

ISPITIVANJE DEJSTVA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME *IN VITRO* NA BAKTERIJE I MEZENHIMALNE MATIČNE ČELIJE

UVOD

Plazma se smatra četvrtim agregatnim stanjem, a definiše kao neutralni jonizovani gas sastavljen od različitih čestica. Te čestice uključuju fotone, elektrone, pozitivne i negativne jone, atome, slobodne radikale i pobuđene ili nepobuđene molekule.

U zavisnosti od uslova pod kojim se stvaraju, razlikuju se dve osnovne kategorije plazmi: visokotemperaturne ili ravnotežne i niskotemperaturne ili neravnotežne. Visokotemperaturne plazme se karakterišu lokalnom termodinamičnom ravnotežom između elektrona i teških čestica, odnosno temperatura gasa je približno ista za sve komponente plazme i može biti veoma visoka ($5\text{-}20 \times 10^3 \text{K}$). Kod neravnotežnih ili niskotemperaturnih plazmi, temperatura elektrona je 100 do 1000 puta viša od temperature ostalih čestica, čime se postižu veoma visoke koncentracije hemijski aktivnih čestica bez zagrevanja gasa (1).

Jedinstvene hemijske karakteristike plazme i naučno razumevanje plazma fenomena predstavljaju osnov za razvoj plazma tehnologije koja je našla primenu u različitim oblastima, prvenstveno industrije. Novo aktuelno polje izučavanja, pred kojim su postavljeni veliki zahtevi i očekivanja je primena plazma tehnologije u oblastima medicine i biologije. Prva ovakva istraživanja bila su usmerena na termičke efekte ravnotežnih plazmi i danas su već komercijalno dostupni različiti sistemi zasnovani na ovom principu, primarno za koagulaciju i uklanjanje tkiva (2). Ipak, za biomedicinsku primenu plazma tehnologije posebno su interesantne neravnotežne odnosno niskotemperaturne plazme, jer iako ispoljavaju visoku reaktivnost, one deluju samo površinski i ne izazivaju termička oštećenja. Pored toga, kod ovih plazmi moguće je precizno kontrolisati sastav i plazmahemijske procese u zavisnosti od željenog efekta. Ovakve karakteristike su otvorile širok spektar potencijalnih primena, prvenstveno kada se radi o tretmanu termalno neotpornih materijala i različitih bioloških sistema. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da se delovanjem plazme mogu selektivno poboljšati osobine različitih površina i biokompatibilnost, što je našlo primenu u modifikaciji površina biomaterijala (3). Druga važna oblast primene zasnovana je na snažnom antimikrobnom dejstvu plazme koje se ostvaruje sinergističkim delovanjem različitih biohemijski aktivnih sastojaka plazme, a bez pratećih hemijskih i termičkih oštećenja (4). Plazma sterilizacija je već ustanovljena kao široko korišćena alternativa standardnim metodama sterilizacije.

Pored nedvosmisleno dokazane efikasnosti primene niskotemperaturnih plazmi u navedenim *in vitro* i *ex vivo* uslovima, danas se posebna pažnja posvećuje istraživanjima vezanim za mogućnost primene ovih plazmi *in vivo*. Za primenu niskotemperaturne plazme *in vivo* neophodno je da se plazma stvara na atmosferskom pritisku sa temperaturom gasa koja je približna sobnoj. Pored toga, postizanje efikasnog i bezbednog tretmana plazmom, zahteva preciznu optimizaciju uslova pod kojima se plazma primenjuje. Stoga su istraživačke aktivnosti u poslednjoj dekadi bile usmerene na razvijanje različitih izvora niskotemperaturnih atmosferskih plazmi koje odgovaraju *in vivo* primeni u biomedicini. U većini ovakvih izvora

plazmi koristi se inertni gas helijum kako bi se olakšao proboj i dobijanje plazme na nižim naponima. E. Stoffels i sar. su 2002. godine razvili "mikroplazmu", takozvanu plazma iglu, čije dimenzije i konstrukcija omogućavaju laku dostupnost mestu tretmana i lokalizovano dejstvo (5). Ovaj model bio je osnov za konstrukciju modifikovane plazma igle u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu, gde su definisani relevantni radni parametri, kao što su snaga i sastav plazme (6).

