

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja P. Mileti

**ISPITIVANJE DEJSTVA  
NISKOTEMPERATURNE  
ATMOSFERSKE PLAZME *IN VITRO* NA  
BAKTERIJE I MEZENHIMALNE MATI NE  
ELIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Maja P. Mileti

**EFFECTS OF NON-THERMAL  
ATMOSPHERIC PLASMA *IN VITRO* ON  
BACTERIA AND MESENCHYMAL STEM  
CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**Mentor:** dr Dragana Vuković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

**Komentor:** dr Diana Bugarski, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu,  
Institut za medicinska istraživanja

**Komisija u sastavu:**

dr Milorad Letić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Ivana Dakić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Pavle Milenković, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet

**Datum odbrane doktorske disertacije:**

---



## ZAHVALNOST

*Doktorska disertacija "Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme in vitro na bakterije i mezenhimalne matične ćelije" ura ena je u okviru interdisciplinarnog projekata III 41011 "Primene niskotemperaturnih plazmi u biomedicini, zaštiti ovekove okoline i nanotehnologijama" pod rukovodstvom dr Nevene Pua u Centru za neravnotežne plazme Instituta za fiziku, Univerziteta u Beogradu, a kroz saradnju sa Institutom za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutom za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu i Laboratorijom za mikrobiologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svoj intelektualni i drugi doprinos u ovom mukotrpnom poslu je nesebično dalo više osoba, kojima bi ovom prilikom htela da izrazim duboku zahvalnost.*

*Mentoru, Prof. dr Dragani Vuković, izražavam veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, na konkretnim, dragocenim savetima vezanim za eksperimentalnu postavku segmenata disertacije koji su se odnosili na ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na bakterije. Hvala na strpljenju i vremenu koje mi je posvetila tokom izrade ove teze, konstruktivnim diskusijama i dobronamernim sugestijama koje su me stimulisale da uvek težim boljem. Svojim nesebičnim zalaganjem je značajno doprinela uobližavanju i finalizaciji ove disertacije.*

*Naučnom savetniku dr Diani Bugarski, mom komentoru, koja me je strpljivo vodila kroz naučno-istraživački rad još od magistarskih studija, zahvaljujem na dugogodišnjoj saradnji, nesebičnoj pomoći koju je pružala, što je uvek bila dostupna i spremna da reši sve moje dileme. Zahvaljujem se na iskrenoj ličnoj i profesionalnoj podršci koju mi je pružala tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Prof. dr Miloradu Letiću i Prof. dr Ivani Đakić, članovima komisije, toplo se zahvaljujem na konkretnim sugestijama i savetima koji su značajno doprineli konačnom oblikovanju ove disertacije.*

*Prof. dr Pavlu Milenkoviću, mom učitelju i dugogodišnjem šefu, zahvaljujem na ukazanom poverenju i pruženoj mogućnosti da budem deo projekta u okviru kojeg je*

*ura ena teza. Tokom godina zajedni kog rada uz profesora sam u ila, ne samo kako da budem dobar predava i nastavnik, ve i predan lan nau nog tima.*

*Zahvaljujem se Višem nau nom saradniku Neveni Pua koja je tokom eksperimentalnog rada postala moja jako draga prijateljica. Hvala joj na prisustvu u svakome eksperimentu, uvek dobrom raspoloženju tokom izvo enja eksperimenata, konstruktivnim razgovorima i stalnom ohrabrivanju.*

*Posebno se zahvaljujem Mr sci med dr Slavku Mojsilovi u, mom laboratorijskom u itelju, na nesebi noj pomo i u našim zajedni kim istraživanjima, na velikom entuzijazmu, pozitivnom razmišljanju i podstreku da istrajem u momentu kada sam dobila prvu negativnu recenziju.*

*Zahvaljujem se Prof. dr Dušanu Pavlici i Ass. dr Mileni Jovanovi na stru noj saradnji pri izradi bakterijskih suspenzija i njihovoj kultivaciji. Dr Emiliji Grego, hvala na pomo i pri spektrofotometriji bakterijskih suspenzija.*

*U statisti koj analizi dobijenih rezultata koji se odnose na ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na suspenzije bakterija i bakterijski biofilm mnogo su mi pomogli Doc. dr Biljana Mili i i Ass. dr Ivan Soldatovi , na emu sam im veoma zahvalna.*

*Zahvaljujem se svojoj majci koja je pored toga što je znala šta je dobro, umela to i da prenese na svoju decu usmeravaju i nas ka pravim vrednostima i ine i da se bez straha upustimo u životne i profesionalne izazove uvek sigurni da u njoj imamo podršku za svaku našu odluku. Svojoj sestri, hvala što je uvek uz mene, da me hrabri i nasmeje.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, suprugu Milanu i k erci Ivi, koja je nepresušan izvor ljubavi i iskrene podrške koja život zna i.*

## Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije

### Rezime

Poslednjih godina se intenzivno istražuje mogućnost primene različitih izvora niskotemperaturne atmosferske plazme za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju u oblasti medicine i stomatologije. U ovom istraživanju kao izvor niskotemperaturne atmosferske plazme korišćena je modifikovana plazma igla razvijena u našoj zemlji i izvršeno je definisanje uslova pod kojima plazma stvorena ovim izvorom ispoljava baktericidni efekat, ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva.

Pokazano je da niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena plazma iglom deluje snažno baktericidno na bakterije u suspenzijama različitih koncentracija, pri čemu je ovaj efekat u direktnoj zavisnosti od snage plazme, vremena izlaganja i početne koncentracije ispitivanih suspenzija bakterija. Utvrđeno je da su na dejstvo plazme bile osetljivije ispitivane Gram-negativne bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* od Gram pozitivnih, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*. Ispitivanjem uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na biofilm bakterija meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans* pokazano je da plazma deluje inhibitorno na rast bakterija u biofilmu, dok ne utiče značajno na već formiran biofilm. Citotoksičnost niskotemperaturne atmosferske plazme ispitivana je na kulturi humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periferne krvi. Utvrđeno je da primenjena pod uslovima pod kojim ispoljava snažno antimikrobno dejstvo, plazma ne utiče značajno na vijabilnost ovih ćelija niti dovodi do njihovog odlepljivanja od podloge. Prema podacima koji su dostupni u literaturi, do sada nije ispitivan uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na parodontalno tkivo. Stoga je u ovom radu po prvi put ispitivan uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na različite ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma. Humane mezenhimalne matične ćelije su uspešno izolovane i uspostavljena je njihova dugotrajna kultivacija. Ove ćelije su pokazale tipične karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija. Za ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma odabrani su eksperimentalni uslovi pod kojima plazma ispoljava snažno antibakterijsko dejstvo na suspenzije

bakterija i biofilm. Utvrđeno je da plazma stvorena modifikovanom plazma iglom smanjuje proliferaciju, migratorni potencijal i u manjoj meri adheziju, ali ne utiče na vijabilnost ovih ćelija. Primenjena pod istim uslovima, plazma indukuje značajno povećanje aktivnosti alkalne fosfataze u ovim ćelijama, ranog markera osteogene diferencijacije. Ovakav rezultat sugeriše na to da plazma tretman podstiče osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periodoncijuma.

**Ključne reči:** niskotemperaturna atmosferska plazma, antimikrobno dejstvo, mezenhimalne matične ćelije, parodontalna terapija

**Naučna oblast:** medicina



## **Effects of non-thermal atmospheric plasma *in vitro* on bacteria and mesenchymal stem cells**

### **Abstract**

In recent years, there has been intensive research about the possibility of the application of low-temperature atmospheric plasma for *in vivo* disinfection and antimicrobial therapy in medicine and stomatology. In this study, as a source of non-thermal atmospheric plasma, a plasma needle device developed in our country was used and an investigation was carried out to define the conditions under which plasma generated by this source manifests bactericidal effect, while simultaneously preserving the healthy tissue.

It was demonstrated that low-temperature atmospheric plasma generated by a plasma needle had a strong bactericidal effect on bacteria in suspensions of various concentrations, this effect being directly dependant on the plasma power, time of exposure and initial concentration of the examined suspensions. It was found that the examined Gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, were more sensitive to plasma influence than the Gram-positive, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. By examining the effect of low-temperature atmospheric plasma on the bacteria biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, it was demonstrated that it had an inhibitory effect on biofilm formation, however without significantly affecting the already formed biofilm. Cytotoxicity of low-temperature atmospheric plasma was examined on the culture of human mesenchymal stem cells from peripheral blood. It was determined that, applied under the conditions under which it manifests strong antimicrobial effects, plasma did not have significant influence on the viability of these cells, nor caused detachment from the substrate. According to available literature data, the possibility of low-temperature atmospheric plasma application in parodontal therapy has not yet been examined. Therefore in this paper, the effect of non-thermal atmospheric plasma on different cell functions of mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament was examined for the first time. Human mesenchymal stem cells were successfully isolated and their long-term cultivation was established. These cells showed typical human mesenchymal stem cell characteristics. To evaluate the influence of non-thermal atmospheric plasma on

different cell functions of human periodontal-ligament derived mesenchymal stem cells, experimental conditions under which plasma expresses strong antibacterial effect on the bacteria suspensions and biofilm were applied. It was found that plasma generated by a modified plasma needle decreased proliferation, migratory potential and, to a minor extent, adhesion. However this treatment did not affect the viability of these cells, i.e. did not show destructive effects. Applied under the same conditions, plasma treatment induced a significant increase in the alkaline phosphatase activity in these cells. Since alkaline phosphatase is known as an early marker for osteoblastic differentiation, this finding suggests that plasma treatment can enhance osteogenic differentiation of the human periodontal ligament mesenchymal stem cells.

