibilna NO-syntázy (iNOS). Aktivita iNOS výrazne rastie v zápalovej a proliferačnej fáze hojenia. Aktivácia makrofágov, syntéza cytokínov a proliferácia fibroblastov, epitelizácia sú spojené s rôznou aktivitou iNOS. Znížená aktivita iNOS koreluje so spomalením hojenia. NO reaguje s voľnými radikálmi, ukončením radikálových reakcií, teda vykazuje antioxidačnú aktivitu.

Veľký význam má aj exogénny NO pri infekciách a zápale vďaka antimikrobiálnym účinkom, stimulácií makrofágov, indukcii cytokínov, T-lymfocytov a imunoglobulínov, interaguje s kyslíkovými radikálmi a môže mať cytotoxický alebo cytoprotektívny účinok pri rôznych podmienkach. Z týchto poznatkov vyplýva biomedicínske využitie exogénneho NO generovaného v plazmatickom výboji [50].

Samotný oxid dusný priamo nenapadá DNA, ako sa pôvodne predpokladalo, ale účinky na DNA závisia od premeny NO na vyššie oxidy dusíka. Predpoklady, že NO môže inaktivovať centrá železa a síry v mitochondriách nádorových bunkách, boli prehodnotené. Inaktivácia mitochondrií v nádorových bunkách môže byť spôsobená peroxynitritom.

2.3.2.2 Peroxynitrit

Reakciou NO so superoxidom dochádza k vzniku toxického peroxynitritu

$$NO \bullet + O_2^- \to OONO^- \tag{27}$$

Peroxynitrit indukuje bunkovú smrť, môže ovplyvňovať procesy prenosu signálu, a mitochondriálne funkcie [3,47]. Peroxynitrit, rovnako ako ROS, pôsobí deštrukčne na DNA a vyvoláva peroxidáciu membránových lipidov. Oxidačnými reakciami a prostredníctvom voľných radikálov je peroxynitrit toxický pre mitochondie. Ako náhle dosiahne úroveň bunkového poškodenia hranicu možnej opravy, dôjde k usmrteniu bunky [51].

2.4 Diagnostika plazmy

Jednou z možných metód určenia vlastností plazmy je diagnostika prostredníctvom optickej emisnej spektroskopie. Táto metóda prináša informácie o prítomnosti aktívnych častíc v rôznych častiach výboja, o ich koncentrácií. Atómy a molekuly v plazme vybudené do vyšších stavov následným prechodom do stavov nižších vyžarujú fotóny charakteristických vlnových dĺžok. K ich excitácii dochádza najčastejšie zrážkami s elektrónmi, ktoré získavajú energiu z elektromagnetického poľa, alebo prenosom excitačnej energie pri ich zrážkach medzi sebou. Atómové emisné spektrá sú zložené z úzkych spektrálnych čiar, odpovedajúcim prechodom medzi energetickými hladinami. Na základe charakteristického spektra vlnových dĺžok je možné určiť, aký prvok sa v plazme nachádza. Jeho koncentrácia je následne určená z intenzity spektrálnej čiary žiarenia. V prípade molekúl dochádza k rotácii a vibrácii, pričom vzniká spektrum tvorené pásmi. Molekulárna spektroskopia dvojatómových molekúl sa využíva na určenie rotačných a vibračných teplôt a na stanovenie rozdelenia energií v plazme.

Zariadenie pre analýzu optickou emisnou spektroskopiou pozostáva z optického systému s disperzným prvkom, detektora, a počítača na vyhodnotenie signálu. Svetlo prechádza optickým systémom a dopadá na disperzný prvok, napríklad na optickú mriežku, na ktorej sa rozloží. Jednotlivé vlnové dĺžky dopadajú na detektor a ten premieňa svetelný signál na elektrický. V experimentálnej časti tejto práce bol použitý spektrometer s detektorom CCD. Svetlocitlivé detektory pracujú na princípe fotoelektrického javu, kde fotón s dostatočnou energiou pri náraze na atóm polovodiča uvoľní z jeho obalu elektrón, čo indukuje elektrický prúd. Počet uvoľnených elektrónov závisí od intenzity dopadajúceho žiarenia [52, 53].

2.5 Interakcia plazmy s mikroorganizmami

Plazmová sterilizácia je prvou oblasťou výskumu využitia plazmy v medicíne. Za sterilné predmety považujeme predmety, na ktorých boli usmrtené všetky mikroorganizmy a ich spóry. Sterilizačné techniky môžu byť fyzikálnej povahy alebo chemickej povahy. Príkladom fyzikálnej metódy je predovšetkým sterilizácia vysokou teplotou. Chemické metódy zahŕňajú použitie chemických látok ako ethylenoxid alebo peroxid vodíka. Tento spôsob sterilizácie je určený pre termosenzitívne materiály, ktoré nie je možné sterilizovať fyzikálnymi metódami.

V prípade plazmovej sterilizácie sú využívané chemické procesy ako pôsobenie voľných radikálov, ozónu či peroxidu vodíka. Plazma však generuje aj fotóny s energiou v UV oblasti, ktoré pôsobia ako fyzikálna sterilizačná metóda.

Germicidný účinok UV žiarenia spočíva vo fotochemickom poškodení nukleových kyselín, proteínov a enzýmov. Nukleové kyseliny absorbujú UV žiarenie, dochádza k vzniku thyminových dimérov, ktoré znemožňujú replikáciu genetickej informácie a teda následné rozmnožovanie mikroorganizmov. UV žiarenie iniciuje zmeny nenasýtených mastných kyselín v bunkovej membráne, čo vedie k zmene permeability tejto membrány. UV žiarenie s vlnovou dĺžkou pod 225 nm fotodisociuje vodu za vzniku OH radikálu. V prostredí, ktoré obklopuje argón je tiež silné žiarenie prislúchajúce molekulárnemu exciméru Ar₂* s vlnovou dĺžkou okolo 140 nm (žiarenie je tzv. VUV (vacuum ultraviolet) v oblasti spektra). Energia fotónov VUV žiarenia je v porovnaní s UV žiarením väčšia. Jeho absorpcia biomolekulami ako sú proteíny a polysacharidy, môže viesť k degradácii bunkovej steny spór mikroorganizmov. Rovnako ako v prípade UV žiarenia, má toto žiarenie deštruktívny účinok na molekulu DNA. [31, 54–56].

Použitím rôznych druhov plazmy môžeme docieliť inaktiváciu baktérií, plesní a vírusov. Plazma dokáže usmrtiť grampozitívne aj gramnegatívne baktérie, anaeróbne, aeróbne alebo fakultatívne anaeróbne baktérie. Mechanizmy interakcie plazmy s mikroorganizmami sú skúmané fyzikálnymi, chemickými a biomedicínskymi diagnostickými metódami ako sú optická emisná spektroskopia (OES), laserom indukovaná fluorimetrická detekcia (LIF), infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR), prietoková cytometria, elektroforéza, ELISA atď.. Presný mechanizmus inaktivácie mikroorganizmov s využitím plazmy však stále zostáva nejasný [57,58].

Inaktivácia bunkovej steny môže byť spôsobená poškodením proteínu a poruchami génovej expresie v dôsledku intracelulárnej oxidácie a nitrifikácie, priamym poškodením DNA alebo elektroporáciou. Elektroporácia je fyzikálny jav, ku ktorému dochádza pri pôsobení silného pulzného elektrického poľa na živú bunku, a jej dôsledkom je zvýšenie elektrickej vodivosti a priepustnosti bunkových membrán. Pôsobením krátkymi pulzmi (v radoch mikrosekúnd – milisekúnd) vysokej intenzity elektrického poľa (kV/cm) na bunku vznikajú v jej membráne mikroskopické trhlinky a póry. So zvyšovaním intenzity elektrického poľa ich veľkosť a početnosť rastie. Ak dôjde k vzniku množstva pórov, ktoré bunková membrána nedokáže zniesť a veľkosť pórov je tak veľká, že už nie je možné ich zacelenie, dochádza k nestabilite bunkovej membrány a následne k jej rozpadu. Rozpadom bunečnej membrány bunka stráca odolnosť voči vplyvom okolitého prostredím a umiera [57 – 59].

Podľa viacerých štúdii zohrávajú hlavnú úlohu v sterilizačných účinkoch plazmy reaktívne neutrálne častice ako kyslík, hydroxylové radikály, oxid dusnatý atď.. Reaktívne častice spôsobujú v bunkách morfologické zmeny, depolarizáciu membrány, peroxidáciu lipidov a poškodenie DNA. V štúdii boli použité aj tzv. "scavengery", teda vychytávače voľných radikálov, ktoré zabránili inaktivácií baktérie E.coli, čo potvrdzuje sterilizačný účinok reaktívnych častíc [60].

Pôsobenie plazmy rapídne narúša bunkovú stenu mikroorganizmov, čo vedie k uvoľneniu bunkového obsahu do okolia. Vo svojej štúdii Mendis [61] a Laroussi [62] predpokladajú, že tento jav spôsobujú nabité častice generované v plazme. Akumuláciou náboja na povrchu bunkovej steny elektrostatická sila prevýši pevnosť v ťahu bunkovej steny, následkom čoho dochádza k jej prasknutiu. Tento jav sa však vyskytuje u gramnegatívnych baktérií, keďže je

povrch týchto buniek nepravidelný. Dôležitú úlohu pri sterilizácii zohrávajú nielen reaktívne neutrálne častice, ale aj nabité častice prítomné v plazme.

2.6 Plazma v zubnom lekárstve

Plazmová technológia má veľké využitie aj v zubnom lekárstve, či už na povrchové úpravy materiálov používaných pri dentálnom ošetrení, ako sú modifikácie povrchu implantátu alebo zvyšovanie kvality lepidla alebo na terapeutické účely priamou aplikáciou v ústnej dutine. V prípade priamej aplikácie ide výhradne o nízkoteplotnú plazmu aby nedošlo k tepelnému poškodeniu zubnej drene.

V ústnej dutine sa prirodzene nachádza viac ako 700 druhov mikroorganizmov žijúcich v harmónií s ľudským telom. Paradontitída a zubný kaz sú dve najčastejšie orálne infekcie v zubnom lekárstve pričom v oboch prípadoch sú za vznik ochorenia zodpovedné mikroorganizmy.

Paradontitída je deštruktívne ochorenie ďasien a podporných štruktúr zubov, teda paradontu. Rozvíja sa po zápalových procesoch, ktoré sú vyvolané mikroorganizmami v zubnom povlaku. Zubný povlak je mikrobiálny biofilm, ktorý sa tvorí na povrchu zubov, zubných výplní a implantátov a nesprávnou ústnou hygienou sa v ústnej dutine hromadí. Baktérie, nachádzajúce sa v zubnom povlaku, môžu vstúpiť do krvi cez cievy poškodeného paradontu, šíriť sa do celého organizmu a vyvolať tak infekcie mimo ústnu dutinu, ako napríklad pľúcne infekcie, infekcie pečene, mozgové abscesy a iné. V miestach s tvorbou paradontálnych lézií prevláda prítomnosť gramnegatívnych anaeróbnych baktérií ako napríklad *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Treponema denticola.* a ďalšie [63].

Zubný kaz predstavuje ohraničenú deštrukciu zubného tkaniva organickými kyselinami. Kyseliny sú produktom fermentácie cukrov baktériami. Pôsobením kyselín dochádza k demineralizácii zubnej skloviny. Neskôr dochádza k poškodeniu dentínu až zubnej drene. Medzi najvýznamnejšie druhy mikroorganizmov zodpovedných za vznik zubného kazu patria streptokoky a lactobacily. Kariogénne streptokoky premieňajú sacharózu na nerozpustný glukán, ktorý uľahčuje priľnutie mikróbov na povrchu zubov a je pre nich zdrojom živín. Najčastejším orálnym streptokokom je *Steptococcus mutants*. Vo vysokom zastúpení sa nachádzajú v zubnom kaze aj laktobacily. Tvoria extracelulárne aj intracelulárne polysacharidy zo sacharózy. Medzi ďalšie mikroorganizmy spôsobujúce zubný kaz patria aktinomycety, veillonelly a pod. [14 – 16].