S obzirom na veoma efikasno antimikrobno dejstvo niskotemperaturnih atmosferskih plazmi, otvara se mogućnost za njihovu primenu za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju. Ovakav pristup je posebno važan zbog rastućeg problema rezistencije mikroorganizama, pre svega bakterija, na postojeće antimikrobne agense (7). Danas se svuda u svetu uočava porast učestalosti izolovanja rezistentnih i multirezistentnih bakterija, kao što su meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin rezistentan enterokok, enterične bakterije koje proizvode beta laktamaze proširenog spektra delovanja i druge (7). Pored toga, niskotemperaturne atmosferske plazme zbog svojih osobina predstavljaju moguće rešenje i za terapiju infekcija izazvanih bakterijama koje rastu u vidu biofilma. Biofilm je zajednica bakterijskih ćelija koje su ireverzibilno adherisane za površinu i uronjene u ekstracelularnu polimernu supstancu (matriks) koju same proizvode (8). Smatra se da u približno 65% slučajeva humanih bakterijskih infekcija nastaju ovakve zajednice bakterijskih ćelija, pri čemu je produkcija biofilma posebno značajna za nastanak infekcija posredovanih stranim telima (8). Bakterije roda *Staphylococcus* su tipičan primer izazivača ovakvih infekcija usled njihove sposobnosti produkcije biofilma. Bakterije koje rastu u vidu biofilma pokazuju različite fenotipske osobine u odnosu na bakterije iste vrste koji rastu planktonski, a od ključnog značaja je izrazita rezistencija biofilma na antimikrobnu terapiju. Stoga je ispitivanje novih mogućnosti za antimikrobno delovanje na bakterije u biofilmu danas veoma aktuelno. Rast bakterija u vidu biofilma je značajan i u stomatologiji. Biofilm dentalnog plaka sadrži različite vrste bakterija, pri čemu je najvažnija *Streptococcus mutans*, a ima značajnu ulogu u nastanku dentalnog karijesa i periodontalne bolesti (9). Pored ispitivanja različitih aspekata antimikrobnog delovanja niskotemperaturnih atmosferskih plazmi, neophodno je i definisanje uslova pod kojima plazma ispoljava baktericidni efekat, ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva. *In vitro* eksperimenti na različitim ćelijskim modelima su pokazali da niskotemperaturna atmosferska plazma može imati modulatorne efekte na adheziju i proliferaciju ćelija, kao i da može izazvati nekrozu i apoptozu, u zavisnosti od definisanih parametara plazme odnosno jačine i dužine dejstva (10).

Imajući sve navedeno u vidu, ključni preduslov za mogućnost praktične primene niskotemperaturnih atmosferskih plazmi za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju jeste prepoznavanje izvora ovih plazmi odgovarajućih karakteristika. Sumirano, najvažnije karakteristike su fizička konstrukcija koja omogućava lokalizovano i kontrolisano dejstvo i stvaranje plazme snažnog antimikrobnog delovanja bez oštećenja zdravog tkiva. Modifikovani model plazma igle razvijen u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu zadovoljava konstrukcijski zahtev, a preliminarne ispitivanja delovanja na bakterije i mezenhimalne matične ćelije izolovane iz periferne krvi pokazala su da ima veliki potencijal za *in vivo* antimikrobno delovanje (11).

RADNA HIPOTEZA

Niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom deluje baktericidno na bakterije u suspenziji i biofilm bakterija, u zavisnosti od primenjenih uslova. Pod istim uslovima, ne utiče značajno na adhezivnost i preživljavanje mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periferne krvi i periodoncijuma.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* u suspenzijama različitih koncentracija.
2. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na razvoj biofilma i formirani biofilm bakterija meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans*.
3. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na preživljavanje i sposobnost adherentnosti humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periferne krvi i periodoncijuma.

MATERIJAL I METOD

Plazma igla

Za ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija i humane mezenhimalne matične ćelije koristiće se plazma igla koja je konstruisana u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu. Ovaj model plazma igle sastoji se od centralne elektrode izgrađene od volframa debljine 0.5 mm koja je prekrivena keramičkom cevi i smeštena u staklenoj cevi prečnika 6 mm. Helijum protiče između keramičke i staklene cevi, a plazma se stvara na vrhu elektrode. Centralna elektroda napaja se na 13.56 MHz koristeći signal generator (Agilent N9310A)k, pojačavač (Barthel RFA-0.1/50-100 B00) i kolo za prilagođenje. Pomoću derivativnih strujnih i naponskih sonde, mere se signali struje i napona na osnovu kojih se preračunava snaga plazme. Time se ostvaruje uvid u stanje plazme i prati reproducibilnost tokom svih tretmana. Za merenje temperature tokom tretmana koristi se hromel-alumel termopar postavljen na dno bunara mikrotitarske ploče.