**Key words:** non-thermal atmospheric plasma, antimicrobial effects, mesenchymal stem cells, parodontal therapy

**Scientific field:** medicine

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PLAZMA .....	1
1.1.1. Klasifikacija plazmi .....	2
1.1.2. Hemijski procesi u plazmi .....	3
1.2. PRAKTIČNA PRIMENA PLAZMA TEHNOLOGIJE .....	5
1.2.1. Plazma tehnologija u biomedicini .....	6
1.2.2. Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini .....	6
1.2.3. Primena niskotemperaturne atmosferske plazme za <i>in vivo</i> dezinfekciju i antimikrobnu terapiju .....	11
1.2.4. Niskotemperaturne atmosferske plazme i bakterijski biofilm .....	14
1.2.4.1. <i>Mikrobni biofilm</i> .....	14
1.2.4.2. <i>Rezistencija biofilma na antibiotike i druge antimikrobne agense</i> .	16
1.2.4.3. <i>Dentalni plak</i> .....	17
1.3. INTERAKCIJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME SA ŽIVIM EUKARIOTSKIM ČELIJAMA I TKIVIMA .....	20
1.3.1. Matične ćelije .....	21
1.3.2. Mezenhimalne matične ćelije .....	24
1.3.2.1. <i>Karakterizacija mezenhimalnih mati nih elija</i> .....	27
1.3.2.2. <i>Mezenhimalne mati ne elije dentalnog porekla</i> .....	28
1.3.2.3. <i>Mezenhimalne mati ne elije poreklom iz periodoncijuma</i> .....	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA: .....	32
3. MATERIJAL I METOD .....	34
3.1. PLAZMA IGLA .....	34
3.2. USLOVI PLAZMA TRETMANA .....	35
3.3. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE .....	36
3.4. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM BAKTERIJA METICILIN REZISTENTNI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> I <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	37
3.5. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME .....	38
3.5.1. MTT ogled .....	38
3.5.2. Adhezioni test .....	39

3.6. IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I KULTIVACIJA HUMANIH MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA IZ PERIODONCIJUMA . . . . .	39
3.5.1. CFU-F test . . . . .	40
3.5.2. Protočna citometrija . . . . .	41
3.5.3. Indirektna imunofluorescencija . . . . .	42
3.5.4. Višelinijski potencijal za diferencijaciju humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma . . . . .	42
3.6. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA ĆELIJSKE FUNKCIJE MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA IZ PERIODONCIJUMA . . . . .	43
3.6.1. MTT ogled . . . . .	43
3.6.2. Adhezioni test . . . . .	44
3.6.3. Analiza ćelijske migracije „scratch“ testom . . . . .	44
3.6.4. Test proliferacije . . . . .	44
3.6.5. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze . . . . .	45
3.7. STATISTIČKA ANALIZA . . . . .	45
4. REZULTATI . . . . .	46
4.1. ISPITIVANJE DEJSTVA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE . . . . .	46
4.1.1. Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na Gram-negativne bakterije <i>P. aeruginosa</i> i <i>E. coli</i> . . . . .	46
4.1.2. Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na Gram-pozitivne bakterije <i>S. aureus</i> i <i>E. faecalis</i> . . . . .	49
4.2. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM METICILIN REZISTENTNOG <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . . . . .	52
4.2.1. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje biofilma MRSA . . . . .	53
4.2.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formirani biofilm MRSA . . . . .	62
4.3. ISPITIVANJE DEJSTVA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> . . . . .	63
4.4. EFEKTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA HUMANE MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE . . . . .	67
4.4.1. Analiza citotoksičnosti na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi . . . . .	67
4.5. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA HUMANIH MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA IZ PERIODONCIJUMA . . . . .	69

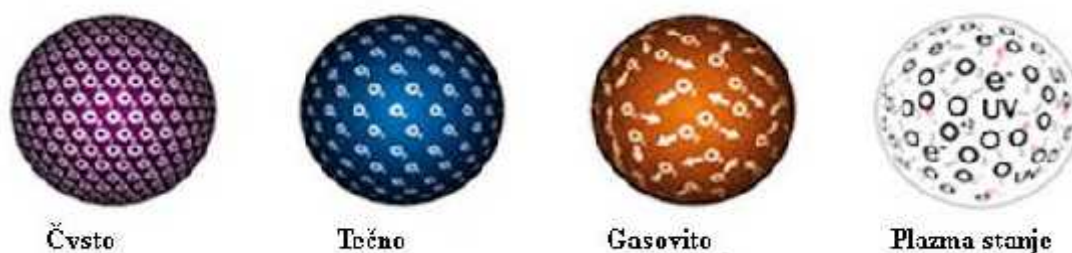
4.6. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA ĆELIJSKE FUNKCIJE HUMANIH MEZENHIMALNIH MATIČNIH IZ PERIODONCIJUMA .....	73
4.6.1. Efekat niskotemperaturne atmosfere plazme na vijabilnost i adheziju hPDL-MSC .....	73
4.6.2. Efekat niskotemperaturne atmosfere plazme na migratorni potencijal hPDL-MSC .....	76
4.6.3. Efekat niskotemperaturne atmosfere plazme na proliferaciju hPDL-MSC .....	77
4.6.4. Efekat niskotemperaturne atmosfere plazme na diferencijaciju u osteogenu liniju hPDL-MSC .....	80
5. DISKUSIJA .....	81
5.1. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE .....	81
5.2. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BIOFILM BAKTERIJA .....	85
5.2.1. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosfere plazme na formiranje i formirani biofilm MRSA .....	85
5.2.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosfere plazme na formiranje i formirani biofilm <i>S. mutans</i> .....	88
5.3. EFEKTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA HUMANE MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE .....	90
5.3.1. Analiza citotoksičnosti niskotemperaturne atmosfere plazme na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi .....	90
5.3.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosfere plazme na ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periodoncijuma .....	91
6. ZAKLJUČAK .....	96
7. LITERATURA .....	97

## 1. UVOD

### 1.1. PLAZMA

Razvoj astrofizike i teoretske fizike u prošlom veku doneo je saznanje da je preko 99% vidljivog univerzuma izgrađeno od plazme, što je čini najrasprostranjenijom materijom u svemiru. Na Zemlji se plazma može stvarati samo pod određenim uslovima, a najpoznatiji plazma fenomeni su munja i aurora borealis na severnoj, odnosno aurora australis na južnoj zemljinoj hemisferi. William Crookes je prvi identifikovao plazmu u Crookes-ovoj cevi 1879. godine, ali je Irving Langmuir 1927. godine po prvi put upotrebio naziv plazma da bi opisao ponašanje elektrona, jona i neutralnih čestica u jonizovanom gasu u cevi za električno pražnjenje (Compton i sar. 1930).

Ukoliko se uzme u obzir energija čestica koje sačinjavaju plazmu, plazma se može smatrati četvrtim agregatnim stanjem, različitim od čvrstog, tečnog i gasovitog. Zagrevanjem čvrstih tela ona prvo prelaze u tečno, a na višim temperaturama u gasovito stanje. Sa povećanjem primenjene energije, elektroni dobijaju dovoljnu količinu energije da se odvoje od atoma ili molekula gasa. Na taj način gas prelazi u fazu delimično ili potpuno jonizovanog gasa, koju nazivamo plazma stanje (**Slika 1**).



**Slika 1.** Agregatna stanja

(<http://www.biozone-europe.eu/v2/en/technologies/cold-plasma>)

Osnovni uslov da bi gas predstavljao plazmu je da postoji značajan broj slobodnih (nevezanih) elektrona i naelektrisanih jona, osim neutralnih atoma i molekula koji su normalno prisutni u gasu, što takav medijum čini izrazito elektroprovodljivim. Druga važna pretpostavka je da su plazme kvazi neutralne, odnosno da je koncentracija pozitivno naelektrisanih čestica (pozitivnih jona) i negativno naelektrisanih čestica (elektrona i negativno naelektrisanih jona) dobro izbalansirana. Za razliku od gasa u

kome postoje samo izolovani sudari dve različite čestice, međusobno dejstvo čestica u plazmi karakteriše kolektivni efekat koji podrazumeva da svaka naelektrisana čestica istovremeno utiče na veliki broj drugih čestica, a ne samo na najbližu.

### 1.1.1. Klasifikacija plazmi

Plazme u laboratorijskim uslovima mogu nastati na različite načine: termalnim delovanjem, hemijskim reakcijama visoke specifične energije ili hemojonizacijom, laserskom jonizacijom, nuklearnim reakcijama, bombardovanjem kvantima elektromagnetog zračenja ili česticama i drugo. Ipak, najčešće korišćen način za generisanje plazmi je električno pobuđivanje. Kako se ovako nastale plazme mogu stvarati u širokom opsegu pritisaka, uobičajeno se klasifikuju prema temperaturi i koncentraciji elektrona. Većina plazmi koje su značajne za praktičnu primenu imaju temperaturu elektrona od 1-20 eV ( $1 \text{ eV} \approx 11600 \text{ K}$ ) i koncentraciju u opsegu od  $10^6$ - $10^{18} \text{ cm}^{-3}$ . Stepem jonizacije može varirati od ekstremno visokog, što je slučaj u sistemima za postizanje termonuklearnih reakcija, do veoma niskog koji je od značaja za primenu na termalno neotpornim materijalima. Kao i u svakom gasu, temperatura plazme određena je srednjom energijom različitih čestica plazme i njihovim odgovarajućim stepenima slobode kao što su translacioni, rotacioni, vibracioni i stepen slobode vezan za elektronske ekscitacije. U električnim pražnjenjima elektroni, zbog male mase i velike mobilnosti, prvi prihvataju energiju od električnog polja. Primljenu energiju prenose na ostale čestice plazme i tako ostvaruju jonizaciju, pobuđivanje i disocijaciju ostalih komponenti plazme. Razlika u temperaturi između elektrona i teških čestica slabo jonizovanih plazmi proporcionalna je kvadratu odnosa jačine električnog polja ( $E$ ) i pritiska ( $p$ ). Na niskim pritiscima, temperatura elektrona ( $T_e$ ) je obično znatno viša od temperature teških čestica: jona ( $T_i$ ) i neutrala (molekuli, atomi, slobodni radikali) ( $T_n$ ). Povećavanjem pritiska broj sudara elektrona i teških čestica raste, pri čemu se kinetička energija elektrona predaje teškim česticama. Temperatura elektrona opada, dok temperatura teških čestica raste sve dok se ne uspostavi lokalna termodinamična ravnoteža između čestica plazme, odnosno izjednačavanje temperatura ( $T_e \approx T_i \approx T_n$ ). Pri takvim uslovima, temperatura gasa je veoma visoka, odnosno reda

veliĉine nekoliko hiljada K i ovakve plazme nazivamo ravnotežnim ili visokotemperaturnim (Bogaerts i sar. 2002).