Liečba zubného kazu pozostáva z odstránenia infikovaného tkaniva najčastejšie mechanickým spôsobom, vŕtaním, a následným vyplnením dutín. Je dôležité aby dutiny neobsahovali žiadne baktérie, preto je odstránené väčšie množstvo zdravého tkaniva. Plazma, ako plynná fáza má schopnosť siahať aj hlboko do úzkych dutín a účinne tak inaktivovať baktérie v ťažko dostupných miestach. Obdobné využitie plazmy je pri čistení koreňových kanálikov. Systém koreňových kanálikov zubov má zložité štruktúry a rozvetvenia, do ktorých môžu ľahko preniknúť baktérie. Endodontické infekcie sú často spôsobené baktériou *Enterococcus faecalis*. Na čistenie koreňových kanálikov sa používajú rôzne metódy ako sú mechanické čistenie, ultrazvuk alebo laserové ožarovanie, avšak tieto metódy dezinfekcie mnohokrát nie sú postačujúce, vzhľadom na členitosť týchto kanálikov.

Dezinfekcia zubných kanálikov a zubného kazu použitím plazmy by mohla ponúknuť menej deštruktívny spôsob ošetrenia [14 – 16].

2.7 Antitumorový účinok plazmy

Niekoľko štúdií poukazuje na antitumorový účinok nízkoteplotnej plazmy in vitro a in vivo. Ošetrenie nádorových buniek plazmou indukuje pri nízkych dávkach zastavenie bunkového cyklu v G2/M a S fázach, teda zastavenie ďalšieho nekontrolovateľného delenia bunky, a pri vyšších dávkach vyvoláva apoptózu [4].

Viaceré štúdie zamerané na pôsobenie studenej plazmy na rôzne rakovinové bunky uvádzajú, že za morfologické zmeny, depolarizáciu membrány, peroxidáciu lipidov a poškodenie DNA buniek sú zodpovedné práve ROS. Tieto častice môžu ovplyvniť permeabilitu mitochondrií, čo vedie k spusteniu apoptotickej kaskády [5].

Pozitívne výsledky liečby plazmou boli zaznamenané pri viacerých typoch nádorových buniek ako napríklad hepatocelulárneho karcinómu [6], neuroblastómu [7], karcinómu kože [8], melanómu [9], karcinómu hrubého čreva [10], karcinómu pankreasu [11], karcinómu močového mechúra [12], karcinómu krčka maternice [13, 64] a karcinómu prsníka [65]. Citlivosť rakovinových buniek na účinky plazmy je výrazne vyššia ako citlivosť normálnych buniek, vďaka čomu je plazma veľmi sľubný nástroj na liečbu rakoviny. Táto citlivosť môže byť spôsobená vyšším percentom buniek vo fáze S bunkového cyklu [66].

2.8 Hojenie rán

Pod pojmom rana, rozumieme porušenie celistvosti kože, sliznice alebo iného orgánu pôsobením vonkajších faktorov mechanického, termického, chemického alebo radiačného pôvodu.

Koža je najväčším orgánom ľudského tela, predstavuje plochu okolo dvoch metrov štvorcových. Tvorí bariéru, no zároveň sprostredkováva prenos informácií medzi vnútorným prostredím tela človeka a živočíchov a okolitým prostredím. Zabraňuje strate telesných tekutín a následnej dehydratácii. Chráni vnútorné orgány pred mechanickým poškodením a prenikaním cudzorodých látok, chemikálií, UV žiarenia, mikroorganizmov a podobne. Udržuje telesnú teplotu, obsahuje voľné nervové zakončenia, receptory vnímania tlaku a taktiež plní estetickú funkciu.

Hojenie, je interakcia komplexnej kaskády bunkových reakcií. Cieľom tohto procesu je obnovenie povrchu, rekonštrukcia a obnovenie napätia poškodeného tkaniva. Tento proces zahŕňa štyri fázy:

1) Exsudatívna fáza

Exsudatívna, alebo tiež zápalová fáza, je úvodnou fázou hojenia a trvá približne tri dni. Rana v zápalovej fáze hojenia produkuje exsudát, ktorý je veľmi dôležitý pri procese hojenia. Exsudát je zápalový extravaskulárny výpotok, ktorý je ranou produkovaný až do času epitalizácie. Počas tejto fázy, dochádza v rane k migrácii zápalových buniek a to leukocytov, histiocytov a fibroblastov. Ich primárnou úlohou je fagocytóza, teda rozpoznávanie a pohlcovanie cudzorodých častíc a mikroorganizmov. Telo veľmi rýchlo odpovedá na narušenie kožného povrchu a nastupuje proces koagulácie s adhéziou, agregáciou a degranuláciou. Niekoľko sekúnd po poranení dochádza k vazokonstrikcii, čiže k zúženiu ciev lokálnym pôsobením adrenalínu a vazoaktívnych amínov (prostaglandíny, tromboxany) s cieľom zastaviť krvácanie.

V priebehu niekoľkých minút je aktivovaná primárna hemostáza a koagulačný systém, čo vedie k zastaveniu krvácania. Dochádza k aktivácii trombocytov, ktoré vytvárajú primárnu reaktívne bezjadrové hemostatickú zátku, trombus. Trombocyty sú elementy s glykoproteínovými receptormi, ako napríklad Willebrandov faktor VIII (vWf), fibrinogén, fibronektín. Vyznačujú sa negatívne nabitým fosfolipidovým povrchom a vysokým obsahom denzných granulí (obsahujúce ATP, ADP, Ca^{2+} , serotonín) a α -granulí (obsahujúce doštičkový rastový faktor, fibrinogén, vWf, fibrinogén), ktoré sú dôležité pre koagulačné reakcie. Po vazokonstrikcii dochádza k vazodilatácii, teda k zníženiu tonusu cievnej steny a k jej následnému rozšíreniu. Na aktivovaný cievny endotel adherujú leukocyty, ktoré prestupujú do medzibunkového prostredia. Vzniká opuch vedúci k ischémii. So zvyšujúcimi sa metabolickými nárokmi dochádza k poklesu koncentrácie kyslíka a vzrastu koncentrácie oxidu uhličitého a laktátu. Zvyšujúca sa hladina laktátu aktivuje makrofágy, ktoré uvoľňujú cytokiny, chemoaktické látky a rastové faktory. Laktát tiež podporuje angiogenéziu, teda vznik nových krvných ciev. Prvá čistiaca fáza nastáva 2-4 dni po poranení, prostredníctvom fagocytózy [67 – 71].

Príznaky zápalu:

- teplota,
- začervenanie,
- bolesť,
- opuch,
- strata funkcie.

2) Proliferačná fáza – granulačná, kolagénová

V tejto fáze hojenia je významná vysoká replikácia fibroblastov a angiogenézia. Fibroblasty v okrajoch rany tvoria kolagén a proteoglykany, ktoré sa zmenia na vysokomolekulárne látky, a tie potom zaisťujú pevnosť okrajov rán. Následkom nedostatku energie, uvoľnených chemoaktantov z trombocytov a vysokej hladiny laktátu a fibrínu, vznikajú nové cievy. Vytvorenie nových ciev podporí výživu tkanív kyslíkom a živinami.

3) Epitalizačná fáza

Provizórne fibrózne tkanivo je okolo desiateho dňa postupne nahradené kolagénovými vláknami, ktoré sú produkované fibroblastami. Z kolagénových monomérov postupne vznikajú polyméry. Dochádza k reepitalizácii rany z bazálnych keratocytov. Ako zdroj buniek slúžia okraje rany. Nové bunky vznikajú z nepoškodených epitelových buniek, migrujú cez ne do nezahojenej oblasti, kde sa ukotvia. Pre replikáciu a migráciu epitelových buniek sú potrebné mnohé rastové faktory.

4) Diferenciačná fáza

Konečná fáza hojenia, môže trvať aj niekoľko mesiacov a jej výsledkom je pevná, epitelizovaná a retrahovaná rana. Primárne náhodne usporiadané polymerizované kolagénové vlákna sa menia na zväzky orientované podľa mechanického zaťaženia rany. Kontrakciou membrány fibroblastov je zaistené retrakcia rany. Konečným produktom procesu hojenia je jazva, teda zhluk kolagénu, slúžiaci k obnoveniu tkanivovej integrity, sily a funkcie [67-71].

Každá rana je kontaminovaná mikroorganizmami. Imunitný mechanizmus organizmu je schopný isté množstvo bakteriálnej kontaminácie zvládnuť. V prípade pomnoženia mikroorganizmov v rane však môže vzniknúť infekcia. Infekcia je definovaná ako stav, kedy patogénne mikroorganizmy v rane presiahnu počet 10⁵ na 1 gram tkaniva. Klinické prejavy infekcie sú bolestivosť rany a okolia, opuch, zvýšená teplota a začervenanie. Rany postihnuté infekciou sú pomaly hojace. Infekčné komplikácie môžu vyústiť až do septického stavu [69].



Obrázok 4: Fázy hojenia rán: a – zápalová fáza; b – formovanie nového tkaniva; c – remodelácia [58].

2.9 Účinky plazmy pri hojení rán

Plazma má schopnosť prenikať cez nehomogénne povrchy, trhlinky až v mikroskopickej škále, čo je prvotnou výhodou v porovnaní s tekutými liečivými prípravkami určených na hojenie rán.

Jednou z komplikácii procesu hojenia rán je vznik infekcie v rane, spôsobený baktériami, ktoré sa môžu nachádzať na koži ako napríklad *Escherichia coli*, kmene *Streptococcus, Staphylococcus a Pseudomonas* [72]. Prvým krokom k zlepšeniu hojenia rán je dezinfekcia

rany. Výhodou plazmy je, že dokáže inaktivovať aj baktérie s vytvorenou rezistenciou na antibiotiká. Štúdie dokazujú, že pôsobenie plazmy usmrtí patogénne baktérie a kožu tak dekontaminuje. Medzi hlavné účinky pôsobenia plazmy na hojenie rán patrí: UV žiarenie, reaktívne častice kyslíka – ozón, ktoré ranu dezinfikujú, reaktívne častice dusíka – NO, NO_x, ktoré stimulujú regeneráciu tkaniva. Plazmou generované UVB, UVC je schopné prechádzať epidermou, UVA môže prechádzať až do dermis, avšak toto žiarenie v plazme nie je tak silné a jeho rola v usmrcovaní mikroorganizmov nie je tak významná. [58]

Nabité častice v plazme majú zásadnú úlohu pri bakteriálnej inaktivácii pretrhnutím vonkajšej bunkovej membrány. Elektrostatická sila spôsobená akumuláciou náboja na bunkovej membráne by mohla prekonať pevnosť v ťahu, ktorá vedie k prasknutiu [19]. Iné štúdie poukazujú na antibakteriálny účinok nabitých častíc spôsobený chemickou modifikáciou povrchu membrány [20]. Plazma používaná pri hojení rán je nízkoteplotná, teda jej teplota je podobná izbovej teplote, preto účinok tepla na mikroorganizmy môžeme vylúčiť.

Plazma môže podporovať hojenie rán aj svojimi antiseptickými účinkami, reguláciou integrínových receptorov na povrchu kožných buniek, proangiogénnymi účinkami, podporou vaskularizácie, kontrolou zrážania krvi či zvyšovaním a predlžovaním kožnej mikrocirkulácie. Na udržanie zdravej pokožky je nutná kontinuálna proliferácia a diferenciácia epidermálnych buniek kože, čo je tiež potrebné pre lepšie a rýchlejšie hojenie rán, vredov alebo nádorov kože. Nízka dávka účinkov plazmy môže stimulovať životaschopnosť buniek a zvýšiť proliferáciu, diferenciáciu a migráciu, zatiaľ čo vysoká dávka indukuje v bunkách apoptózu. Práve proliferácia buniek, migrácia a angiogenéza sú významné v druhej fáze hojenia rán. [73 – 74]. Plazma podporuje proliferáciu a migráciu fibroblastov a keratinocytov, ktoré zohrávajú hlavnú úlohu v procese hojenia rán. Angiogenéza popisuje vznik nových krvných kapilár a iniciujú ju rastové faktory, cytokiny a oxidy dusíka. Práve oxidy dusíka by mohla plazma dodávať [75–81].