Svi uzorci uključeni u ovo ispitivanje biće izloženi dejstvu plazma igle u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu. Plazma igla postavljena je i fiksirana vertikalno dok će se uzorci postavljati na platformu, tako da rastojanje između vrha igle i tretirane površine uvek bude 3 mm. Za ovaj model plazma igle je ustanovljeno da se pri rastojanju od 3 mm postižu najbolji efekti uz minimalano termičko dejstvo (6). Za ispitivanje dejstva plazma igle na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija i humane mezenhimalne matične

ćelije biće primenjene tri različite snage plazme (1.6 W, 0.9 W, 0.15 W), dva protoka helijuma (0.5 slm[standardnih litara u minuti], 1 slm) i različita vremena izlaganja. Za svako pojedinačno ispitivanje biće korišćene dve kontrole. Prvu će činiti uzorci koji neće biti tretirani, a drugu uzorci koji će biti izloženi samo protoku helijuma, ali ne i plazmi.

Suspenzije bakterija

Suspenzije bakterija biće pripremane u Laboratoriji za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. U radu će biti korišćeni referentni sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Početne koncentracije bakterija će se određivati spektrofotometrijski tako da optička gustina odgovara $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Od ove početne suspenzije biće pravljena razblaženja 1:10, 1:100 i 1:1000. Po 0,2 ml tako pripremljenih suspenzija bakterija biće razliveno u ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora. Nakon izlaganja suspenzija bakterija dejstvu niskotemperaturne atmosferske plazme, po 0,05 ml suspenzije biće uzeto iz svakog bunara i kultivisano na odgovarajuću čvrstu podlogu. Nakon inkubacije od 20 h na 37°C, vijabilnost bakterija biće procenjivana na osnovu broja formiranih kolonija. Sva ispitivanja biće ponovljena dva puta.

Biofilm

Kvantifikacija biofilma će biti izvedena na Odeljenju za bakteriologiju Instituta za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu prema protokolu koju je opisao Stepanović S. sa sar. (12). U radu će biti korišćen referentni soj *Streptococcus mutans* ATCC 25175 i klinički soj MRSA izolovan iz hirurške rane. U pitanju je soj za koji je fenotipskim i genotipskim metodama dokazano da je snažan produktor biofilma. U svakom eksperimentu biće pripremano po dve ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora u koje će biti razliveno po 180 µl odgovarajuće tečne podloge i inokulisano po 20 µl pripremljene suspenzije bakterija, čija će se koncentracija određivati spektrofotometrijski. Opseg koncentracija koji će biti korišćen je 10^4 - 10^6 CFU/ml. Da bi se ispitao efekat na formiranje biofilma, jedna ploča će biti izložena dejstvu plazme odmah nakon inokulacije, a zatim biti inkubirana 24h na 37°C. Druga ploča će nakon inokulacije bakterija biti inkubirana 24h na 37°C, a tek zatim izložena dejstvu plazme da bi se utvrdio efekat na formiran biofilm. Sva ispitivanja biće rađena u triplikatu i ponovljena dva puta.

Humane mezenhimalne matične ćelije iz periferne krvi i periodoncijuma

Po dobijanju dozvole etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, biološki materijal (krv, ekstrahovani umnjaci) će biti prikupljan uz saglasnost dobrovoljaca i pacijenata, obaveštenih o svrsi prikupljanja materijala za eksperimentalni rad. Humane mezenhimalne ćelije biće izolovane od mononuklearnih ćelija periferne krvi (hPB-MSC; human peripheral blood mesenchymal stem cells) na Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu, prema preporučenom protokolu (13). Humane mezenhimalne matične ćelije iz periodoncijuma (PDL-MSC; periodontal ligament mesenchymal stem cells) će, na osnovu pretrage dostupne literature, prvi put biti izolovane kod nas primenom metoda koji su opisali Mrozik i sar. (14). Ekstrakcija zdravih impaktiranih umnjaka, iz ortodontskih razloga ili nefunkcionalnosti, vršiće se na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta. Odmah nakon ekstrakcije pažljivo će se sterilnom kiretom odvojiti zaostali periodoncijum iz bifurkacije zuba, a zatim dobijeni uzorak postaviti u sterilni slani fosfatni pufer. Karakterizacija ćelija biće izvršena prema Kriterijumima Komiteta za

MSC Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (15). Ćelije će biti postavljene u ploče sa više bunara (24 ili 96 bunara) i nakon inkubacije od 48 h biće izložene dejstvu plazme pod istim uslovima kao i bakterije. Vijabilnost i adhezivnost hPB-MSC i PDL-MSC nakon izlaganja plazmom, testiraće se pomoću MTT ogleđa (16), odnosno, adhezionim testom (17).