Regulisanjem elektriĉnog polja, pritiska, protoka gasa i drugih parametara pražnjenja, kao i pri relativno malom stepenu jonizacije, moguće je ostvariti uslove pri kojima će se razdvojiti kinetika elektrona od kinetike teških ĉestica. Pri takvim uslovima elektroni mogu da postignu velike brzine i energije, dok joni predaju svoj impuls u brojnim sudarima. Na taj naĉin se temperatura elektrona može povećavati, dok istovremeno teške ĉestice i osnovni gas ostaju na sobnoj temperaturi. Tada govorimo o neravnotežnoj ili niskotemperaturnoj plazmi. Za razliku od ravnotežnih plazmi, kod neravnotežnih plazmi hemijski procesi i procesi jonizacije direktno su određeni temperaturom elektrona i ne zavise mnogo od termalnih procesa i temperature samog gasa (Radetić i sar. 2004). Danas se niskotemperaturne plazme mogu stvarati na razliĉitim pritiscima a gasno pražnjenje se najĉešće indukuje elektriĉnim poljem. Pražnjenja se mogu pobuđivati kapacitivno i induktivno povezanim radiofrekventnim (RF) poljem, elektromagnetnom indukcijom, pomoću mikrotalasa ili se postižu pražnjenjem u koroni i pomoću dielektriĉne barijere (DBD, dielectric barrier discharge) (Conrads i sar. 2000).

### **1.1.2. Hemijski procesi u plazmi**

Plazma je multikomponentni sistem sastavljen od elektrona, pozitivnih i negativnih jona, fotona, slobodnih radikala, pobuđenih i nepobuđenih atoma i molekula. Zahvaljujući velikom broju ĉestica, u ovakvom sistemu može se oĉekivati ogroman broj reakcija koje se odvijaju kroz elastiĉne i neelastiĉne sudare ĉestica, što plazmu ĉini izrazito hemijski aktivnom.

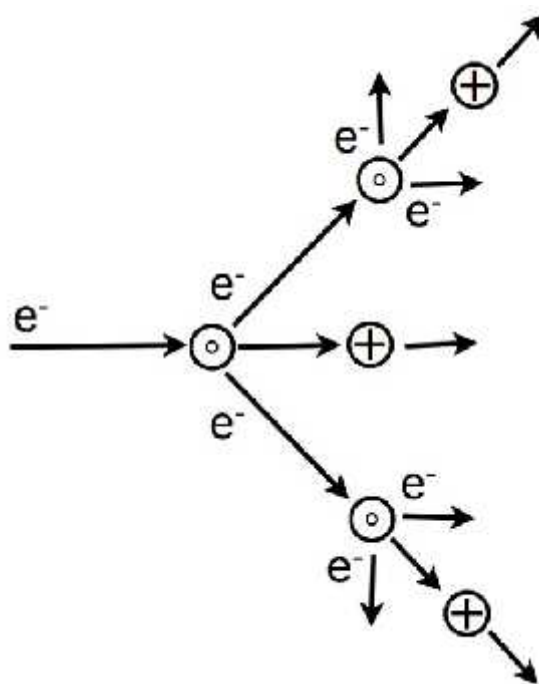
Kako plazma predstavlja jonizovani gas, ključni proces koji se odvija u njoj je jonizacija, odnosno konverzija neutralnih atoma ili molekula u elektrone i pozitivne jone. Mehanizam jonizacije može biti razliĉit i zavisi od plazma-hemijskih sistema, ali se razlikuje pet osnovnih:

1. Direktna jonizacija elektronskim sudarom je elektronska jonizacija neutralna odnosno prethodno nepobuđenih atoma, radikala ili molekula. Energija elektrona u tom sluĉaju mora biti dovoljno velika da do jonizacije dođe u jednom koraku. Ovaj proces najĉešće



se odvija u netermalnim plazmama u kojima postoje velika električna polja sa malim udelom pobuđenih neutrala.

2. Stepnasta jonizacija elektronskim sudarom je elektronska jonizacija već prethodno pobuđenih neutrala (**Slika 2**). Energija elektrona u ovom procesu može biti i niža od jonizacione energije pojedinog atoma ili molekula. Ovaj proces je čest u termalnim plazmama u kojima su stepen jonizacije i koncentracija pobuđenih neutrala visoki.



**Slika 2.** Stepnasta jonizacija

3. Jonizacija sudarima s teškim česticama je proces koji se dešava prilikom sudara jon-molekul ili jon-atom, kao i prilikom sudara neutrala sa elektronski i vibracijski pobuđenim neutralima, pod uslovom da je ukupna energija sudara veća od jonizacione energije neutrala. U ovom slučaju može doći i do asocijativne jonizacije, pri kojoj dolazi do sudara dva pobuđena atoma koji se spajaju u jonizovan molekul i slobodan elektron.

4. Fotojonizacija je proces tokom koga dolazi do sudara neutrala sa fotonom pri čemu nastaje elektron-jon par. Ovi procesi su česti u termalnim plazmama.

5. Površinska jonizacija je proces prilikom koga dolazi do otpuštanja elektrona sa površina čvrstih tela zbog elektronskih, jonskih i fotonskih sudara ili grejanja same površine.

Drugi važan proces koji se odvija u plazmi u kojoj se nalaze molekuli ili atomi koji imaju veliki elektronski afinitet ( $O_2$ ,  $Cl_2$ ,  $Cl$ ,  $O$ ,  $F$ ) je disocijativno vezivanje. U ovom procesu, slobodni elektron vrši disocijaciju molekula, pri čemu nastaje negativni jon i slobodni atom. U plazmama koje nastaju na visokim pritiscima i niskotemperaturnim plazmama dolazi i do trećeg procesa kojim se stvaraju naelektrisane čestice. U ovom procesu se na jedan negativan jon može vezati jedan ili više neutralnih atoma ili molekula, pri čemu nastaje kompleksni jon. Pored pomenutih procesa, u plazmi se odvijaju i mnogi drugi kao što su, na primer, elektron-jon i jon-jon rekombinacije, pobuđivanje i disocijacija neutralnih čestica elektronima i otpuštanje elektrona i nastanak negativnih jona.

Ponašanje pobuđenih atoma i molekula je takođe veoma važno za hemijske procese u plazmi. Pobuđivanje može biti elektronsko, vibraciono i rotaciono. Visoke temperature elektrona, a samim tim i energije, u plazmi dovode do visoke učestalosti elektronskog pobuđivanja atoma i molekula. Energija velikog broja tako pobuđenih atoma i molekula je 5-10 eV. Prelazak pobuđenih atoma i molekula sa višeg u niže ili osnovno energetske stanje može se ostvariti emisijom fotona. U tom slučaju, pobuđena stanja atoma i molekula imaju uglavnom kratak životni vek, zbog čega njihov uticaj na kinetiku i hemijske reakcije u plazmi nije veliki. Međutim, u određenim situacijama nije moguće oslobađanje viška energije zračenjem fotona, tako da se životni vek pobuđenog stanja značajno produžava. Ova stanja nazivaju se metastabilna pobuđena stanja, a svoju energiju smanjuju preko različitih sudarnih procesa čime direktno utiču na većinu procesa u plazmi.

## 1.2. PRAKTI NA PRIMENA PLAZMA TEHNOLOGIJE

Jedinstvene karakteristike plazma hemije i naučno razumevanje plazma fenomena predstavljale su dobar osnov za razvoj plazma tehnologije, koja je našla primenu u različitim oblastima, prvenstveno industrije. Proizvodnja poluprovodničkih uređaja, integrisanih kola, optičkih uređaja i solarnih ćelija, obrada i modifikacija površine različitih materijala i tekstilnih proizvoda, samo su neki od primera primene plazma tehnologije (Bogaerts i sar. 2002).

Novo aktuelno polje izučavanja, pred kojim su postavljeni veliki zahtevi i očekivanja, je primena savremene plazma tehnologije u oblastima biotehnologije i biomedicine.

### **1.2.1. Plazma tehnologija u biomedicini**

Prva istraživanja primene plazma tehnologije u oblasti biomedicine bila su usmerena na termičke efekte ravnotežnih plazmi. Danas su već komercijalno dostupni različiti sistemi zasnovani na ovom principu, koji se primarno koriste za koagulaciju i uklanjanje tkiva. U pitanju su argon plazma koagulator (Ginsberg i sar. 2002; Watson i sar. 2000), Helica sistem (Helium Thermal Ablation System) (Hill i sar. 2006) i pulsirajuća azotna plazma (Bogle, 2006). Ipak, za biomedicinsku primenu plazma tehnologije posebno su interesantne neravnotežne odnosno niskotemperaturne plazme zbog svojih osobina.

### **1.2.2. Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini**

Kod niskotemperaturnih plazmi temperatura jona i molekula gasa bliska je sobnoj, dok elektroni poseduju visoke energije. Zbog toga su ove plazme izrazito reaktivne, a ne izazivaju termička oštećenja. One deluju samo površinski i dubina dejstva može se precizno kontrolisati. Ključni faktor za selektivnost delovanja ovih plazmi je izbor hemijske kinetike. U zavisnosti od željenog efekta, promenom sastava plazme može se menjati odnosno optimizovati hemijska kinetika i uticati na aktivne čestice, srednju energiju elektrona i fluks naelektrisanih čestica. Ovakve karakteristike niskotemperaturnih plazmi otvorile su širok spektar potencijalnih primena, prvenstveno kada je reč o tretmanu termalno neotpornih materijala i različitih bioloških sistema (Laroussi, 2009; Moreau i sar. 2008).

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da se delovanjem niskotemperaturne plazme mogu selektivno poboljšati osobine različitih površina i biokompatibilnost, što je našlo primenu u modifikaciji površina biomaterijala (Cheruthezhkatt i sar. 2010).