Experimentálne bolo dokázané, že plazma výrazne urýchľuje koaguláciu krvi in vitro. Kvapka krvi zdravého darcu koaguluje za normálnych podmienok asi 15 minút, zatiaľ čo po ošetrení plazmou po dobu 15 sekúnd koaguluje za menej ako minútu. V prirodzenom procese koagulácie je produkovaný trombín, ktorý premieňa fibrinogén na monoméry fibrínu, ktoré polymerizujú za vzniku fibrínových mikrofilamentov. Nízkoteplotná plazma selektívne pôsobí na proteíny podieľajúce sa na koagulačnej kaskáde, najmä na fibrinogén. Plazma podporuje aktiváciu trombocytov a ich následnú agregáciu, čo je prvým krokom koagulačnej kaskády, a tiež tvorbu fibrínových vláken, čo je krokom posledným. Presný mechanizmus zodpovedný za zrýchlenie koagulácie krvi nie je ešte úplne jasný. Tento účinok nie je vyvolaný teplotou ani zmenou pH krvi [82, 83].

Vieme, že nízkoteplotná plazma generuje ROS a RNS ktoré majú v procese hojenia veľký význam. Hlavné účinky NO pri hojení rán môžeme zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- a) Priamy baktericídny efekt;
- b) Inhibícia voľných kyslíkových radikálov s možným patogénnym účinkom antioxidačná ochrana;
- c) Normalizácia mikrocirkulácie v dôsledku vazodilatácie;
- d) Zlepšenie nervovej vodivosti;
- e) Regulácia imunitnej odpovede v rane;

- f) Uvoľnenie cytokínov aktivovanými makrofágami čo zvyšuje proliferáciu fibroblastov, a ďalších biologicky atívnych látok regulujúcich proces hojenia;
- g) Priama indukcia proliferácie fibroblastov;
- h) Regulácia syntézy kolagénu;
- i) Regulácia apoptózy pri remodelácii tkanív;
- j) Vplyv na proliferáciu keratinocytov epitelizácia rany [50].

2.10 Zvieracie experimentálne modely v procese hojenia rán

Štúdie zamerané na potenciálny prípravok alebo nástroj na zlepšenie zdravotného stavu a liečbu chorôb z etických dôvodov nie je možné vykonávať priamo na ľuďoch. Na experimenty sú teda používané vhodné zvieracie modely, vyberané so snahou čo najviac sa pripodobniť mechanizmom a procesom ľudského tela. Priebeh hojenia rán u človeka je veľmi špecifický, čo sa týka imunitnej odpovede, fyziológie a vplyvu vnútorných a vonkajších faktorov. Neexistuje žiadny ideálny zvierací model, ktorý by splňoval všetky kritériá, preto sa pre rôzne štúdie využívajú rôzne živočíšne druhy ako napríklad laboratórny potkan, prasa domáce alebo laboratórna myš. Použitie laboratórneho potkana (*Rattus norvegicus*) je výhodne z hľadiska dostupnosti, veľkosti a podobnosti v kožnej štruktúre s človekom. Nevýhodou je však svalové tkanivo *panniculus carnosus*, ktoré podporuje tvorbu kolagénu, vykazuje kontrakciu rany a tým urýchľuje hojenie kožného defektu. V prípade prasacieho modelu je prínosom značná anatomicko-funkčná podobnosť kožného systému s kožným systémom človeka, a teda obdobný časový priebeh fáz hojenia. Nevýhody tohto modelu súvisia najmä s neprimeranou veľkosťou zvieraťa, z ktorej vyplýva náročná manipulácia a tiež vysoké náklady spojené s realizáciou experimentov.

Vytvorenie rany môže prebiehať dvomi spôsobmi, a to excíziou alebo incizíou. Excízia je odstránenie časti tkaniva, ktoré bude nahradené novým tkanivom. Na takto vytvorenej rane môžeme sledovať všetky fázy hojenia z biologického aj histologického hľadiska. Rany vytvorené ostrým ťahavým rezom nazývame incízia. Vzniká tak rýchlo otvorená rana s minimálnym poškodením okolitého tkaniva. Dochádza k rýchlej extravazácii krvnej plazmy, transportu krvných buniek, vytvoreniu krvného koagula s tvorbou fibrínovej zátky a uzavretiu okrajov rany [67].

Myš (*Mus musculus*) najviac využívaný zvierací model v štúdiách fyziológie a biochémie, vďaka možnej štandardizácie veku, pohlavia, a možnosti veľkého počtu opakovaní experimentu.

Ľudská a myšacia koža má rovnakú bunkovú stavbu epidermis a dermis, avšak líšia sa hrúbkou týchto vrstiev. Epidermis u človeka pozostáva z 5 - 10 bunkových vrstiev, pričom myšacia obsahuje len 2 - 3. Hrúbka kože a podkožného tkaniva je taktiež závislá na veku, pohlaviu a výživy či už v prípade človeka alebo hlodavca.

Hojenie kožných poranení myší prebieha obdobne ako u človeka [84].

3 Experimentálna časť

Cieľom diplomovej práce je charakterizácia nízkoteplotnej plazmy generovanej v argóne pomocou rozdelenia aktívnych častíc v mikrovlnnom výboji, a štúdium účinkov tejto plazmy pri zlepšení hojenia rán. Experimentálna časť tejto diplomovej práce bola realizovaná v spolupráci s Lekárskou univerzitou v Sofii, kde som absolvovala trojtýždňovú odbornú stáž prostredníctvom programu CEEPUS. Diagnostika pomocou optickej emisnej spektroskopie, rovnako tak aj verifikácia účinkov plazmy na modeli kože prebiehali v plazmochemickom laboratóriu Fakulty chemickej, Vysokého učení technického v Brne. V laboratóriách Lekárskej univerzity v Sofii bola uskutočňovaná priama aplikácia studenej plazmy na živé zvieracie modely.

3.1 Diagnostika plazmy optickou emisnou spektroskopiou

3.1.1 Spektrometer

Diagnostika plazmy bola vykonaná optickou emisnou spektroskopiou. Výbojom emitované žiarenie smerovalo na kremennú šošovku s priemerom 25 mm a ohniskovou vzdialenosťou 35 mm, a ďalej na vstup multimódového optického kábla pripojeného na spektrometer. Vodiaca lišta s rozmermi 25 x 0,4 mm² pre najlepšie osové rozlíšenie bola situovaná na optickej osi pred objektívom. Optická os bola namontovaná na držiaku pohyblivom v smeroch xyz. Držiak bol pokrytý čiernym papierovým nástavcom pre zabránenie odrazom svetla. Spektrá z emitovaného svetla boli získané prostredníctvom spektrometru Jobin Yvon TRIAX 550 s CCD detektorom 2014 x 256 pixelov, chladeným kvapalným dusíkom.

3.1.2 Experimentálne zariadenie pre mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou

Experimentálne zariadenie pozostávalo z nízko výkonného napájacieho zdroja Sairem GMS s frekvenciou budiaceho zdroja 2,45 GHz, na ktorý bol pomocou flexibilného koaxiálneho kábla napojený surfatronový rezonátor. Výkon generátora počas jednotlivých meraní bol 10 W. V priebehu merania bol rezonátor chladený prietokom vody 5 l/min pri teplote 20 °C. V kapiláre z kremenného skla s vonkajším priemerom 8 mm a vnútorným priemerom 3 mm bol generovaný výboj. Kapilárou prúdil pracovný plyn argón s čistotou 99,996 %, skladovaný v kovovej fľaši s redukčným ventilom. Konštantný prietok pracovného plynu 8 l/min počas celého merania bol zabezpečený pomocou regulátoru hmotnostného prietoku Omega FMA-A2408.Schéma experimentálneho zariadenia je na obrázku 5.



Obrázok 5: Schéma usporiadania aparatúry. 1 – regulátor hmotnostného prietoku; 2 – kremenná kapilára; 3 –surfatronový rezonátor; 4 – MW anténa; 5 – MW koaxiálny kábel; 6 – plazmový lúč; 7 – čierny antireflexný nástavec 8 – kremenná šošovka; 9 – žltý optický filter; 10 – xyz pohyblivá optická os (zložená z častí 7–9); 11 – multimódové kremenné optické vlákno [57].

3.1.3 Experimentálne zariadenie pre mikrovlnný pochodňový výboj

V druhej fáze experimentu bol diagnostikovaný pochodňový (fakľový) výboj so spätným vírom plynu generovaný v súčiastke zhotovenej pomocou 3D tlačiarne.

Z nízko výkonného napájacieho zdroja Sairem GMS s frekvenciou 2,45 GHz viedol koaxiálny kábel, na ktorý bol aplikovaný nástavec z 3D tlačiarne zobrazený na obrázku 6. Po bokoch nástavca boli dva vstupy pre prívod pracovného plynu, argónu. Merania prebiehali pri zvyšovaní prietoku pracovného plynu pomocou regulátoru hmotnostného prietoku Omega FMA-A2408 od 2 Slm na 4 Slm, 6 Slm, a 8 Slm. Výkon generátora počas bol počas jednotlivých meraní zvyšovaný z 10 W, na 13 W a 16 W. V nástavci na hrote vysokonapäťového vodiča vznikal pochodňový výboj so spätným vírom plynu.

Diagnostika prebehla optickou emisnou spektroskopiou. Os výboja bola zhodná s optickou osou snímania spektier. Optická os pozostávala z kremennej šošovky s priemerom 25 mm a ohniskovou vzdialenosťou 35 mm, ďalej pokračovalo na vstup multimódového optického kábla pripojeného na spektrometer Jobin Yvon TRIAX 550 s CCD detektorom. Nastavenie parametrov spektrometra bolo rovnaké ako v predošlej časti.



Obrázok 6: Schéma generácie pochodňového výboja so spätným vírom plynu: 1 – mikrovlnný koaxiálny kábel; 2 – vysokonapäťový vodič; 3 – uzemnený vodič; 4 – dielektrikum; 5 – plazmový kanál; 6 – plastový nástavec; 7 – prívod argónu; 8 – kremenná šošovka; 9 – optický kábel.



Obrázok 7: Plastový nástavec zhotovený pomocou 3D tlačiarne.



Obrázok 8: Koaxiálny kábel

3.1.4 Postup merania

Meranie mikrovlnného výboja s povrchovou vlnou bolo zahájené najnižším bodom pri kremennej kapiláre, postupne bola tryska vertikálne premeriavaná bod po bode nastavením polohy posuvného držiaka s krokom 0,75 mm. Pri meraní NO-gama, OH (A \rightarrow X) a dusíkových spektrálnych systémov, bola použitá mriežka s hustotou 3600 gr/mm. Pri meraní atómových čiar argónu a kyslíka bola použitá mriežka 1200 gr/mm. Charakteristické vlnové dĺžky atómových a molekulových spektier boli získané z tabuliek podľa knihy The Identification of Molecular Spectra [86]

Boli získané spektrá OH, N₂, NO, O a Ar. V prípade fakľového výboja boli emisné spektrá získavané z celého objemu pre rôzny výkon a rôzny prietok pracovného plynu.

Intenzity spektra NO-gama boli merané v rozsahu 244,5 – 248,0 nm.

Zo spektra OH (A \rightarrow X) pásu 0-0 boli merané integrálne intenzity v rozsahu vlnových dĺžok 306,0–310,8 nm. V spektrách boli stanovené celkom dva spektrálne systémy dusíka:

- prvý negatívny (N₂⁺(B $^{2}\Sigma_{u}^{+}) \rightarrow N_{2}^{+}(X \,^{2}\Sigma_{u}^{+})),$
- druhý pozitívny (N₂(C ${}^{3}\Pi_{u}) \rightarrow N_{2}(B {}^{3}\Pi_{g})).$

Z kyslíkového emisného spektra boli sledované intenzity troch spektrálnych čiar s vlnovými dĺžkami 777,19 nm; 777,42 nm; 777,54 nm a tripletu 844,6 – 844,7 nm. Okrem kyslíka bola súčasne snímaná a vyhodnocovaná aj intenzita čiary neutrálneho argónu pri 772 nm, aby bolo možné verifikovať prítomnosť excitovaného argónu.

Z emisného atómového spektra argónu boli sledované intenzity spektrálnych čiar s vlnovými dĺžkami 603,21 nm; 667,73 nm; 675,28 nm; 687,17 nm a 714,70 nm.

Všetky merania boli vyhodnocované v programe OriginPro 6.1. Pre výpočty integrálnych intenzít, rotačnej vibračnej a elektrónovej teploty boli zhotovené programy v tabuľkovom procesore Microsoft Excel.