STATISTIČKA ANALIZA

Na osnovu prikupljenih podataka će se formirati baza podataka u Excel-u. Primenjene statističke metode obuhvatiće metode deskriptivne i analitičke statistike. Sva numerička obeležja posmatranja biće opisana merama centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i merama varijabiliteta (SD, minimalna i maksimalna vrednost), kao i 95% intervalom poverenja. Za opisivanje atributivnih obeležja posmatranja koristiće se apsolutni i relativni (procenat) brojevi. Svi dobijeni rezultati biće prikazani tabelarno i grafički. Od metoda analitičke statistike koristiće se χ^2 test ili Fisherov test (u slučaju tablice kontigencije 2x2 i broja uzoraka manjih od 40) za analizu atributivnih obeležja posmatranja. S obzirom na eksperimentalni dizajn studije koji podrazumeva ponovljena merenja, kod poređenja numeričkih obeležja posmatranja između dve grupe koristiće se t-test za vezane uzorke, u slučaju da su se podaci ponašali po tipu normalne raspodele, ili Wilcoxon-ov test ekvivalentnih parova u slučaju raspodele podataka različite od normalne. U slučaju postojanja više od dve grupe koristiće se Fridman-ov test (neparametarski podaci) i jednofaktorska analiza varijanse sa ponovljenim merenjima (parametarski podaci). Za ispitivanje prediktora razlike u posmatranim ishodima biće korišćeni regresioni modeli. Vrednost $p < 0.05$ smatraće se statistički značajnom.

PROCENA KANDIDATA O NAUČNOM DOPRINOSU

Sprovedeno istraživanje bi ukazalo na optimalne uslove pod kojim niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom ostvaruje baktericidni efekat na bakterije u suspenziji i biofilm bakterija od značaja za medicinu i stomatologiju. U okviru ovog istraživanja će prvi put biti ispitivana interakcija niskotemperaturne atmosferske plazme sa normalnim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi i periodoncijuma, na osnovu čega bi se mogao predvideti uticaj na adhezivnost i preživljavanje ćelija u kulturi. Utvrđivanje optimalnih uslova pod kojim niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom deluje antimikrobno, a bez štetnog delovanja na mezenhimalne matične ćelije, omogućilo bi tehnološki razvoj relativno jednostavnog i efikasnog tretmana za lokalizovane, terapijski dostupne procese u medicini i stomatologiji.

REFERENCE

1. Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R. i sar. *Gas discharge plasmas and their applications. Spectrochimica Acta Part B* 2002;57:609-658.
2. Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ. i sar. *The argon plasma coagulator. Gastrointest Endosc* 2002;55:807-810.

3. Cheruthezhkatt S, Cernak M, Slavicek P. i sar. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *J Appl Biomed* 2010;8:55-66.
4. Shintani H, Sakudo A, Burke P. i sar. Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action (Review). *Exp Ther Med* 2010;1:31-738.
5. Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW. i sar. Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. *Plasma Sources Sci Technol* 2002;11:383-388.
6. Lazović S, Puač N, Malović G. i sar. Diagnostic of plasma needle properties by using mass spectrometry. *Chem Listy* 2008;102:S1383-1387.
7. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64(suppl.1):i29–i36.
8. Cos P, Toté K, Horemans T. i sar. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des.* 2010;16:2279-95.
9. Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. *Can J Microbiol.* 2011;57:1-20.
10. Stoffels E, Kieft I, Sladek R. i sar. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives *Plasma Sources Sci. Technol.* 2006;15:S169.
11. Lazović S, Puač N, Miletić M. i sar. The effects of a plasma needle on bacteria in planctonic samples and on peripheral blood mesenchymal stem cells. *New J Phys* 2010;12:083037.
12. Stepanović S, Vuković D, Hola V. i sar. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assesment of biofilm production by staphilococci. *APMIS* 2007;115:891-899.
13. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S. i sar. Circulating skeletal stem cells *J. Cell Biol.* 2001;153:1133-40.
14. Mrozik K, Gronthos S, Shi S. i sar. A method to isolate, purify and characterize human periodontal ligament stem cells. *Methods Mol Biol.* 2010;666:269-84.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I. i sar. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy* 2006;8:315-317.
16. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.
17. Humphries MJ. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol.* 2009;522:203-10.