Biomaterijali podrazumevaju materijale koji se danas uobičajeno upotrebljavaju za izradu protetskih sredstava koja se koriste u dentalnoj, ortopedskoj, kardiovaskularnoj, oftalmološkoj i rekonstruktivnoj hirurgiji. Obuhvataju široku klasu materijala kao što su metali, polimeri, keramika, staklo ili kompoziti (Chu i sar. 2002). Razvijeni su brojni plazma procesi da bi se postigle odgovarajuće promene površina biomaterijala, kao što su: funkcionalizacija površina, formiranje tankih filmova plazma polimerizacijom, inkluzija jona metala u površine implementacijom jona plazmom i drugi. Ovim plazma

procesima poboljšava se biokompatibilnost, postiže aktivacija ili funkcionalizacija površina i dobijaju jedinstvene osobine površina koje nije moguće postići drugim metodama, pri čemu se ne utiče na osnovna svojstva materijala (Cheruthazhekatt i sar. 2010). Osim toga, plazmom se mogu modifikovati materijali koji imaju veliku hemijsku inertnost, termičku stabilnost i mali površinski napon.

Druga važna oblast primene zasnovana je na snažnom antimikrobnom dejstvu plazme. Više studija dokazalo je da niskotemperaturne plazme vrše inaktivaciju širokog spektra mikroorganizama uključujući spore bakterija, mikobakterije, različite Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije, gljivice i viruse (Griffiths, 1993; Montie i sar. 2000; Gaunt i sar. 2006). Prema dosadašnjim saznanjima, antimikrobno dejstvo niskotemperaturnih plazmi proizilazi iz sinergističkog delovanja različitih biohemijski aktivnih sastojaka plazme na ćelijske komponente i metaboličke procese u mikroorganizmima. Kao najznačajniji u ovom procesu izdvajaju se reaktivne kiseonične vrste (ROS, reactive oxygen species), reaktivne azotne vrste (RNS, reactive nitric species), naelektrisane čestice, električno polje i ultraljubičasto (UV, ultraviolet) zračenje (Laroussi, 2005). Poslednje decenije intenzivno se proučava mogućnost primene niskotemperaturnih plazmi u oblasti sterilizacije (Moisan i sar. 2002). Potreba za pronalaženjem alternativnih tehnologija za sterilizaciju nastala je zbog ograničenja standardnih metoda u sterilizaciji termalno neotpornih materijala, od kojih su napravljeni brojni medicinski instrumenti, uređaji i protetska sredstva koja su u širokoj upotrebi. Sterilizacija ovakvih materijala postiže se uglavnom korišćenjem hemijskih jedinjenja, kao što su etilen oksid (EtO), tečni formaldehid, glutaraldehid, kao i gama zračenjem. Za sterilizaciju plastičnih materijala, optičkih instrumenata, veštačkih srčanih valvula i katetera danas se najčešće koristi EtO. Međutim, ovo jedinjenje je izrazito toksično zbog čega je neophodno duže radno vreme da bi se uklonili rezidualni agensi sa površine materijala, o čijoj kancerogenosti postoje brojna pitanja (Steelman, 1992). Potencijalnu, ali ne i optimalnu alternativu EtO sterilizaciji, predstavlja primena elektromagnetnog zračenja vrlo visoke energije kojim se ozračena sredstva ili materijali izlažu jonizaciji. Iako je sterilizacija gama zračenjem vrlo efikasna i brza, ona je neekonomična i neophodna je i izolacija radnog prostora. Pored toga, izlaganjem materijala ovom zračenju mogu nastati promene

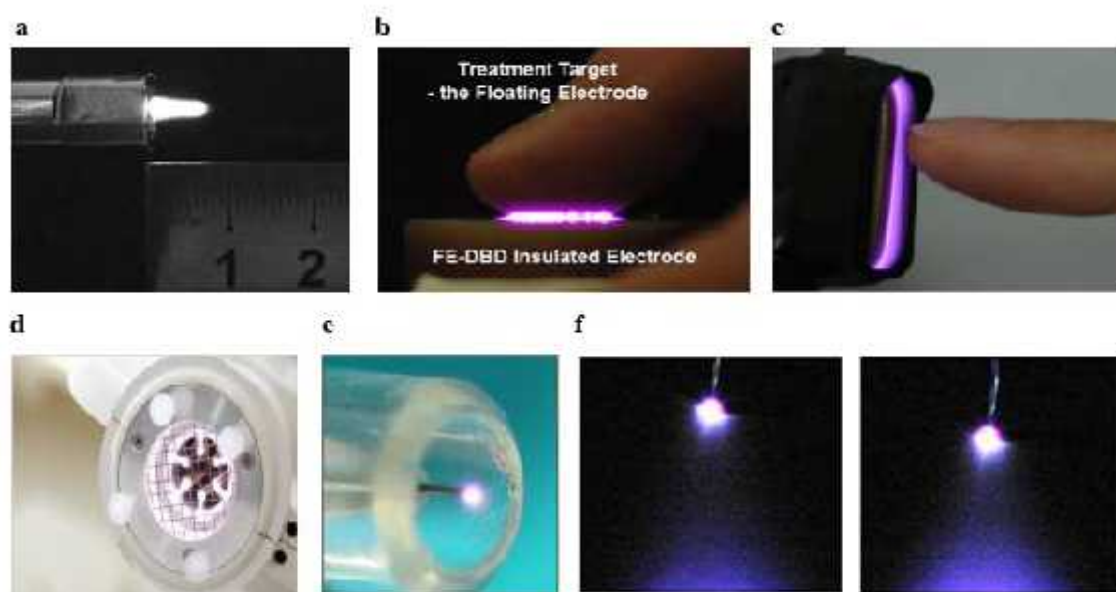
površine materijala, posebno polimernih materijala kod kojih ozračivanjem dolazi do umrežavanja ili kidanja lanaca makromolekula (Henn i sar. 1996).

Sterilizacija niskotemperaturnom plazmom predstavlja veoma atraktivnu alternativu standardnim metodama sterilizacije. Pored toga što predstavlja siguran i brz metod, njome se veoma lako mogu sterilisati i objekti složenih struktura. Stvaranjem plazme na temperaturi bliskoj sobnoj i korišćenjem netoksičnih gasova izbegavaju se termička i hemijska oštećenja izloženih materijala (Shintani i sar. 2010). Dokaz superiornog antimikrobnog dejstva plazme je njen efekat na prione, proteinske infektivne čestice, koje izazivaju različite oblike spongiformnih encefalopatija. Prioni se smatraju najotpornijim infektivnim agensima na standardne fizičke i hemijske metode sterilizacije (Dinakaran i sar. 2002; Smith i sar. 2002). Pokazano je da plazma tretman efikasno vrši inaktivaciju priona na površinama metalnih hirurških instrumenata (Baxter i sar. 2005).

Pored nedvosmisleno dokazane efikasnosti primene niskotemperaturnih plazmi u *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 (NAP) koje odgovaraju *in vivo* primeni u biomedicini.

Razlikuju se tri osnovna tipa NAP pogodnih za *in vivo* primenu u biomedicini: direktne, indirektne i hibridne (Friedman i sar. 2008). U slučaju direktnih plazmi, tretirani uzorak, na primer koža ili neko drugo tkivo, predstavlja jednu od elektroda kroz koju protiče struja. Za ovaj tip plazme najčešće se koriste izvori u kojima se plazma dobija pražnjenjem pomoću dielektrične barijere (DBD) (Fridman i sar. 2008). Indirektne plazme nastaju između dve elektrode, a zatim produkti plazme bivaju izduvani na površinu tretiranog uzorka protokom radnog gasa (Shimizu i sar. 2008; Cao i sar. 2009). Prema tome, kod indirektnih plazmi struja ne prolazi kroz tretirani uzorak. Hibridne

plazme predstavljaju kombinaciju prethodne dve i dobijaju se barijernim pražnjenjem u koroni (Morfill i sar. 2009). (Slika 3).