3.2 Verifikácia účinkov plazmy na modeli kože

Pôsobenie aktívnych častíc plazmy na kožu bolo najskôr overené na pripravenej simulácii kožného tkaniva zafarbenej farbivom Indigo pre lepšiu identifikáciu účinkov ROS a RNS. Výboj bol zaznamenaný pomocou vysokorýchlostnej kamery.

3.2.1 Príprava simulácie kožného tkaniva

Destilovaná voda os hmotnosťou 115,00 g bola postupne zahrievaná na elektrickej miešačke s vyhrievaním. Keď teplota dosiahla 30 °C bolo pridaných 17,05 g želatíny (Dr.Oetker). Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná až do úplného rozpustenia a z jej povrchu bola odobratá pena. Následne bolo pridaných 0,70 g chloridu sodného (š. CRS170214). Po rozpustení chloridu sodného bolo pridaných 0,65 g detergentu (FeelEco – washing up liquid) a zmes bola zhomogenizovaná. Po zhomogenizovaní bolo pridaných 17,05 g slnečnicového oleja (Giana) za opätovnej homogenizácie. Nakoniec bolo pridané farbivo Indigo. Takto pripravený roztok sa ešte chvíľu zahrieval a následne nalial do Petriho misiek a nechal sa stuhnúť.

3.2.2 Experimentálne zariadenie na generáciu plazmy

Experimentálne zariadenie v tomto kroku pozostáva z rovnakých častí ako pri diagnostike plazmy optickou emisnou spektroskopiou. Výboj bol generovaný v kremennej kapiláre s vonkajším priemerom 8 mm a vnútorným priemerom 3 mm. Pracovným plynom bol argón s prietokom 4l/min. Výkon generátora počas experimentu bol 10 W.

Takisto bol model kože vystavený účinkom pochodňového výboja so spätným vírom plynu. Os výboja bola orientovaná kolmo na povrch modelu kože. Výkon generátora bol v tomto prípade 11 W a prietok pracovného plynu 3,5 l/min.

3.2.3 Interakcia plazmy s modelom kože

Model kože v Petriho miskách bol po stuhnutí vystavený plazmatickému výboju:

- s UV filtrom v podobe tabuľového skla (prepúšťa žiarenie od cca 360 nm);
- kremenné sklo, priepustné pre UV žiarenie do 200 nm;
- optický prvok z fluoridu horečnatého, ktorý prepúšťa vlnové dĺžky do 105 nm.

Plazmatický výboj bol zaznamenaný pomocou vysokorýchlostnej kamery i-speed 726 s objektívom NIKON AD, AF MICRO NIKKOR 200 mm s clonou objektívu f/16. Expozičná doba jednotlivého snímku bola 10 µs.

3.3 Priama aplikácia plazmy na zvieraciu kožu

Táto časť diplomovej práce bola realizovaná v laboratóriách Lekárskej univerzity v Sofii v Bulharsku, kde potrebné zaškolenie a odborný dohľad poskytovali odborný asistent Todor Bogdanov a docent Lubomir Traikov. Séria experimentov zameraných na štúdium účinkov nízkoteplotnej plazmy na hojenie umelo vytvorených rán na laboratórnych myšiach prebieha od roku 2018. Na tomto výskume som sa podieľala nielen vyhodnocovaním dát, ale vďaka programu CEPUUS aj experimentálne počas trojtýždňovej odbornej stáže v Bulharsku.

3.3.1 Termokamera

Zvieracie modely boli pred ošetrením a bezprostredne po ošetrení plazmou zosnímané termokamerou Testo 865 s infračerveným rozlíšením 160 x 120 px a s integrovanou technológiou Testo Super Resolution 320 x 240 px.. Rozsah merateľnej teploty je v intervale od 20 °C do +280 °C, s presnosťou ± 2 °C, ± 2 % z nameranej hodnoty s teplotným rozlíšením od 0,12 °C.

3.3.2 Experimentálne zariadenie

Generácia plazmy prebiehala na zariadení, ktoré pozostávalo podobne ako pri diagnostike plazmy z nízko výkonného napájacieho zdroja s frekvenciou budiaceho zdroja 2,45 GHz, na ktorý bol pomocou flexibilného koaxiálneho kábla napojený surfatronový rezonátor. Výkon generátora počas jednotlivých meraní bol do 10 W. Pracovným plynom na generáciu plazmy bol argón s prietokom 8 l/min. Výboj bol generovaný v kapiláre z kremenného skla s vonkajším priemerom 8 mm a s vnútorným priemerom 3 mm.

Rovnako ako v predošlých častiach experimentu, bola plazma generovaná aj pomocou plastového aplikátora za vzniku fakľového výboja so spätným vírom plynu. Výkon generátora bol 10 W a prietok pracovného plynu 8 l/min.

3.3.3 Anestetikum

Anestetikum používané pri chirurgických úkonoch na laboratórnych myšiach je zložené z ketamínu a xylazínu. Kombinácia ketamínu a xylazínu má anestetický aj analgetický účinok. Odporúčané množstvo ketamínu pre prípravu injekčného roztoku je 100 – 200 mg/kg váhy zvieraťa a odporúčané množstvo xylazínu je 5 – 16 mg/kg váhy zvieraťa.

3.3.4 Postup

V experimente bol použitý zvierací model *Mus musculus*, biela laboratórna myš genetickej línie BALB-C. Myši boli chované v priestoroch Lekárskej Univerzity v Sofii (Obrázok 9).



Obrázok 9: Laboratórna myš s chvostom označeným čiernym permanentným popisovačom pre presnú identifikáciu jedinca v experimente.

Z vivária boli vybrané 10 laboratórnych myši rovnakého pohlavia, s približne rovnakou hmotnosťou. Myši boli označené, zvážené a ich hmotnosť zapísaná. Na základe hmotnosti bola vypočítaná primeraná dávka anestetika zloženého z ketaminu a xylazínu. Pripravené anestetikum bolo myšiam podané intraperitoneálne, teda injekčne do dutiny brušnej. K nástupu účinku anestetika došlo v priebehu 15 minút. Myši boli na približne 10 minút v stave relaxácie. Za tento čas bolo myšiam odstránené ochlpenie pomocou elektrického holiaceho strojčeka a následne depilačným krémom. Koža bola dôkladne očistená destilovanou vodou a pripravená na chirurgický výkon. Myšiam bolo spôsobené poranenie sterilnými operačnými nožnicami odstrihnutím kožného tkaniva o veľkosti približne 0,1 cm².

Takto pripravené zvieracie modely boli podrobené účinkom plazmy. Plazmou bolo pôsobené priamo na vytvorenú ranu v jednom bode kolmo k povrchu po dobu 60 sekúnd v rozsahu aktívneho výboja. V priebehu aplikácie plazmatického výboja na ranu a bezprostredne po aplikácii boli vyhotovené fotografie prostredníctvom termokamery pre vizualizáciu teplotného rozdielu spôsobeného ošetrením. Boli taktiež vyhotovené fotografie myší digitálnym fotoaparátom na milimetrovom papieri. Zvieracie modely boli každý druhý deň fotografované na milimetrovom papieri bez podania anestetika po dobu 19 dní. Myši boli snímané v boxe s podložením z milimetrového papiera.

Ďalšia vzorka myší bola obdobne v deň chirurgického výkonu ošetrená plazmou, avšak druhý deň po zákroku bola opätovne podrobená plazmatickým ošetrením. Aplikácia plazmy ďalší deň prebiehala rovnakým spôsobom. Myšiam bolo podané anestetikum a po dobu 60 sekúnd boli rany vystavené účinkom plazmy.

Rovnako ako v predošlej vzorke myší, boli zhotovené fotografie termokamerou a digitálnym fotoaparátom na milimetrovom papieri. Nasledujúcich 19 dní boli vyhotovené fotografie myší v boxe s milimetrovým papierom každý druhý deň.

Experiment bol zopakovaný rovnakým spôsobom aj pre sledovanie účinkov fakľového výboja so spätným vírom plynu. Boli vytvorené rany na ďalších dvoch vzorkách myší a tie boli následne vystavené jednej alebo dvom aplikáciám plazmy.

Celkovo bolo však pozorovaných 5 vzoriek myší. Rana bola umelo vytvorená aj na koži myší slúžiacich ako kontrolná vzorka. Tieto myši neboli podrobené liečbe plazmatickým výbojom, teda proces hojenia u nich prebiehal prirodzeným spôsobom. Boli pozorované a ich rany fotografované počas 19 dní.

Z jednotlivých fotografií bola vyhodnocovaná plocha rany prostredníctvom programu ImageJ.

4 Výsledky

4.1 Diagnostika plazmy optickou emisnou spektroskopiou

4.1.1 Rozdelenie aktívnych častíc

Intenzity spektrálnych čiar a pásov boli premeriavané pozdĺž osi plazmatického výboja a bola pozorovaná rôzna distribúcia aktívnych častíc v závislosti na vzdialenosti od kapiláry. Nakoľko bola plazma generovaná v argóne, boli namerané intenzity čiar s vlnovými dĺžkami 603,21 nm; 667,73 nm; 675,28 nm; 687,17 nm a 714,70 nm. Na obrázku 10 sú zobrazené intenzity čiar neutrálneho argónu s vlnovou dĺžkou 714,7 nm namerané pozdĺž osi výboja. Ostatné namerané intenzity v závislosti na vzdialenosti od kapiláry sú zobrazené v prílohe. (Obrázok P1 – P2). Z obrázku je zrejmé, že intenzita argónových čiar so vzdialenosťou od kapiláry približne lineárne klesá. V prvom bode merania sú vždy intenzity menšie, čo je spôsobené čiastočným zastienením plazmy rezonátorom. Rovnako to bolo aj v prípade intenzít čiar s ostatnými vlnovými dĺžkami.



Obrázok 10:Integrálne intenzity čiar neutrálneho argónu ² [3/2] $^{0}\rightarrow^{2}$ [3/2] (714,70 nm) v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry.

Okrem argónu boli premeriavané intenzity spektra atómov neutrálneho kyslíka, spektrálne systémy dusíka. NO, OH radikálu. Tieto častice sú v plazme prítomne vďaka vzduchu, ktorý výboj obklopuje. Molekula NO vzniká rekombináciou atomárneho dusíka a kyslíka. OH radikál vzniká disociáciou vodnej pary.

Na obrázku 11 sú zobrazené intenzity neutrálneho kyslíka v závislosti na vzdialenosti od kapiláry. Vľavo sú zobrazené intenzity spektrálnych čiar s vlnovou dĺžkou 777,19 nm. Vpravo sú zobrazené intenzity tripletu 844,6–844,7 nm. Intenzity spektrálnych čiar kyslíka s ostatnými vlnovými dĺžkami v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry sú zobrazené v prílohe na obrázku P3. Najväčšie intenzity boli namerané približne 2 mm od kapiláry. Nárast intenzít je spôsobený miešaním pracovného plynu so vzduchom, aj napriek tomu, že

prúdenie argónu je laminárne. Od tohto bodu mali intenzity klesajúcu tendenciu. Intenzita výboja je priamo úmerná intenzite šíriacej sa povrchovej vlny. V dôsledku toho, sú intenzity so zväčšujúcou sa vzdialenosťou od konca kapiláry klesajúce.



Obrázok 11: Intenzita čiary neutrálneho kyslíka $S \rightarrow P$ (777,19 nm)v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry(vľavo); intenzita čiar tripletu (844,6–844,7 nm) v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vpravo).

Zo spektrálnych systémov dusíka sú na obrázku 12 zobrazené intenzity prvého negatívneho systému pásu 0-0 (vľavo) a druhého pozitívneho systému pásu 0-2 (vpravo) v závislosti na vzdialenosti od konca kremennej kapiláry. Intenzity majú klesajúcu tendenciu. Intenzity druhého pozitívneho systému dusíka pásu 1-3 a pásu 2-4 sú zobrazené v prílohe na obrázku P4.



Obrázok 12: Intenzity prvého negatívneho systému dusíka $(N_2^+(B^2\Sigma_u^+) \to N_2^+(X^2\Sigma_u^+))$ pásu 0-0 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vľavo); intenzity druhého pozitívneho systému dusíka $(N_2(C^3\Pi_u) \to N_2(B^3\Pi_g))$ pásu 0-2 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vpravo).

Prítomnosť oxidu dusnatého v plazme bola potvrdená premeraním intenzít gama systému NO. Intenzita pásu 0-2 NO^{γ} systému v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry je zobrazená na obrázku 13. Hodnoty intenzít však neboli príliš vysoké, a so vzďaľovaním od konca kapiláry sa znižovali.



Obrázok 13:Intenzity gama systému oxidu dusnatého (NO($A^{2}\Sigma^{+}$) \rightarrow NO($X^{2}\Pi$)) pásu 0-2 (247,9 nm) v závislosti vzdialenosti od konca kapiláry.

Poslednou sledovanou časticou boli OH radikály. Intenzity emisie OH radikálov prechodu $A \rightarrow X$ so vzďaľovaním od konca kapiláry rástli do určitého bodu a následne výrazne klesali s poklesom intenzity povrchovej vlny pozdĺž výboja, čo je znázornené na obrázku 14.



Obrázok 14: Intenzity OH radikálu (OH(A $^{2}\Sigma) \rightarrow OH(X^{2}\Pi))$ pásu 0-0 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry.

4.1.2 Parametre plazmy

Parametre plazmy boli vypočítané z nameraných optických emisných spektier. Z Boltzmannovho grafu z vybraných argónových čiar (uvedených vyššie) bola vypočítaná excitačná teplota elektrónov. Na obrázku 15 je zobrazená závislosť excitačnej teploty na vzdialenosti od konca kapiláry. Teplota elektrónov sa pozdĺž výboja zvyšovala do maximálnej hodnoty okolo 5700 K približne 6,5 mm od kapiláry. Neistota spôsobená štatistickým vyhodnotením dát bola v rozmedzí intervalu 650 – 1500 K.



Obrázok 15: Elektrónová teplota vypočítaná z čiar neutrálneho argónu v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry.

Z intenzít najnižších rotačných čiar OH (A \rightarrow X), pásu 0-0 boli vypočítané rotačné teploty (vľavo), ktoré zodpovedajú teplote neutrálneho plynu v plazme. Rotačná teplota bola vypočítaná aj druhého pozitívneho systému dusíka (vpravo). Tieto hodnoty v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry sú zobrazené na obrázku 16. Rotačné teploty možno považovať za konštantné. Pri výpočte rotačnej teploty z OH radikálov bola smerodajná odchýlka v rozmedzí intervalu 40 – 140 K. Pri výpočte teploty z druhého pozitívneho systému dusíka bola táto neistota v intervale 150 – 520 K.



Obrázok 16: Rotačná teplota vypočítaná z OH ($A \rightarrow X$), pásu 0-0 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vľavo); rotačná teplota vypočítaná z druhého pozitívneho systému dusíka z pásu 0-2 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vpravo).

Vibračná teplota bola vypočítaná z pásu 0-2 druhého pozitívneho systému dusíka. Teplota dosahovala maximálnej hodnoty na konci výboja, a to okolo 3500 K. Všetky hodnoty sú graficky znázornené na obrázku 17. Neistota spôsobená štatistickým vyhodnotením dát bola v rozmedzí intervalu 80 - 330 K. V prípade posledného bodu bola neistota vyššia, 850 K z dôvodu nízkych intenzít na konci výboja.



Obrázok 17: Vibračná teplota vypočítaná z intenzít druhého pozitívneho systému dusíka v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry.

Pre fakľový výboj so spätným vírovým prúdením plynu boli premerané intenzity jednorázovo z celého objemu. Charakteristika prebehla pri postupnom zvyšovaní prietoku pracovného plynu a výkonu generátora. Intenzity spektrálnych čiar neutrálneho argónu so zvyšovaním prietoku plynu mali stúpajúcu tendenciu. Pri zvyšovaní výkonu generátora intenzita spektrálnych čiar argónu pri danom prietoku pracovného plynu rástla. Intenzity merané pri prietoku 6 Slm pre všetky vlnové dĺžky spektra neutrálneho argónu sa vymykajú rastúcemu trendu. Príčinou tejto anomálie môže byť chybné meranie. Tieto merania sa však nemohli opakovať pre uzatvorenie laboratórií z bezpečnostných dôvodov pre zabránenie šírenia koronavírusu. Grafické zobrazenie intenzít neutrálneho argónu pri zmene prietoku pracovného plynu a pri zmene výkonu generátora je zobrazené na obrázku 18. Grafické znázornenie trendov argónových čiar ostatných vlnových dĺžok je zobrazené v prílohe na obrázkoch P5 – P8.



Obrázok 18: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho argónu ² [3/2] $^{0}\rightarrow^{2}$ [3/2] (714,70 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.

Na obrázku 19 je grafické znázornenie charakteru intenzít atómov neutrálneho kyslíka v závislosti na prietoku pracovného plynu a výkonu generátora. Zvýšenie výkonu generátora malo za následok zvýšenie intenzít. Naopak pri zvyšovaní prietoku pracovného plynu dochádzalo k lineárnemu poklesu intenzít neutrálneho kyslíka. Tento pokles je pripisovaný menej intenzívnemu miešaniu argónu s okolitým vzduchom. Pre výkon 16 W boli intenzity znížené pri vyššom prietoku plynu. Tieto hodnoty boli získané zo spektrálnych čiar s vlnovou dĺžkou 777,19 nm, ostané vlnové dĺžky mali rovnaký priebeh a sú zobrazené v prílohe na obrázkoch P9 a P10. V prípade tripletu bolo zvyšovanie intenzít so zvýšením výkonu miernejšie. Grafické znázornenie je na obrázku 20.



Obrázok 19: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho kyslíka $S \rightarrow P$ (777,19 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok 20: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar tripletu neutrálneho kyslíka $S \rightarrow P$ (844,6 – 844,7 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.

Najvyššia intenzita prvého negatívneho systému dusíka bola nameraná pri prietoku 4 Slm a pri výkone generátora 16 W. Zvyšovanie prietoku pracovného plynu malo za následok znižovanie intenzít. Všetky namerané intenzity sú zobrazené na obrázku 21. Na obrázku 22 sú zobrazené intenzity druhého pozitívneho systému dusík. Rovnako najvyššia intenzita bola namerané pri výkone 16 W a prietoku pracovného plynu 4 Slm. Zvyšovanie výkonu generátora v oboch prípadoch spôsobuje zvyšovanie intenzít pre dané prietoky.



Obrázok 21: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar prvého negatívneho systému dusíka $(N_2^{+}({}^{2}\Sigma_u^{+}) \rightarrow N_2^{+}(X {}^{2}\Sigma_u^{+}))$ pás 0-0 (390 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok 22: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar druhého pozitívneho systému dusíka $(N_2(C^3\Pi_u) \rightarrow N_2(B^3\Pi_g))$ pás 0-2 (380 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.

Obrázok 23 popisuje vývoj intenzít gama systému oxidu dusnatého pri zvýšení výkonu generátora a pri zvýšení prietoku pracovného plynu. Zvyšovanie prietoku pracovného plynu spôsobilo zníženie intenzít gama systému NO, avšak zvýšenie výkonu generátora vykazovalo zvýšenie intenzít pre daný prietok.



Obrázok 23: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar gama systému oxidu dusnatého ($NO(A^{2}\Sigma^{+}) \rightarrow NO(X^{2}\Pi)$) pásu 0-2 (247,9 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.

Zvýšenie prietoku pracovného plynu malo za následok zníženie intenzít OH radikálov, pričom zvýšenie výkonu generátora naopak intenzity zvýšilo. Grafické znázornenie intenzít OH radikálov v závislosti na prietok plynu a výkon generátora je na obrázku 24.



Obrázok 24: *Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar OH radikálu (OH(A* $^2 \Sigma$) \rightarrow *OH(X* $^2\Pi$)) pásu 0-0 na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.

Na obrázku 25 sú snímky fakľového výboja so spätným vírovým prúdením plynu zhotovené vysokorýchlostnou kamerou. Výkon generátora bol nastavený na 16 W, prietok plynu bol postupne zvyšovaný z 2 Slm až na 8 Slm. Zvýšením prietoku pracovného plynu sa zvýraznilo rozvetvenie výboja.



Obrázok 25: Snímky fakľového výboja generovaného pri výkone 16 W.

Na obrázku 26 sú snímky z vysokorýchlostnej kamery pre porovnanie zmien výboja vplyvom zvyšovania výkonu generátora. Výkon generátora bol zvyšovaný postupne z 10 W na 16 W. Prietok plynu na všetkých snímkach je rovný 4 Slm. Je viditeľné, že pri zvýšení výkonu generátora je zvýšená intenzita žiarenia emitovaného časticami v plazme.



Obrázok 26: Snímky fakľového výboja s prietokom pracovného plynu 4 Slm – priamy pohľad (vľavo); pohľad z boku (vpravo).

4.2 Vizuálny dôkaz prítomnosti aktívnych častíc

V ďalšej fáze experimentu bolo cieľom dokázať prítomnosť aktívnych častíc vo výboji plazmy a ich účinok na umelo vytvorené kožné tkanivo. Na obrázku 27 je zobrazená simulácia kožného tkaniva v Petriho miske pred interakciou s plazmou generovanou pomocou surfatronu a po interakcii. Po aplikácií je vidieť odfarbené miesta, ktoré vznikli následkom oxidačných účinkov ROS a RNS: Bodové pôsobenie plazmou generovanou pomocou surfatronu (kapilára s vonkajším priemerom 8 mm a vnútorným priemerom 3 mm) s trvaním 20 sekúnd, vytvorilo na umelej koži odfarbené miesta s priemerným plošným obsahom 32,70 mm². Najväčšie odfarbené miesto malo obsah 71,06 mm².



Obrázok 27: Simulácia kožného tkaniva pred aplikáciou plazmy (vľavo); simulácia kožného tkaniva po aplikácii plazmy pomocou surfatronu (kapilára 8-3) (vpravo).

Na obrázku 28 je zobrazený dôkaz prítomnosti aktívnych častíc vo fakľovom výboji so spätným vírovým prúdením plynu a ich interakcia s umelým kožným tkanivom. Bodovým pôsobením fakľového výboja plazmy s trvaním 20 s na umelej koži vznikali odfarbené miesta s priemerným plošným obsahom 100,05 mm². Obsah najväčšej odfarbenej plochy bol 454,83 mm². Pre vylúčenie vplyvu žiarenia na odfarbenie, boli pri aplikácií použité filtre v podobe tabuľové skla, kremenného skla a fluoridu horečnatého. Použité filtre na odfarbenie nemali žiaden vplyv. Rovnako tak je vylúčený vplyv teploty, nakoľko teplotná stabilita farbiva indigo je viac ako 100 °C.



Obrázok 28: Simulácia kožného tkaniva pred aplikáciou plazmy (vľavo); simulácia kožného tkaniva po aplikácii fakľového výboja plazmy (vpravo).

4.3 Aplikácia plazmy na hojenie umelo vytvorených rán na koži myší

V tejto časti experimentu bolo pozorované zlepšenie hojenia umelo vytvorených rán na koži laboratórnych myší. Nasledujúce obrázky slúžia pre porovnanie kvality hojenia po terapii plazmou s kvalitou hojenia prirodzeným spôsobom. Terapia plazmou bola jednodňová alebo dvojdňová. V prípade jednodňovej terapie bol výboj aplikovaný na ranu ihneď po jej vytvorení s dobou aplikácie 10 s. V prípade dvojdňovej terapie bolo na ranu pôsobené ihneď po jej vytvorení a na ďalší deň, pričom v oboch prípadoch sa šlo o aplikácie s trvaním 10 s. Na obrázku 29 je séria fotografií jednej myši, ktorá zobrazuje vývoj hojenia umelo vytvorenej rany liečenej dvojdňovou aplikáciou plazmatickým výbojom zo surfatronu. Fotografie boli snímané po dobu 16 dní. Na ďalšom obrázku (obrázok 30) je séria fotografií jednej kontrolnej myši, ktorá zobrazuje vývoj hojenia umelo vytvorenej rany liečenej prirodzeným spôsobom. Fotografie boli snímané po dobu 16 dní. Plocha rany na takto vyhotovených fotografiách bola vyhodnocovaná v programe ImageJ. Percentuálne zacelenie rany v čase bolo vynesené do grafov.Na obrázkoch je viditeľne preukázané, že plocha rany sa pôsobením plazmy zaceľovala rýchlejšie ako prirodzeným spôsobom hojenia.



Obrázok 29: Vývoj procesu hojenia rany ovplyvneného plazmatickým výbojom zo surfatronu v časovom intervale 16 dní.