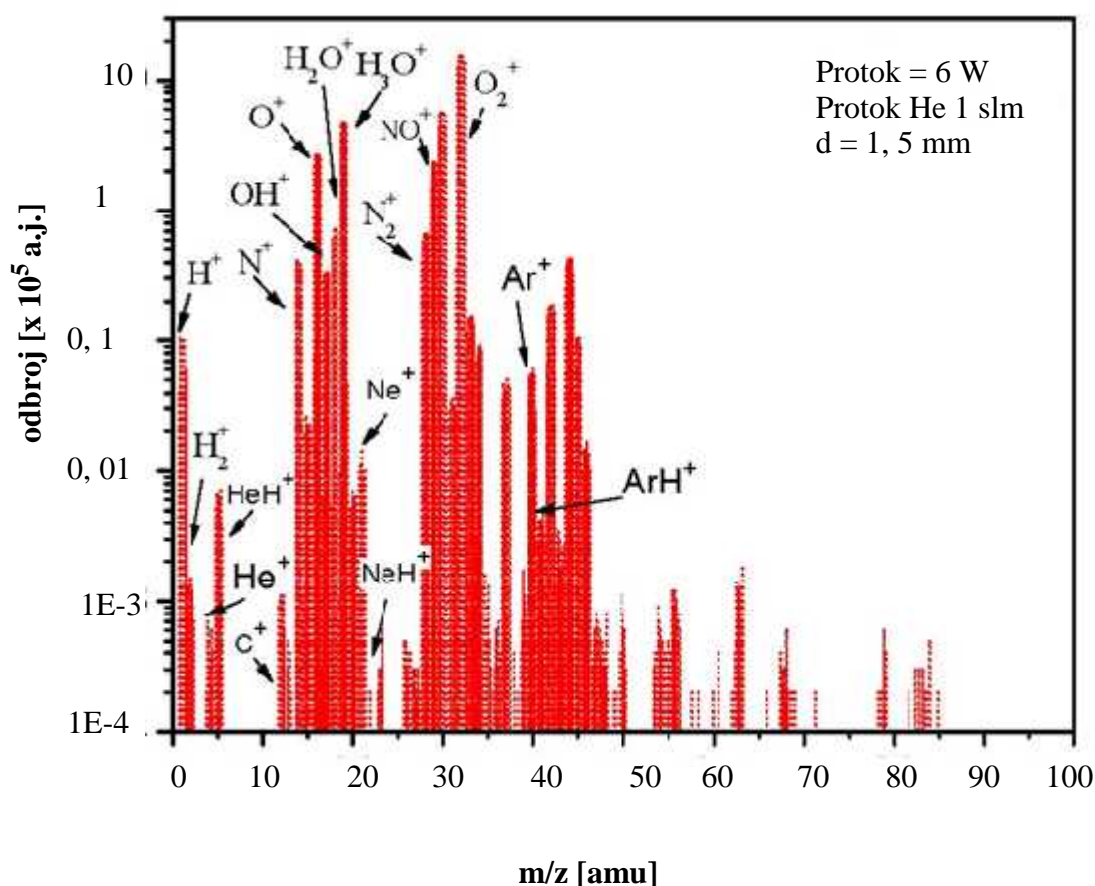


**Slika 3.** Izvori niskotemperaturne atmosferske plazme za *in vivo* primenu u biomedicini: a) Choi J, Mohamed AAH, Kang SK, Woo KC, Kim KT, Lee JK. 900-MHz nonthermal atmospheric pressure plasma jet for biomedical applications. *Plasma Process Polym* 2010; 7: 258-263 b) Fridman G, Peddonghaus M, Balasubramian M, Gutsol A, Brooks A, Friedman G. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process* 2006; 26: 425-442 c) Kim GC, Kim GJ, Park SR, Jeon SM, Seo HJ, Iza F, Lee JK. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. *J Phys D: Appl Phys* 2009; 42: 032005 d) Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, Shimizu T, Karrer S. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010; 8: 968-76 e) Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for *in vivo* medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sources Sci Technol* 2006; 15: S169-180 f) Antao D, Staack D, Fridman A, Farouk B. Atmospheric pressure dc corona discharges: operating regimes and potential applications. *Plasma Sources Sci Technol* 2009; 18: 035016.

Zapremina i površina proizvedene plazme zavise od konstrukcije elektrode u izvoru. Površina plazme može varirati od mikrometarskih dimenzija, što je pogodno za lokalizovanu primenu, pa do više desetina  $\text{cm}^2$ , što je odgovarajuće za tretman većih površina.

Stoffels i saradnici su 2002. godine razvili izvor NAP koji su nazvali plazma igla (Stoffels i sar. 2002). Ovaj izvor bio je osnov za konstrukciju modifikovane plazma igle

u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za fiziku u Beogradu. U ovom izvoru, pražnjenje se pobuđuje kapacitivno povezanim radiofrekventnim (RF) poljem, pri čemu se koristi smeša inertnog gasa helijuma sa vazduhom. Pre nego što se pristupi ispitivanjima moguće primene NAP *in vivo*, neophodno je izvršiti detaljno definisanje različitih radnih parametara. Radne parametre pod kojim se primenjuju NAP nije moguće standardizovati, već se određuju za svaki pojedinačni izvor. U skladu sa takvim zahtevom, na Institutu za fiziku u Beogradu izvršena je karakterizacija modifikovane plazma igle. Derivativnim probama, ICDD (Intensified Charge-Coupled Device) kamerom i masenim spektrometrijskim merenjima dobijeni su važni podaci vezani za snagu koja se predaje plazmi, vrstu aktivnih čestica prisutnih u plazmi (**Slika 4**), kao i njihovu zavisnost od snage plazme, protoka gasa, udaljenosti od tretiranog uzorka i dužine izlaganja (Malović i sar. 2010; Lazović i sar. 2008; Puač i sar. 2006).



**Slika 4.** Spektar jona iz plazme

(Malović G, Puač N, Lazović S i sar. Mass analysis of an atmospheric pressure plasma needle discharges. Plasma Sources Sci Technol 2010; 19: 034014).

### 1.2.3. Primena niskotemperaturne atmosferske plazme za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju

Značajan porast rezistencije mikroorganizama, pre svega bakterija, na postojeće antimikrobne agense zahteva pronalaženje drugačijih pristupa rešenju ovog problema (Livermore, 2009). Već navedene osobine NAP, i.e. korišćenje netoksičnih gasova, stvaranje plazme na sobnoj temperaturi kao i dokazi o izrazitom antimikrobnom delovanju (Rossi i sar. 2009; Lee i sar. 2006; Hong i sar. 2009; Yu i sar. 2006; Becker i sar. 2005) predstavljaju dobru osnovu za primenu NAP u *in vivo* dezinfekciji i antimikrobnoj terapiji. Međutim, uprkos intenzivnom istraživanju u ovoj oblasti, mehanizam kojim NAP deluju na mikroorganizme još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da najvažniju ulogu u procesu inaktivacije mikroorganizama u NAP imaju prvenstveno reaktivne i naelektrisane čestice. Priroda reaktivnih čestica i njihova koncentracija zavisi od vrste gasne smeše koja se koristi kao i uslova primene. Kod većine NAP je intenzitet UV zračenja mali zbog čega je i njegova uloga u ovom procesu zanemarljiva. Kao mogući procesi koji dovode do inaktivacije bakterija pominju se povećanje permeabilnosti ćelijskog zida elektromehaničkim i hemijskim putem, prodiranje ROS i RNS i pokretanje hemijskih reakcija unutar ćelija. Nesumnjivo je da zbog raznovrsnosti baktericidnih agenasa u plazmi i mehanizama kojim oni deluju postoji mala verovatnoća da će se razviti rezistencija bakterija. Zimmerman sa saradnicima (2012) je opsežnim istraživanjem pokazao da nema razvoja rezistencije kod bakterija meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* i *Enterococcus mundtii* na plazma tretman.

Rastuća prevalencija infekcija izazvanih multirezistentnim bakterijama predstavlja globalni medicinski problem od veoma velikog značaja. suočavamo se sa ozbiljnom pretnjom masovne pojave bakterijskih infekcija za koje nemamo adekvatno terapijsko rešenje. Infekcije izazvane rezistentnim, multirezistentnim, pa i pan-rezistentnim bakterijama javljaju se pre svega u bolničkom okruženju, ali njihova učestalost raste i u opštoj populaciji (Gould, 2008). Pojava i širenje rezistencije na antibiotike i hemioterapeutike uočava se kod većine medicinski značajnih bakterija. Ipak, problem rezistencije posebno je značajan kod Gram-pozitivnih bakterija rodova *Staphylococcus* i *Enterococcus*, kao i kod Gram-negativnih bakterija familije Enterobacteriaceae



(*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., i druge) i grupe nefermentujućih bacila (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. i druge) (Boucher i sar. 2009). Upravo iz tog razloga bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli* predstavljaju dobar model za ispitivanje alternativnih pristupa u antimikrobnoj terapiji.

*S. aureus* je Gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, asporogena bakterija koja je deo normalne mikrobne flore sluznice nosa kod 25-30% zdravih odraslih osoba (Weidenmaier i sar. 2012). Smatra se uslovno patogenom bakterijom, ali od veoma velikog medicinskog značaja. Tipično izaziva lokalne infekcije kože i mekih tkiva, postoperativne infekcije hirurških rana i infekcije opekotina. Pored toga, izaziva i brojne duboke invazivne i sistemske infekcije. *S. aureus* veoma brzo razvija različite mehanizme rezistencije na antibiotike. Tako su, na primer, u vreme uvođenja penicilina u terapiju svi sojevi *S. aureus* bili osetljivi na ovaj antibiotik, a danas je 95% sojeva rezistentno usled produkcije beta laktamaza. U cilju prevazilaženja problema ovog oblika rezistencije na peniciline, razvijeni su penicilini otporni na dejstvo beta laktamaza, kao što je meticilin. Međutim, ubrzo nakon uvođenja ovih antibiotika u terapiju, pojavljuju se *S. aureus* sojevi sa novim mehanizmom rezistencije zasnovanim na promenjenom penicilin vezujućem proteinu odnosno na sprečavanju vezivanja meticilina za ciljno mesto delovanja. Ovi sojevi, označeni kao meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), rezistentni su na sve beta laktamske antibiotike i danas predstavljaju veoma veliki problem. MRSA je jedan od vodećih nozokomijalnih patogena, ali se sve češće javlja i kao uzročnik infekcija u opštoj populaciji (Boucher i sar. 2008).

Enterokoke su Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne asporogene bakterije. Najčešće se izoluje vrsta *E. faecalis* koja čini 80-90% klinički značajnih izolata enterokoka. Druga po učestalosti izolovanja je *E. faecium*, sa 10-15% klinički značajnih izolata enterokoka. Predstavnici roda *Enterococcus* čine deo normalne mikrobne flore intestinalnog trakta. Tokom poslednjih decenija konstatuje se porast medicinskog značaja enterokoka, a posebno kao izazivača nozokomijalnih infekcija (Chou i sar. 2008). Enterokoke izazivaju urinarne infekcije, postoperativne infekcije hirurških rana, apscese mekih tkiva, endokarditis i druge infekcije (Munita i sar. 2012). Bakterije ovog roda poseduju urođenu rezistenciju na veliki broj antibiotika, a pored toga su veoma efikasne u razvoju

mehanizama stečene rezistencije. Od posebnog značaja je pojava sojeva vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE). Rezistenciju na vankomicin ispoljava čak 76% izolata *E. faecium* i 6,5% izolata *Enterococcus faecalis* (Calfee, 2012).