Obrázok 30: Vývoj procesu hojenia za normálnych podmienok v časovom intervale 16 dní.

Na obrázku 31 je zobrazené zaceľovanie rán s využitím plazmy generovanej pomocou surfatronu v porovnaní s hojením rán prirodzeným spôsobom. Prvá skupina myší bola liečená jednou aplikáciou výboja na ranu ihneď po jej vytvorení. Druhá skupina myší bola liečená aj na druhý deň, druhou aplikáciou toho istého výboja na ranu. Hodnoty plochy rany boli spriemerované pre celú skupinu, teda pre 10 myší. Na grafe sú preto zobrazené chybové úsečky. Z grafu vyplýva, že rana sa účinkami plazmy zaceľovala rýchlejšie. Efektívnejšia bola liečba zostavená z dvoch aplikácií.



Obrázok 31: Zacelenie rany v čase po jednodňovej terapii plazmou generovanou pomocou surfatronu v porovnaní s dvojdňovou terapiou plazmou generovanou pomocou surfatronu.

Obrázok 32 popisuje priebeh hojenia rán s využitím pochodňového výboja so spätným vírovým prúdením plynu vzhľadom k priebehu hojenia rán prirodzeným spôsobom. Skupina

myší bola liečená jednou aplikáciou fakľového výboja ihneď po vytvorení rany a druhá skupina myší bola liečená dvomi aplikáciami fakľového výboja na ranu, v deň vytvorenia rany a nasledujúci deň, v oboch prípadoch bola doba pôsobenia 10 s. Koža myší po interakcii s plazmou sa regeneruje rýchlejšie ako v prípade kože myší kontrolnej skupiny. Dvojdňová terapia vykazovala opäť lepšie výsledky.



Obrázok 32: Zacelenie rany v čase po jednodňovej terapii pochodňovým výbojom plazmy v porovnaní s dvojdňovou terapiou pochodňovým výbojom plazmy.

V ďalšom grafe je porovnanie účinkov plazmy generovanej pomocou surfatronu na hojenie rán a účinkov pochodňového výboja na hojenie rán. V oboch prípadoch sa šlo o jednodňovú terapiu. Z obrázku 33 je jasné, že rozdiely medzi typom výboja sa nijak významne neodrazili na účinnosti pri hojení. V oboch prípadoch je zacelenie rany rýchlejšie ako pri hojení prirodzenou cestou. Rovnaké výsledky boli aj pri porovnávaní dvojdňovej terapie. Spôsob generácie výboja na rýchlosť hojenia teda nemal významnejší vplyv. Porovnanie výsledkov dvojdňovej terapie plazmou generovanou pomocou surfatronu a dvojdňovej terapie fakľovým výbojom je na obrázku 34.



Obrázok 33: Zacelenie rany v čase po jednodňovej terapii plazmou generovanou pomocou surfatronu v porovnaní s jednodňovou terapiou pochodňovým výbojom plazmy.



Obrázok 34: Zacelenie rany v čase po dvojdňovej terapii plazmou generovanou pomocou surfatronu v porovnaní s dvojdňovou terapiou pochodňovým výbojom plazmy.

Počas pôsobenia plazmou generovanej pomocou surfatronu na vytvorené rany na koži myší boli termokamerou vyhotovené snímky v časových intervaloch 5 s, 10 s, 30 s a 60 s. Snímky sú zobrazené na obrázku 35. Okolie vytvorenej rany má vyššiu teplotu ako zvyšok tela, čo je ale spôsobené úvodnou fázou hojenia, ktorá nastupuje krátko po vytvorení rany. Koža sa účinkami plazmy zahriala len mierne. Teplota nepresiahla 40 °C ani po 60 sekundách interakcie výboja s kožou.



30 s 60 s *Obrázok 35: Zábery z termokamery v priebehu pôsobenia plazmou.*

Rovnako boli zhotovené snímky po aplikácií plazmy na rany pre porovnanie teplotného rozdielu na koži v závislosti na dĺžke aplikácie výboja. Tieto snímky boli zhotovené po aplikácií trvajúcej 60 s v časoch 5 s, 10 s, 20 s a 30 s a sú zobrazené na obrázku 36. Teplota ani v jednom prípade nepresiahla 40 °C.



Obrázok 36:Zábery z termokamery po pôsobení plazmou.

5 Záver

V tejto práci sme skúmali zlepšenie hojenia rán pôsobením plazmy. Vykonali sme diagnostiku plazmy generovanej pomocou surfatronu a taktiež diagnostiku fakľového výboja so spätným vírovým prúdením plynu. Diagnostika prostredníctvom optickej emisnej spektroskopie poskytla údaje o intenzitách emitovaného žiarenia reaktívnych častíc generovaných plazmou. Sledovanými časticami boli argón, atomárny kyslík, molekuly dusíka, oxid dusnatý a hydroxylový radikál. Najvyššie intenzity boli namerané vo vzdialenosti približne 2 mm od konca kremennej kapiláry v prípade všetkých pozorovaných častíc. Z vybraných intenzít spektrálnych čiar a pásov boli vypočítané parametre plazmy, ktoré zahŕňajú excitačnú teplotu elektrónov, vibračnú a rotačnú teplotu.

Bol sledovaný vplyv rôzneho výkonu generátora, a zároveň vplyv rôzneho prietoku pracovného plynu na intenzity argónu, atomárneho kyslíka, molekuly dusíka, oxidu dusnatého a hydroxylového radikálu generované vo fakľovom výboji so spätným vírovým prúdením plynu. Zvyšovanie výkonu generátora spôsobilo zvýšenie intenzít spektrálnych čiar a pásov všetkých častíc. Zvýšením energie systému je zvýšený počet zrážok častíc a tým dochádza ku generácií väčšieho počtu aktívnych častíc, čo vysvetľuje zvýšenie ich spektrálnych intenzít. Naopak, zvyšovanie prietoku pracovného plynu malo na intenzity negatívny vplyv. Tento trend je spôsobený slabším primiešavaním okolitého vzduchu do prostredia plazmy. Taktiež bol tento typ výboja sledovaný pomocou vysokorýchlostnej kamery. Výsledky ukázali, že zvyšovanie výkonu generátora vedie k súčasnému vzniku väčšieho množstva výbojových filamentov. Zvyšovanie prietoku pracovného plynu má za následok ich rýchlejšiu rotáciu, a zmenu smeru filamentov prestupujúcich do okolitého prostredia, čo však možno vidieť na len na videovom zázname.

Prítomnosť častíc bola preverená aj vizuálne, interakciou s umelou kožou nafarbenou farbivom indigo. Použitie optických filtrov potvrdilo účinok aktívnych častíc na pripravenú simuláciu kože. Vplyv samotného žiarenia emitovaného plazmou bol nemerateľný, avšak je predpokladané jeho synergické pôsobenie pri aplikácii. Fakľový výboj vykazoval interakciu s väčšou plochou umelej kože.

Na základe teoretických znalostí o účinkoch plazmy na hojenie rán boli uskutočnené experimenty na umelo vytvorených ranách na koži laboratórnych myší. Rana sa účinkami plazmy zaceľovala rýchlejšie v porovnaní s hojením prirodzeným spôsobom. Lepšie výsledky vo všeobecnosti dosahovala terapia plazmou v trvaní 10 s aplikovaná opakovane s odstupom jedného dňa oproti 10 s aplikácie len v jeden deň. Za efektívny spôsob generácie plazmy na hojenie rán možno považovať rovnako výboj s povrchovou vlnou ako aj fakľový výboj so spätným vírovým prúdením plynu. Teplota ošetrovanej pokožky nepresahuje 40 °C, táto terapia je teda z hľadiska tepelného poškodenia bezpečná.

Ďalšie experimenty a plánovaná prezentácia výsledkov na medzinárodnej konferencii v Bulharsku nemohli byť realizované z dôvodu bezpečnostných opatrení týkajúcich sa vzniknutej celosvetovej koronakrízy.

Výsledky tejto práce sú prínosom pre projekt pod akronymom PLASMABORDER. Cieľom tohto projektu je vývoj funkčného plazmového pera pre medicínske použitie. Predmetom záujmu našich budúcich štúdií by mohol byť detailný výskum a optimalizácia podmienok ošetrenia rán, rozdelenie aktívnych častíc v priestore, a prípadné využitie zmesi argónu s héliom na generáciu plazmy.

6 Zoznam použitých skratiek

CAP	Studená atmosférická plazma (cold atmospheric plasma)		
ROS	Reaktívne častice kyslíka (reactive oxygen species)		
RNS	Reaktívne častice dusíka (reactive nitrogen species)		
DC	Jednosmerný prúd (direct current)		
DBD	Dielektrický bariérový výboj (dielectric barrier discharge)		
APPJ	Plazmová tryska pracujúca pri atmosférickom tlaku		
	(atmospheric preasure plasma jet)		
FE-DBD	Dielektrický bariérový výboj s pohyblivou elektródou (Floating electrode		
	dielectric barrier discharge)		
NADPH	Nikotínamid-adenin-dinukleotid fosfát		
DNA	Deoxyribonukleová kyselina		
SARS	Ťažký akútny respiračný syndróm (Severe acute respiratory syndrome)		
COVID-19	Ochorenie vyvolané koronavírusom (Coronavirus disease)		
AIDS	Syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti (Acquired Immune		
	Deficiency Syndrome)		
EDRF	Endotelom derivovaný relaxačný faktor (Endothelium-derived relaxing		
	factor)		
GC	Guanylátcykláza		
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát		
iNOS	Induktívna NO-syntáza		
CCD	Nábojovo viazaná súčiastka (Charge-coupled device)		
VUV	Vákuové ultrafialové (Vacuum ultraviolet)		
OES	Optická emisná spektroskopia (optical emission spectroscopy)		
LIF	Laserom indukovaná fluorescencia(Laser-induced fluorescence)		
FTIR	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (Fourier-		
	transform infrared spectroscopy)		
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay		
vWf	Von Willebrand faktor		
ATP	Adenozíntrifosfát		
ADP	Adenozíndifosfát		
MW	Mikrovlna (microwave)		

7 Literatúra

- KAUSHIK, N., N. KAUSHIK, N.LINH, B. GHIMIRE, A. PENGKIT, J.SORNSAKDANUPHAP, S.LEE a E. CHOI. Plasma and Nanomaterials: Fabrication and Biomedical Applications. Nanomaterials. 2019, 9(1). DOI: 10.3390/nano9010098. ISSN 2079-4991. Dostupné také z: <u>http://www.mdpi.com/2079-4991/9/1/98</u>
- KONG, M G, M KEIDAR, K OSTRIKOV, Bhagirath GHIMIRE, Anchalee PENGKIT, Jirapong SORNSAKDANUPHAP, Su-Jae LEE a Eun CHOI. Plasmas meet nanoparticles—where synergies can advance the frontier of medicine: Fabrication and Biomedical Applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2011, 44(17). DOI: 10.1088/0022-3727/44/17/174018. ISSN 0022-3727. Dostupné také z: http://stacks.iop.org/0022-

3727/44/i=17/a=174018?key=crossref.c575287f0d5e2832258f2cf71e8fe722

- 3. LEDVINA, M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0851-0.
- SCHLEGEL, J., J. KÖRITZER, V. BOXHAMMER, et al. Plasma in cancer treatment: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Clinical Plasma Medicine*. SPIE, 2013, 2018-4-16, 1(2), 2-7. DOI: 10.1016/j.cpme.2013.08.001. ISBN 9781510617322. ISSN 22128166. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212816613000206
- REIAZI, R., M. E. AKBARI, A. NOROZI, et al. Application of Cold Atmospheric Plasma (CAP) in Cancer Therapy: A Review. *International Journal of Cancer Management*. SPIE, 2017, 2018-4-16, **10**(3), 2-7. DOI: 10.5812/ijcp.8728. ISBN 9781510617322. ISSN 2538-497X. Dostupné také z: <u>http://ijcancerprevention.com/en/articles/8728.html</u>
- ZHANG, X., M. LI, R. ZHOU, K. FENG a S.YANG. Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. *Applied Physics Letters*. 2008, **93**(2). DOI: 10.1063/1.2959735. ISSN 0003-6951. Dostupné také z: <u>http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2959735</u>
- WALK, R. M., J. A. SNYDER, P. SRINIVASAN, et al. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*. 2013, 48(1), 67-73. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.10.020. ISSN 00223468. Dostupné také z: <u>https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346812007968</u>
- VOLOTSKOVA, O., T. S. HAWLEY, M. A. STEPP a M. KEIDAR. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific Reports*. 2012, 2(1). DOI: 10.1038/srep00636. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <u>http://www.nature.com/articles/srep00636</u>
- ARNDT, S., E. WACKER, Y.LI, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Experimental Dermatology*. 2013, 22(4), 284-289. DOI: 10.1111/exd.12127. ISSN 09066705. Dostupné také z: <u>http://doi.wiley.com/10.1111/exd.12127</u>
- GEORGESCU, N., C. P. LUNGU, A. R. LUPU, et al. Atomic Oxygen Maximization in High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2010, **38**(11), 3156-3162. DOI: 10.1109/TPS.2010.2070811. ISSN 0093-3813. Dostupné také z: <u>http://ieeexplore.ieee.org/document/5625074/</u>