*P. aeruginosa* je Gram-negativan, aeroban, asporogen bacil koji pripada grupi Gram-negativnih nefermentujućih bacila. U pitanju je bakterija široko rasprostranjena u prirodi, izrazito prilagodljiva i otporna na dejstvo različitih faktora u okruženju. Predisponirajući faktori za nastanak infekcija izazvanih bakterijom *P. aeruginosa* su imunodeficijencija, narušen integritet mehaničkih barijera (koža, sluznica) i dugotrajno lečenje antibioticima i imunosupresivnim lekovima (Breidenstein i sar. 2011). Imajući u vidu navedene faktore rizika, jasno je da je *P. aeruginosa* danas pre svega značajan kao uzročnik bolničkih infekcija (Kerr i sar. 2009). Ova bakterija, a posebno bolnički izolati, pokazuje izrazitu rezistenciju na antibiotike, dezinficijense i antiseptike (Fothergill i sar. 2012; Moore i sar. 2011). Tokom poslednjih godina se širom sveta uočava porast izolovanja multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa* koji pokazuju rezistenciju na karbapeneme, anti-pseudomonas peniciline, cefalosporine novijih generacija i aminoglikozide (Livermore D, 2012; Livermore, 2009).

*E. coli* je vrsta koja pripada porodici Enterobacteriaceae i široko je rasprostranjena u prirodi. U pitanju je Gram-negativan, fakultativno anaeroban, asporogen bacil koji je uvek prisutan u fiziološkoj mikroflori crevnog trakta ljudi. *E. coli* je među vodećim uzročnicima infekcija, kako u opštoj populaciji, tako i kod hospitalizovanih pacijenata. Izaziva infekcije urinarnog trakta, kao što su cistitis i pijelonefritis, sepsu, gastrointestinalne infekcije, neonatalni meningitis, infekcije postoperativnih rana i brojne druge infekcije. S obzirom na veliki medicinski značaj *E. coli*, kao i ostalih enteričnih bakterija, njihova rastuća rezistencija na antibiotike i hemioterapeutike danas predstavlja veoma važan i aktuelan problem. Uočava se porast učestalosti izolovanja rezistentnih sojeva *E. coli*, posebno sojeva koji produkuju  $\beta$  laktamaze proširenog spektra odnosno sojeva koji su rezistentni na sve beta laktamske antibiotike izuzev karbapenema (Pitout i sar. 2008). Situacija sa rezistencijom *E. coli* i drugih enteričnih bakterija dodatno je pogoršana pojavom sojeva rezistentnih i na karbapeneme, koji danas

predstavljaju poslednju liniju odbrane protiv ozbiljnih bolničkih infekcija (Nordmann i sar. 2012).

#### **1.2.4. Niskotemperaturne atmosferske plazme i bakterijski biofilm**

NAP bi mogle da predstavljaju moguće rešenje i za terapiju infekcija izazvanih bakterijama koje rastu u vidu biofilma. Smatra se da u približno 65% (Cos i sar. 2010), pa čak i u 80% (Dongari-Bagtzoglou, 2008) slučajeva humanih infekcija bakterije rastu u vidu biofilma. Produkcija biofilma povezuje se s brojnim hroničnim infekcijama, kao što su infekcije rana, osteomijelitis, endokarditis, infekcije pluća kod pacijenata sa cističnom fibrozom i dr. (Hoiby i sar. 2011). Bakterijski biofilm se povezuje i sa hroničnim inflamatornim bolestima, kao što je Kronova bolest (Claret i sar. 2007). Učestalost infekcija praćenih stvaranjem biofilma je posebno velika u bolničkim uslovima, i to su tipično infekcije posredovane stranim telima (Francolini i sar. 2010).

##### *1.2.4.1. Mikrobni biofilm*

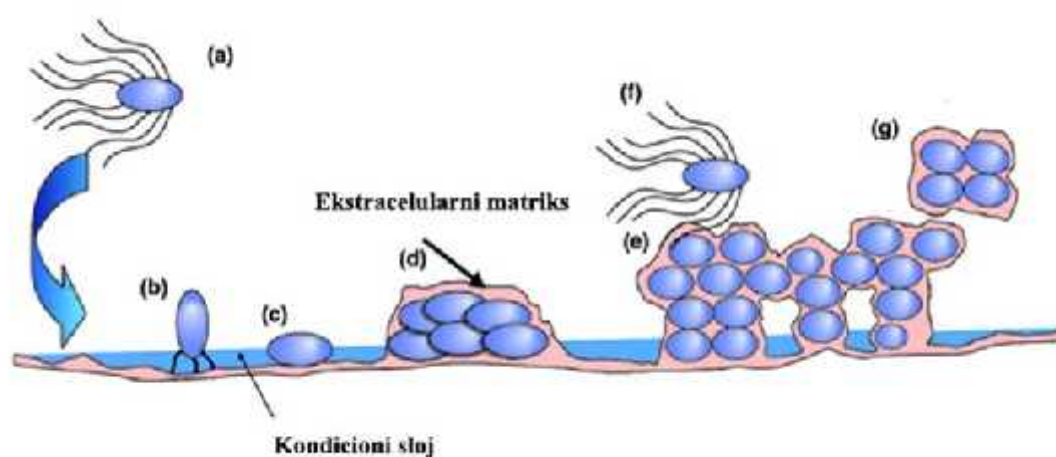
U svim prirodnim ekosistemima bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za žive i nežive površine i formiranje struktura koje nazivamo biofilmom. Biofilm je zajednica bakterijskih ćelija koje su ireverzibilno adherisane za površinu i uronjene u ekstracelularnu polimernu supstancu (EPS) pod nazivom matriks ili glikokaliks koju same proizvode (Cos i sar. 2010).

Formiranje biofilma predstavlja složen proces koji se odvija u više faza. Neki autori kondicioniranje površine smatraju prvim korakom u formiranju biofilma, iako on predstavlja interakciju površine i njene okoline, odnosno taloženje organskih i neorganskih polimera iz tečnosti koje će omogućiti naknadnu adherenciju bakterija (Donlan, 2002). U živom organizmu ulogu kondicioniranja površine mogu imati suze, pljuvačka, intravaskularna tečnost, respiratorni sekreti i urin.

Prva, inicijalna faza adherencije podrazumeva uspostavljanje reverzibilnih, relativno slabih veza između bakterijske ćelije i supstrata koje su posredovane van der Waals-ovim i elektrostatičkim silama, kao i hidrofobnim vezama. Odmah nakon vezivanja bakterije počinju da proizvode EPS. Sastav EPS je kompleksan i zavisi od vrste bakterija

kao i uslova sredine, ali se polisaharidi, nukleinske kiseline i proteini smatraju osnovnim komponentama (Lasa, 2006; Sitherland, 2001).

Razvoj biofilma rezultat je adhezije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija. Potencijal rasta zavisi od raspoloživih hranljivih sastojaka u neposrednoj okolini, njihove perfuzije do bakterijskih ćelija i mogućnosti uklanjanja otpadnih metaboličkih produkata. Ukoliko su okolnosti povoljne, biofilm se razvija u organizovanu i višeslojnu strukturu, odnosno dolazi do maturacije ili sazrevanja biofilma (**Slika 5**).



**Slika 5.** Formiranje biofilma: a) planktonske bakterijske ćelije; b) inicijalna, reverzibilna faza adhezije; c) ireverzibilno vezivanje za površinu; d) stvaranje mikrokolonija i produkcija EPS; e) maturacija biofilma; f) diseminacija bakterija i g) agregata biofilma. (Modifikovano prema: Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 2012; 272: 541-561)

Arhitektura biofilma vremenom se menja, a mikrokolonije bakterija koje su uklopljene u EPS, obično formiraju strukture pečurkastog ili stubičastog izgleda. Mikrokolonije bakterija međusobno su odvojene mrežom kanala kojom putuju hranjive materije, voda, enzimi, metaboliti i kiseonik. Biofilm može činiti samo jedna bakterijska vrsta, ali češće se sastoji od više različitih vrsta (Davey i sar. 2000; Hall-Stoodley i sar. 2004). Vremenom dolazi do odvajanja bakterija sa površine biofilma ili agregata biofilma, njihove diseminacije do novih, nekolonizovanih površina i formiranja novog biofilma.

#### *1.2.4.2. Rezistencija biofilma na antibiotike i druge antimikrobne agense*

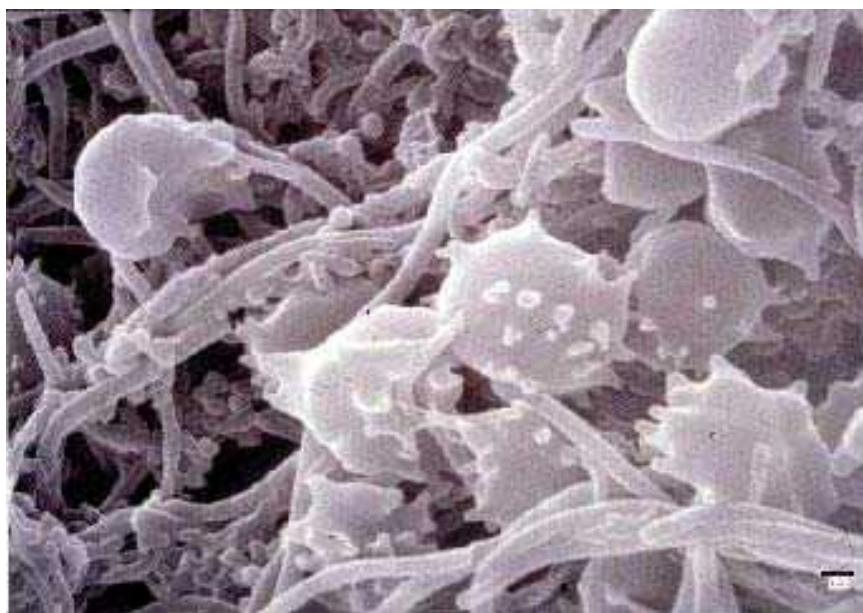
Brojne studije pokazale su da je rezistencija bakterijskih ćelija u biofilmu na antibiotike 10-1000 puta veća od rezistencije bakterija koje rastu planktonski što je u direktnoj zavisnosti od kompleksnosti i zrelosti biofilma (Levy, 1998). Uprkos brojnim istraživanjima veoma malo se zna o mehanizmima rezistencije biofilma na antibiotike i druge antimikrobne agense, ali se pretpostavlja da ona nastaje kao rezultat više različitih činilaca. EPS kao trodimenzionalno polje okružuje bakterijske ćelije, sprečava isušivanje i obezbeđuje zaštitu od spoljašnjih stresornih agenasa kao i činilaca urođene i stečene imunosti. Osim toga, matriks redukuje prodor antibiotika i dezinficijenasa do bakterija, fizički usporavajući njihovu difuziju ili stupajući u hemijsku reakciju sa njima. Praktično, efektivnim koncentracijama antibiotika izložene su samo bakterije u površinskim slojevima biofilma. Na povećanu rezistenciju utiču i promena pH vrednosti i koncentracije CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> u dubljim slojevima biofilma (de Beer i sar. 1994; Zhang i sar. 1996). Ovakve promene slabe metaboličku aktivnost bakterija i usporavaju njihov rast, što svakako predstavlja jedan od razloga povećane otpornosti bakterija u biofilmu. Većina antimikrobnih sredstava efektivnija je u ubijanju bakterija u fazama rasta (Bridier i sar. 2011; Stewart i sar. 2001).

S obzirom na ovakve osobine, infekcije praćene stvaranjem biofilma opstaju uprkos antibiotskoj terapiji i mehanizmima urođene i stečene imunosti, a zajednička karakteristika im je perzistentna inflamacija i oštećenje tkiva (Hoiby i sar. 2011; Chen i sar. 2011). Stoga je ispitivanje novih mogućnosti za prevenciju stvaranja, kao i eradikaciju već stvorenog biofilma danas veoma aktuelno.

Različite studije su antimikrobno dejstvo NAP dokazivale pretežno na suspenzijama bakterija, a samo mali broj je bio posvećen ispitivanjem uticaja na bakterije u biofilmu (Salamitou i sar. 2009). Iako su ova istraživanja u samom začetku, preliminarni rezultati ukazuju da NAP imaju veliki potencijal za buduću kliničku primenu. Međutim, neophodna su opsežna istraživanja radi jasnog definisanja i razumevanja mehanizama koji leže u osnovi baktericidnog efekta NAP kao i optimizacije uslova pod kojima se postižu najbolji efekti NAP na biofilm bakterija.

### 1.2.4.3. Dentalni plak

Jedna od najviše ispitivanih zajednica bakterija je dentalni plak. Dentalni plak odnosno biofilm predstavlja složenu zajednicu mikroorganizama oralne mikroflore u matriksu bakterijskog i salivarnog porekla (**Slika 6**). Može se akumulirati supragingivalno, odnosno na kliničku krunicu zuba, ali i ispod gingivalnog ruba tj. subgingivalnom prostoru sulkusa ili džepa. Sastoji se od: stečene zubne pelikule, bakterija i matriksa.



**Slika 6.** Dentalni plak

[http://www.textbookofbacteriology.net/dental\\_plaque](http://www.textbookofbacteriology.net/dental_plaque)

Stečena zubna pelikula vodi poreklo od salivarnih glikoproteina, ali se njen sastav razlikuje u zavisnosti od površine na kojoj se stvara. Bakterije rodova *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* i *Neisseria* su najčešći primarni kolonizujući organizmi površine zuba. Bakterije koje se pojavljuju nešto kasnije tokom formiranja plaka pripadaju rodovima *Actinobacillus*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* i *Treponema* (Roberts i sar. 2010).

Najveći procenat mase matriksa dentalnog plaka sačinjava bakterijski ekstracelularni homopolimer dekstran (glukan). Sačinjen je od centralnog lanca u kome su molekuli glukoze međusobno povezani  $\alpha$ -1,6-glikozidnom vezom i velikog broja kraćih, bočnih lanaca, gde između molekula postoji  $\alpha$ -1,4-glikozidna veza, a za njih su vezani lanci tercijarnog tipa sa  $\alpha$ -1,3-glikozidnom vezom. Ovakav tip dekstrana nema energetska

svojstva, već bakterijama isključivo služi kao „lepak“ koji pomaže njihovu adherenciju za površinu zuba kao i međusobnu koagregaciju.

Bakterije koje su prisutne u dentalnom plaku dovode do nastanka oboljenja koja se smatraju najrasprostranjenijim bolestima mikrobne etiologije danas, zubnog karijesa i parodontalnih bolesti. *Streptococcus mutans* se smatra jednom od najvažnijih kariogenih bakterija (Balakrishnan i sar. 2000) dok se patogene bakterije *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dovode u vezu sa nastankom parodontalnih bolesti (Roberts i sar. 2010; Socransky i sar. 2002).

NAP su nedavno prepoznate kao potencijalno novo sredstvo za dezinfekciju u oblasti stomatologije, posebno kaviteta nastalih karijesom (Sladek i sar. 2004), kanala korena zuba (Jiang i sar. 2012) i parodontalnih džepova.

Zubni karijes je oboljenje tvrdih zubnih tkiva koje napreduje centripetalno dovodeći do razaranja zuba. U inicijalnoj fazi, u zonama akumulacije dentalnog plaka, pod uticajem kiselina koje proizvode prisutne bakterije, dolazi do demineralizacije gleđi. Sve dok ne postoji vidljiv površinski kavitet u gleđi, napredovanje karijesa je moguće zaustaviti odstranjivanjem plaka ili remineralizacijom gleđi nanošenjem jona kalcijuma, fluorida i fosfata. Međutim, ako izostanu mere kontrole karijesa, dolazi do površinskog pucanja gleđi i nastanka oštećenja. Time se stvara mogućnost za napredovanje lezije i demineralizaciju dentina. Lečenje karijesne lezije podrazumeva, najčešće mehaničko uklanjanje demineralizovanog i inficiranog zubnog tkiva mašinskim rotirajućim instrumentima. Njihova upotreba za posledicu ima prekomerno uklanjanje zdravog zubnog tkiva, pri čemu se razvijaju visoke temperature, pritisak i vibracije, što može dovesti do oštećenja pulpe zuba (Anderson i sar. 1991). Savremena minimalno interventna stomatologija podrazumeva što manju traumu prilikom stomatološke intervencije uz maksimalno čuvanje zubnog tkiva, zbog čega se poslednjih godina istražuju nove metode u terapiji karijesa. U skladu sa tim, NAP predstavljaju veoma atraktivnu tehnologiju koja bi mogla da pruži mogućnost efikasne i bezbolne dezinfekcije dentina uz poštedu zdravog zubnog tkiva (Rupf i sar. 2010; Sladek i sar. 2007).

Ukoliko karijes nije saniran, bakterijska infekcija vremenom zahvata pulpu ili korenski kanal pri čemu štetni nadražaji mogu dospeti u periapikalni prostor u viličnoj kosti i prouzrokovati patološke promene koje dovode do hroničnog apeksnog parodontita. Glavni cilj endodontske terapije je eliminisanje bakterijske infekcije iz kanala korena zuba, čime se sprečava reinfekcija i razvoj periapikalne lezije. Standardnim intrakanalnim procedurama, kao što su mehaničko uklanjanje i intrakanalno korišćenje iriganasa i antimikrobnih medikamenata, uklanja se najveći deo bakterija iz kanala korena zuba (Buchanan, 1994). Međutim, brojne studije pokazale su da jedan deo bakterija opstaje i nakon intrakanalnog tretmana, posebno u apikalnim delovima kanala korena, što predstavlja osnovni razlog neuspeha terapije (Sundqvist i sar. 1998). Pored kompleksnosti anatomije kanalnog sistema korena, za neuspeh terapije su odgovorni i difuzna lokalizacija infekcije u kanalu, ograničena difuzibilnost antimikrobnih sredstava i relativna rezistencija prisutnih bakterija.

Novije *in vitro* i *ex vivo* studije pokazale su da se sa NAP postiže efikasna dezinfekcija inficiranih kanala korena zuba za kratko vreme (Jiang i sar. 2012). Od posebne je važnosti da hemijski aktivne i naelektrisane čestice plazme dospevaju u sve delove kanalnog sistema korena i dentinske tubule u kojima vrše inaktivaciju zaostalih mikroorganizama, čime se sprečava reinfekcija kanala korena (Wang i sar. 2011). Pored toga, ovakvim pristupom bi se tretman inficiranih kanala korena mogao izvršiti tokom jedne posete pacijenta, što je svakako prednost nad tradicionalnim interkanalnim procedurama koje podrazumevaju tretman u više seansi.

Patogena mikroflora u dentalnom plaku predstavlja glavni etiološki faktor u nastanku parodontalnih bolesti tokom kojih dolazi do inflamacije gingive i/ili parodonticijuma. Gingivitis, zapaljenje desni, je najblaži oblik i prisutan je kod 50-90% odrasle populacije na svetu. Radi se o reverzibilnom procesu koji se lako leči primenom profesionalnog tretmana, uklanjanjem nemineralizovanog i mineralizovanog dentalnog plaka, kao i adekvatnom oralnom higijenom. Međutim, ukoliko se gingivitis ne leči zapaljenje vremenom zahvata i dublja tkiva usled čega dolazi do formiranja parodontalnih džepova i nastanka parodontopatije. Vremenom ovaj proces dovodi do destrukcije potpornog aparata zuba, a krajnji rezultat je potpuna funkcionalna dezintegracija i ispadanje zuba.



Poslednjih godina je više različitih studija ukazalo na postojanje povezanosti između dentalnog plaka, posebno subgingivalnog plaka kod pacijenata sa parodontopatijom i različitih sistemskih oboljenja kao što su endokarditis (Lockhart i sar. 2009), hipertenzija (Desvarieux i sar. 2010) i diabetes mellitus (Simpson i sar. 2010). Primarni i najvažniji zadatak u lečenju parodontopatije je uklanjanje dentalnog plaka, čime se smanjuje i rizik od razvoja sistemskih oboljenja. Danas se u kliničkoj praksi, u okviru neinvanzivnih metoda, najčešće koristi mehaničko uklanjanje dentalnog plaka i dopunska sredstva kao što su antiseptici i antibiotici (Haffajee i sar. 2003; Hung i sar. 2002; Preshaw i sar. 2004; Hanes i sar. 2003). Međutim, iznalaženje novih terapijskih postupaka za efikasniju kontrolu i uklanjanje plaka predstavlja veoma aktuelnu oblast istraživanja u savremenoj parodontologiji. Do sada je ispitivana mogućnost korišćenja NAP u terapiji periimplantitisa (Koban i sar. 2011), ali moguća primena NAP u parodontalnoj terapiji nije ispitivana.