- 11. BRULLÉ, L., M. VANDAMME, D. RIÈS, et al. Effects of a Non Thermal Plasma Treatment Alone or in Combination with Gemcitabine in a MIA PaCa2-luc Orthotopic Pancreatic Carcinoma Model. PLoS ONE. 2012. 7(12), 3156-3162. DOI: 10.1371/journal.pone.0052653. ISSN 1932-6203. Dostupné také Z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052653
- KEIDAR, M, R WALK, A SHASHURIN, et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British Journal of Cancer*. 2011, **105**(9), 1295-1301. DOI: 10.1038/bjc.2011.386. ISSN 0007-0920. Dostupné také z: <u>http://www.nature.com/articles/bjc2011386</u>
- AHN, H. J., K. Il KIM, G. KIM, et al. Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. *PLoS ONE*. 2011, 6(11), 1295-1301. DOI: 10.1371/journal.pone.0028154. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <u>https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028154</u>
- PAN, J., K. SUN, Y. LIANG, et al. Cold Plasma Therapy of a Tooth Root Canal Infected with Enterococcus faecalis Biofilms In Vitro: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Journal of Endodontics*. SPIE, 2013, 2018-4-16, **39**(1), 105-110. DOI: 10.1016/j.joen.2012.08.017. ISBN 9781510617322. ISSN 00992399. Dostupné také z: <u>https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239912008084</u>
- 15. CHA, S., Y.PARK, M. KEIDAR, et al. Plasma in dentistry: A Review. *Clinical Plasma Medicine*. SPIE, 2014, 2018-4-16, 2(1), 4-10. DOI: 10.1016/j.cpme.2014.04.002. ISBN 9781510617322. ISSN 22128166. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212816614000055
- 16. XINPEI LU, M., D YINGUANG CAO, R L PING YANG, et al. An \$RC\$ Plasma Device for Sterilization of Root Canal of Teeth. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2009, **37**(5), 668-673. DOI: 10.1109/TPS.2009.2015454. ISSN 0093-3813. Dostupné také z: <u>http://ieeexplore.ieee.org/document/4810164/</u>
- 17. ERMOLAEVA, S. A., A. F. VARFOLOMEEV, M. Y.. CHERNUKHA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds: A Review. *Journal of Medical Microbiology*. InTech, 2011, 2018-05-16, **60**(1), 75-83. DOI: 10.1099/jmm.0.020263-0. ISBN 978-1-78923-112-0. ISSN 0022-2615. Dostupné také z: <u>https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.020263-0</u>
- DAESCHLEIN, G., S. SCHOLZ, R. AHMED, et al. Skin decontamination by lowtemperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma: A Review. *Journal of Hospital Infection*. InTech, 2012, 2018-05-16, **81**(3), 177-183. DOI: 10.1016/j.jhin.2012.02.012. ISBN 978-1-78923-112-0. ISSN 01956701. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670112000965
- MOREAU, S., M. MOISAN, M. TABRIZIAN, et al. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate Bacillus subtilis spores: Influence of the operating conditions. *Journal of Applied Physics*. 2000, 88(2), 1166-1174. DOI: 10.1063/1.373792. ISSN 0021-8979. Dostupné také z: http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.373792
- 20. DIGEL, I., A. Temiz ARTMANN, K. NISHIKAWA, et al. Bactericidal effects of plasma-generated cluster ions: Influence of the operating conditions. *Journal of Applied*

Physics. 2005, **43**(6), 800-807. DOI: 10.1007/BF02430960. ISSN 0140-0118. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/BF02430960

- 21. RYBKA, J.. Diabetes mellitus komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy. Praha: Grada, 2007. ISBN ISBN:978-80-247-1671-8.
- 22. STACH, V.: *Plazma čtvrté skupenství hmoty*, 1988. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. ISSN 14-186-89
- 23. MARTIŠOVITŠ, V., Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium. 2006, Bratislava: Vydavateľstvo UK. ISBN 80-223-1983-X.
- 24. CHEN F., F., *Úvod do fyziky plazmatu*, 1984, 3.vydání, Academia, nak. ČS AV v Praze, překlad Karel Pohlena.
- 25. HLOCHOVÁ, L., *Studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 34 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
- 26. BRUCHANOV, M.: Plazmová sterilizace, Fyzikální metody v medicíně II., 2005
- 27. KOZÁKOVÁ, Z.: *Plazmochemie I*, oficiální výukový materiál do předmětu Plazmochemie I, Ústav fyzikální a spotřební chemie, FCH VUT Brno, 2011.
- LIŠKOVÁ, M., Syntézy za neklasických podmínek E-Learningový kurs [online]. Brno, 2008.Dostupné z: http://is.muni.cz/th/77987/prif_m/. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Pavel Pazdera.
- 29. FOJTÍKOVÁ, P., *Studium plazmochemické redukce korozních vrstev na bronzu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 36 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.
- 30. AUBRECHT, V., *Technické aplikace plazmatu současný stav a trendy rozvoje*, VUT Brno, Fakulta elektrotechniky a komunikačnich technologii, přednašky.
- 31. HLOCHOVÁ, L., Diagnostika plazmatu výboje ve vodných roztocích a jeho aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
- 32. POTOČŇÁKOVÁ, L.. Studium plazmového zdroje buzeného povrchovou vlnou. Brno, 2012. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Ústav fyzikální elektroniky. Vedoucí práce Doc. Mgr. Vít Kudrle, Ph.D.
- HOFFMANN, C., C. BERGANZA a J. ZHANG. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas Research*. 2013, 3(1). DOI: 10.1186/2045-9912-3-21. ISSN 2045-9912. Dostupné také z: http://medicalgasresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-9912-3-21.
- 34. TENDERO, C., TIXIER, C., TRISTANT,P., DESMAISON J., LEPRINCE, P., 2006. Atmospheric pressure plasmas: A review. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy [online]. 61(1), 2-30. DOI: 10.1016/j.sab.2005.10.003. ISSN 05848547. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854705002843Bogaerts,
- BOGAERTS, C., C. NEYTS, P. GIJBELS, et al., 2002. Gas discharge plasmas and their applications: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online].
 57(4), 609-658. DOI: 10.1016/S0584-8547(01)00406-2. ISSN 05848547. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854701004062

- 36. ROTH, J. Reece., 1995. *Industrial plasma engineering*. Philadelphia: Institute of Physics Pub. ISBN 07-503-0317-4.
- 37. MOISAN, M., Z. ZAKRZEWSKI, R. PANTEL a P. LEPRINCE. A Waveguide-Based Launcher to Sustain Long Plasma Columns through the Propagation of an Electromagnetic Surface Wave. *IEEE Transactions on Plasma Science* [online]. 1984, 12(3), 203-214. DOI: 10.1109/TPS.1984.4316320. ISSN 0093-3813. Dostupné z: http://ieeexplore.ieee.org/document/4316320/
- 38. RAYLEIGH, L.. On Waves Propagated along the Plane Surface of an Elastic Solid. *Proceedings of the London Mathematical Society* [online]. 1885, s1-17(1), 4-11. DOI: 10.1112/plms/s1-17.1.4. ISSN 00246115. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1112/plms/s1-17.1.4
- 39. MOISAN, M., C.M. FERREIRA, Y. HAJLAOUI, D. HENRY, J. HUBERT, R. PANTEL, A. RICARD a Z. ZAKRZEWSKI. Properties and applications of surface wave produced plasmas. *Revue de Physique Appliquée* [online]. 1982, **17**(11), 707-727. DOI: 10.1051/rphysap:019820017011070700. ISSN 0035-1687. Dostupné z: http://www.edpsciences.org/10.1051/rphysap:019820017011070700
- 40. MOISAN, M., A., SHIVAROVA a A. W. TRIVELPIECE. Experimental investigations of the propagation of surface waves along a plasma column. *Plasma Physics* [online]. 1982, 24(11), 1331-1400. DOI: 10.1088/0032-1028/24/11/001. ISSN 0032-1028. Dostupné z: http://stacks.iop.org/0032-1028/24/i=11/a=001?key=crossref.b8331ecdbc622c11c3e851a9f377fd31
- FERREIRA, C. M., TATAROVA, E., HENRIQUES J., DIAS, F. M., Modelling of largescale microwave plasma sources. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2009, 42(19), 194016. DOI: 10.1088/0022-3727/42/19/194016. ISSN 0022-3727. Dostupné z: http://stacks.iop.org/0022-

3727/42/i=19/a=194016?key=crossref.f52f42c9db0db6d728862e124e7bcc1c

- 42. MOISAN, M., Z., ZAKRZEWSKI, J., HENRIQUES a F. M., DIAS. Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 1991, 24(7), 1025-1048. DOI: 10.1088/0022-3727/24/7/001. ISSN 0022-3727. Dostupné z: http://stacks.iop.org/0022-3727/24/i=7/a=001?key=crossref.13ca5c0be2d676b26bba4e9029d7bf54
- 43. MOISAN, M., M., CHAKER, Z., ZAKRZEWSKI a J., PARASZCZAK. The waveguide surfatron: a high power surface-wave launcher to sustain large-diameter dense plasma columns. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* [online]. 1987, 20(11), 1356-1361. DOI: 10.1088/0022-3735/20/11/009. ISSN 0022-3735. Dostupné z: http://stacks.iop.org/0022-

 $3735/20/i{=}11/a{=}009?key{=}crossref.4ae91da2ab7bea8dc05aa6382024d8c2$

44. MOISAN, M., C. BEAUDRY, P. LEPRINCE a J PARASZCZAK. A Small Microwave Plasma Source for Long Column Production without Magnetic Field: a high power surface-wave launcher to sustain large-diameter dense plasma columns. IEEE **Transactions** Plasma Science [online]. 1975, **3**(2), 55-59. DOI: on 10.1109/TPS.1975.4316875. ISSN 0093-3813. Dostupné z: http://ieeexplore.ieee.org/document/4316875/

- 45. DEBORD, B., R. JAMIER, F. GÉRÔME, O. LEROY, C. BOISSE-LAPORTE, P. LEPRINCE, L. L. ALVES a F. BENABID. Generation and confinement of microwave gas-plasma in photonic dielectric microstructure: methods of production and application in dentistry and oncology. *Optics Express.* 2013, **21**(21). DOI: 10.1364/OE.21.025509. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <u>https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-21-21-25509</u>
- 46. SCHOLTZ, V. a J. KHUN. Netermální plazma pro rozklad CO2. In: Česká technologická platforma pro biopaliva [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: https://www.biopaliva-

 $ctpb.cz/index.php?option=com_attachments \& task=download \& id=\!41$

- 47. ŠEDIVCOVÁ, P. *Reaktivní formy kyslíku a jejich neurofyziologická úloha*. Praha, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Fakulta tělesné výchovy a sportu. Vedoucí práce Doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D
- ELVIS, AM a JS EKTA. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2011, 2(1). DOI: 10.4103/0976-9668.82319. ISSN 0976-9668. Dostupné také z: http://www.jnsbm.org/text.asp?2011/2/1/66/82319
- 49. CLAVO, B. N. SANTANA-RODRÍGUEZ, P. LLONTOP, et al. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? Evidence-Based *Complementary* and Alternative Medicine. 2018. 2018(1), 1-11. DOI: 10.1155/2018/7931849. ISSN 1741-427X. Dostupné také Z: https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/7931849/
- 50. FRIDMAN, G., G. FRIEDMAN, A. GUTSOL, A. B. SHEKHTER, V. N. VASILETS a A. FRIDMAN. Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*. SPIE, 2008, 2018-4-16, 5(6), 503-533. DOI: 10.1002/ppap.200700154. ISBN 9781510617322. ISSN 16128850. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/ppap.200700154
- PACHER, P., J. S. BECKMAN, L. LIAUDET, et al. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease: Is Further Research Warranted? *Physiological Reviews*. 2007, 87(1), 315-424. DOI: 10.1152/physrev.00029.2006. ISSN 0031-9333. Dostupné také z: https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00029.2006
- 52. PUDIŠ, D.. Kvantová fyzika: Doplnkové materiály k prednáškam z fyziky III pre EF. In: *Katedra fyziky, Fakulta elektrotechniky a informačných technológií, ŽIlinská univerzita* [online]. Žilina, 2011 [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: https://fyzika.uniza.sk/~pudis/lecture/5_kvantova%20fyzika.pdf
- 53. SCHOLTZ, V., *Nízkoteplotná plazma III základná diagnostika, spektroskopia*, In AGA & Štefánikova hvězdárna v Praze, 2012
- 54. MOISAN, M., J. BARBEAU, M. CREVIER, et al. Plasma sterilization. Methods and mechanisms: Is Further Research Warranted? *Pure and Applied Chemistry*. 2002, 74(3), 349-358. DOI: 10.1351/pac200274030349. ISSN 1365-3075. Dostupné také z: http://www.degruyter.com/view/j/pac.2002.74.issue-3/pac200274030349/pac200274030349.xml
- 55. MOISAN, M, J BARBEAU, S MOREAU, et al. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, **226**(1-2), 1-21. DOI: 10.1016/S0378-

5173(01)00752-9. ISSN 03785173. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301007529

- 56. ZVEREVA, G., I. KIRTSIDELI, E. MACHS, A. VANGONEN, A. M. KABANOV a V. F. TARASENKO. Mechanisms of the effect of VUV radiation on the microfungi. *International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers XIII*. SPIE, 2018, 2018-4-16, 77-. DOI: 10.1117/12.2303532. ISBN 9781510617322. Dostupné také z: https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-ofspie/10614/2303532/Mechanisms-of-the-effect-of-VUV-radiation-on-themicrofungi/10.1117/12.2303532.full
- 57. SCHOLTZ, V., J. PAZLAROVA, H. SOUSKOVA, et al. Nonthermal plasma A tool for decontamination and disinfection: A Review. *Biotechnology Advances*. SPIE, 2015, 2018-4-16, 33(6), 1108-1119. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002. ISBN 9781510617322. ISSN 07349750. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015000038
- 58. XIONG, Z., J. PAZLAROVA, H. SOUSKOVA, et al. Cold Atmospheric Pressure Plasmas (CAPs) for Skin Wound Healing: A Review. *Plasma Medicine - Concepts and Clinical Applications*. InTech, 2018, 2018-05-16, **33**(6), 1108-1119. DOI: 10.5772/intechopen.76093. ISBN 978-1-78923-112-0. ISSN 07349750. Dostupné také z: http://www.intechopen.com/books/plasma-medicine-concepts-and-clinicalapplications/cold-atmospheric-pressure-plasmas-caps-for-skin-wound-healing
- 59. CHLOUPEK, J. *Řízený zdroj vysokého napětí*.Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 68s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jaroslav Koton, Ph.D..
- 60. JOSHI, S. G., M. COOPER, A. YOST, et al. Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011, 55(3), 1053-1062. DOI: 10.1128/AAC.01002-10. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <u>http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01002-10</u>
- MENDIS, D.A., M. ROSENBERG, F. AZAM, et al. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria: A Review. *IEEE Transactions on Plasma Science*. InTech, 2011, 2018-05-16, 28(4), 1304-1306. DOI: 10.1109/27.893321. ISBN 978-1-78923-112-0. ISSN 00933813. Dostupné také z: http://ieeexplore.ieee.org/document/893321/
- LAROUSSI, M., M. ROSENBERG, F. AZAM, et al. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Transactions on Plasma Science*. InTech, 2002, 2018-05-16, **30**(4), 1409-1415. DOI: 10.1109/TPS.2002.804220. ISBN 978-1-78923-112-0. ISSN 0093-3813. Dostupné také z: <u>http://ieeexplore.ieee.org/document/1167632/</u>
- 63. SVOBODOVÁ, K.. *Imunitní mechanizmy v patogenezi paradontitidy*. Praha, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Fyziologie živočíchů a vývojové biologie. Vedoucí práce RNDr. Jiřina Bártová, CSc.
- 64. LEDUC, M, D GUAY, R L LEASK, et al. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. *New Journal of Physics*. 2009, **11**(11), 1295-1301. DOI: 10.1088/1367-

2630/11/11/115021. ISSN 1367-2630. Dostupné také z: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1367-2630/11/11/115021

- 65. KEIDAR, M., D GUAY, R L LEASK, et al. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology*. 2015, 24(3), 1295-1301. DOI: 10.1088/0963-0252/24/3/033001. ISSN 0963-0252. Dostupné také z: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0963-0252/24/3/033001
- 66. YAN, D., J. H. SHERMAN, M. KEIDAR, et al. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality: A Review. *Oncotarget*. SPIE, 2017, 2018-4-16, 8(9), 2-7. DOI: 10.18632/oncotarget.13304. ISBN 9781510617322. ISSN 1949-2553. Dostupné také z: <u>http://www.oncotarget.com/fulltext/13304</u>
- 67. JAMBOROVÁ, G.. Interakce tkáňových systémů s přípravkem MDOC[™]. Hradec Králové, 2009. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.
- 68. HAŠOVÁ, K. a J. MARŠÁLKOVÁ. *Hojení ran.* Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2012. ISBN 978-80-7464-114-5.
- 69. BUKOVČAN, P.. *Hojenie rán*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2019. ISBN 978-80-223-4793-8
- 70. WALD, M.. Hojení ran za patologických podmínek. *Interní medicína pro praxi* [online].
 2002, (10), 494 498 [cit. 2020-05-18]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: https://www.solen.cz/pdfs/int/2002/10/04.pdf
- 71. VEVERKOVÁ, L.. *Rány a hojení, chirurgické rány* [online]. In:. [cit. 2020-05-18].
 Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/VLTZ0451c/um/TZKM-CZ-2017_Veverkova.pdf. Studijní materiály.
- 72. BERNHARDT, T., M. L. SEMMLER, M. SCHÄFER, et al. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative Medicine* and Cellular Longevity. 2019, 2019(6), 1-10. DOI: 10.1155/2019/3873928. ISSN 1942-0900. Dostupné také z: https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/3873928/
- 73. WEISS, M., D. GÜMBEL, E. HANSCHMANN, et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways: A Review. *PLOS ONE*. 2015, **10**(7), 315-424. DOI: 10.1371/journal.pone.0130350. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130350
- 74. NAKAI, N., R. FUJITA, F. KAWANO, et al. Retardation of C2C12 myoblast cell proliferation by exposure to low-temperature atmospheric plasma: A Review. *The Journal of Physiological Sciences*. 2014, 64(5), 365-375. DOI: 10.1007/s12576-014-0328-5. ISSN 1880-6546. Dostupné také z: https://jps.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12576-014-0328-5
- 75. KWON, TAEHO, NISANSALA CHANDIMALI, DONG-HO LEE, et al. Potential Applications of Non-thermal Plasma in Animal Husbandry to Improve Infrastructure: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *In Vivo*. 2019, **33**(4), 999-1010. DOI: 10.21873/invivo.11569. ISSN 0258-851X. Dostupné také z: http://iv.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/invivo.11569

- 76. MOHD NASIR, N., B.K. LEE, S.S. YAP, et al. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. Archives of **Biochemistry** and Biophysics. 2016. **605**(4), 76-85. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.033. ISSN 00039861. Dostupné také Z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986116300935
- 77. NOMURA, Y., T. TAKAMATSU, H. KAWANO, et al. Investigation of blood coagulation effect of nonthermal multigas plasma jet in vitro and in vivo: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Journal of Surgical Research*. 2017, 219(4), 302-309. DOI: 10.1016/j.jss.2017.06.055. ISSN 00224804. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480417304377
- 78. ARJUNAN, K. P., G. FRIEDMAN, A. FRIDMAN, et al. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Journal of The Royal Society Interface*. 2011, 9(66), 147-157. DOI: 10.1098/rsif.2011.0220. ISSN 1742-5689. Dostupné také z: https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2011.0220
- 79. KUBINOVA, S., K. ZAVISKOVA, L. UHERKOVA, et al. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), 147-157. DOI: 10.1038/srep45183. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/srep45183
- 80. HAERTEL, B., T. WOEDTKE, K. WELTMANN, et al. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Scientific Reports*. 2014, **22**(6), 477-490. DOI: 10.4062/biomolther.2014.105. ISSN 2005-4483. Dostupné také z: http://www.biomolther.org/journal/DOIx.php?id=10.4062/biomolther.2014.105
- 81. WU, A. S., S. KALGHATGI, D. DOBRYNIN, et al. Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Journal of Surgical Research*. 2013, **179**(1), e1-e12. DOI: 10.1016/j.jss.2012.02.039. ISSN 00224804. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480412001382
- 82. FRIDMAN, G., M. PEDDINGHAUS, M. BALASUBRAMANIAN, et al. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2006, **26**(4), 425-442. DOI: 10.1007/s11090-006-9024-4. ISSN 0272-4324. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s11090-006-9024-4
- 83. KALGHATGI, S., G. FRIDMAN, G. NAGARAJ, et al. Mechanism of blood coagulation by non-thermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. 2007 16th IEEE International Pulsed Power Conference. IEEE, 2007, 2007, 26(4), 1058-1063. DOI: 10.1109/PPPS.2007.4652371. ISBN 978-1-4244-0913-6. ISSN 0272-4324. Dostupné také z: http://ieeexplore.ieee.org/document/4652371/

- 84. ZOMER, H. D., A. G. TRENTIN, G. NAGARAJ, et al. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*. IEEE, 2018, 2007, **90**(1), 3-12. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.12.009. ISBN 978-1-4244-0913-6. ISSN 09231811. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181117310137
- 85. KRČMA, F.,TSONEV, I., SMEJKALOVÁ, K., TRUCHLÁ, D., KOZÁKOVÁ, Z., ZHEKOVA, M., MARINOVA, P., BOGDANOV, T., BENOVA, E, 2018. Microwave micro torch generated in argon based mixtures for biomedical applications. *Journal of Physics D: Applied Physics.* **51**(41). DOI: 10.1088/1361-6463/aad82b. ISSN 0022-3727. Dostupné také z: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/aad82b
- 86. PEARCE, R. W. B., GAYDON, A. G., The Identification of Molecular Spectra, Springer Netherlands, 1976, ISBN: 978-94-009-5760-2

8 Príloha



Obrázok P1: Integrálne intenzity čiar neutrálneho argónu vlnovou dĺžkou 603,21 nm (vľavo) a s vlnovou dĺžkou 667,73 nm (vpravo) v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry.



Obrázok P2: Integrálne intenzity čiar neutrálneho argónu vlnovou dĺžkou 675,28 nm (vľavo) a s vlnovou dĺžkou 687,17 nm (vpravo) v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry



Obrázok P3 Intenzita čiary neutrálneho kyslíka (777,19 nm)v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry(vľavo); intenzita čiary v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vpravo).



Obrázok P4: Intenzity druhého pozitívneho systému dusíka pásu 1-3 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vľavo); intenzity toho istého systému dusíka pásu 2-4 v závislosti na vzdialenosti od konca kapiláry (vpravo).



Obrázok P5: *Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho argónu*² [3/2] $^{0} \rightarrow^{2}$ [3/2] (603,21 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok P6: *Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho argónu*² [3/2] $^{0}\rightarrow^{2}$ [3/2] (667,73 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok P7: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho argónu 2 [3/2] ${}^{0} \rightarrow {}^{2}$ [3/2] (675,28 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok 37: *Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho argónu*² [3/2] $^{0}\rightarrow^{2}$ [3/2] (687,17 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok P9: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar neutrálneho kyslíka $S \rightarrow P$ (777,42 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.



Obrázok P10: Grafické znázornenie závislosti intenzít čiar tripletu neutrálneho kyslíka $S \rightarrow P$ (777,54 nm) na prietoku pracovného plynu a výkone generátora.