### **1.3. INTERAKCIJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME SA ŽIVIM EUKARIOTSKIM CELIJAMA I TKIVIMA**

Pored ispitivanja različitih aspekata antimikrobnog delovanja NAP, za buduću kliničku primenu neophodno je precizno definisanje uslova pod kojima plazma ispoljava baktericidni efekat, ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva, kao i razumevanje mehanizama koji leže u osnovi interakcije NAP sa živim ćelijama i tkivima. *In vitro* eksperimenti na različitim ćelijskim modelima pokazali su da, u zavisnosti od primenjenih radnih parametara, NAP uzrokuju specifične biološke efekte. Primenom plazmi veće jačine i dužim vremenom izlaganja uzrokovana je apoptoza i nekroza ispitivanih ćelijskih kultura, dok se smanjenjem jačine i dužine izlaganja postizao reverzibilan gubitak adhezije, povećanje permeabilnosti i inhibicija ćelijske migracije (Kalghatgi i sar. 2011; Kieft i sar. 2006; Kieft i sar. 2005; Stoffels i sar. 2006). Novija ispitivanja pokazuju da plazma tretman ne uzrokuje oštećenje kože i tkiva kornee pod uslovima pod kojima se postiže inaktivacija mikroorganizama, što bi u budućnosti moglo da predstavlja dobru osnovu za terapijsku primenu plazma tehnologije u oblastima oftalmologije i dermatologije (Heinlin i sar. 2010; Brun i sar. 2012). Preliminarni

rezultati različitih istraživanja dokazali su da NAP, pod određenim uslovima, podstiču proliferaciju fibroblasta i endotelnih ćelija (Fridman i sar. 2008). Kako je proliferacija ovog tipa ćelija važna za proces zarastanja rana, smatra se da bi selektivno antimikrobno dejstvo uz stimulaciju proliferacije specifičnih tkivnih ćelija mogao biti novi pristup u terapiji hroničnih rana. Kalghatgi sa saradnicima je utvrdio da, u zavisnosti od primenjene doze, NAP mogu smanjivati proliferaciju i uzrokovati apoptozu ćelija u ispitivanim kulturama (Kalghatgi i sar. 2011; Kalghatgi i sar. 2008). Ovakva istraživanja su predstavljala podsticaj za ispitivanje antitumorskog dejstva NAP. Nedavno su sprovedene studije u kojima je analizom efekata NAP na kulturama malignih ćelija *in vitro* utvrđeno da tretman selektivno indukuje apoptozu tumorskih ćelija bez uticaja na normalne ćelije, dok *in vivo* istraživanja na životinjskim modelima pokazuju da se lokalnom primenom može redukovati veličina tumora (Keidar i sar. 2011; Vandamme i sar. 2012).

Uticaj NAP na različite ćelijske funkcije mezenhimalnih matičnih ćelija, prema dostupnim podacima u literaturi, nije do sada ispitivan. Ovakva istraživanja bi mogla da otvore još jednu atraktivnu oblast moguće primene NAP u tkivnom inženjeringu i regenerativnoj medicini.

### **1.3.1. Matične ćelije**

Matične ćelije su izvorne ćelije organizma sisara, koje po opštoj definiciji predstavljaju nespecializovane ćelije sa sposobnošću samoobnavljanja sopstvene populacije i mogućnošću diferentovanja u veći broj specializovanih ćelija. Matične ćelije mogu imati različite potencijale diferentovanja, uključujući totipotenciju zigota (matične ćelije koje nastaju po oplodnji i koje se mogu diferentovati u bilo koji ćelijski tip); pluripotenciju embrionalnih matičnih ćelija (matične ćelije potomci totipotentnih ćelija iz kojih se mogu razviti praktično sva tkiva organizma); multipotenciju somatskih matičnih ćelija (fetalne/adultne matične ćelije, tkivno-specifične matične ćelije iz kojih nastaju specializovana tkiva); i unipotentnost matičnih ćelija koje produkuju samo jedan tip ćelija, ali zadržavaju sposobnost samoobnove.

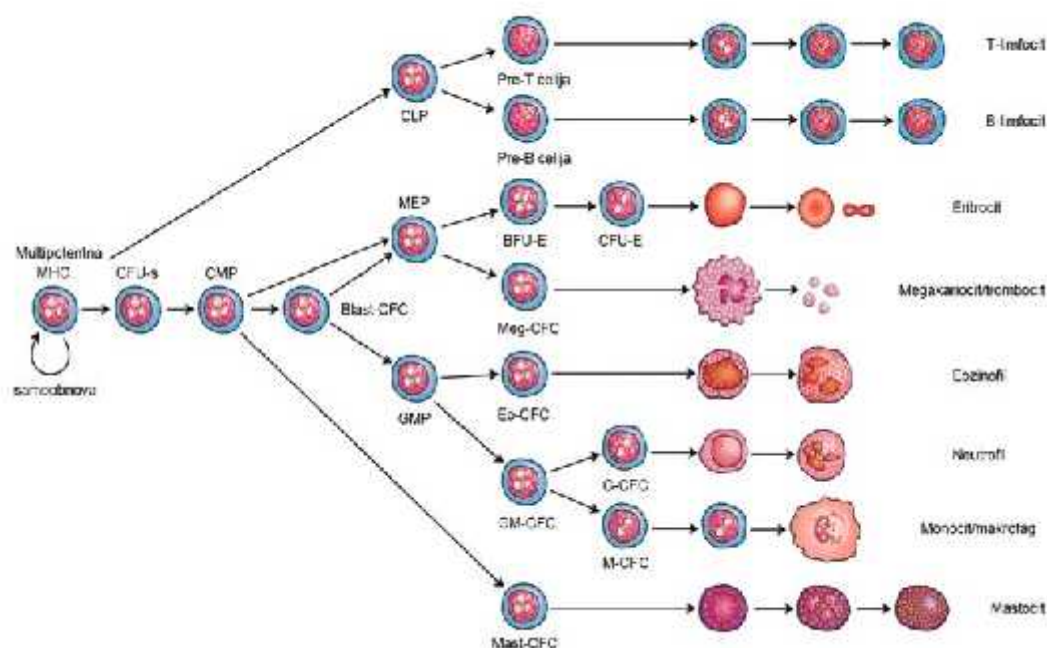
Matične ćelije igraju važnu ulogu u embrionalnom razvoju i organogenezi, ali i u tkivima odraslog organizma u kojima imaju ulogu u održavanju tkivne homeostaze, kao i u regeneraciji oštećenih ili ostarelih tkiva (Salem i sar. 2010). Postojanje humanih adultnih matičnih ćelija do danas je dokazano u različitim tkivima: koštana srž, jetra, mozak, srce, zubna pulpa, folikul dlake, koža, mišići, masno tkivo, krv, retina, kornea, epitel gastrointestinalnog trakta.

Najviše izučavane tkivno-specifične matične ćelije se nalaze u koštanoj srži, tkivu mezodermalnog porekla, koje sadrži heterogenu populaciju ćelija: hematopoetske ćelije, stromalne ćelije, ćelije mezenhimalnog (endotelne ćelije, fibroblasti, adipociti, osteoblasti, miociti, adventicijske ćelije retikuluma) i nemezenhimalnog porekla (makrofage). U koštanoj srži opisana su dva tipa multipotentnih matičnih ćelija, matične ćelije hematopoeze i mezenhimalne matične ćelije.

Matične ćelije hematopoeze su prve otkrivene matične ćelije u eksperimentima opisanim početkom 60-tih godina prošlog veka (Till i sar. 1961). Najveći deo saznanja o multipotentnim matičnim ćelijama hematopoeze dobijen je zahvaljujući razvoju većeg broja *in vitro* i *in vivo* metoda kojima se dokazuju osnovne funkcionalne karakteristike ovih ćelija, a njihovo uvođenje predstavljalo je prekretnicu kako u razvoju eksperimentalne i kliničke hematologije, tako i u bazičnim istraživanjima o matičnim ćelijama.

Zahvaljujući svojim funkcionalnim karakteristikama, sposobnosti samoobnove, proliferacije i diferencijacije, ove ćelije obezbeđuju stalnu obnovu i održavanje konstantnog broja zrelih ćelija svih krvnih loza koje imaju ograničen životni vek. Kontinuiranim procesom proliferacije, diferencijacije i sazrevanja od malobrojne populacije primitivnih multipotentnih matičnih ćelija hematopoeze nastaje više tranzitnih kategorija manje primitivnih multipotentnih ćelija, od kojih zatim nastaju opredeljene matične ćelije za jednu ili više krvnih loza (Metcalf, 2007). Tokom ovog procesa dolazi do regresije sposobnosti za samoobnovu i proliferativnog kapaciteta, dok raste fenotipska i funkcionalna opredeljenost ka odgovarajućoj krvnoj lozi. Stoga se

heterogena ćelijska populacija matičnih ćelija hematopoeze opisuje kao razvojni kontinuum ćelija različitog stepena zrelosti i diferencijacije u okviru koga se razlikuju tri ćelijska odeljka: primitivne multipotentne matične ćelije hematopoeze, opredeljene matične ćelije hematopoeze i ćelije prekursori (**Slika 7**).



**Slika 7.** Opšta šema hematopoeze. Proliferacijom i diferencijacijom malobrojnih multipotentnih matičnih ćelija hematopoeze preko niza tranzitnih kategorija manje primitivnih multipotentnih ćelija, stvaraju se funkcionalno različiti tipovi zrelih ćelija, uključujući neutrofile, monocite/makrofage, eozinofile, eritrocite, trombocite, mastocite, B i T limfocite.

(Modifikovano prema: Metcalf D. Concise Review: Hematopoetic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered questions. Stem Cells 2007; 25: 2390-2395)

Ravnoteža između procesa samoobnove matičnih ćelija hematopoeze i njihove proliferacije i diferencijacije u zrelije oblike, obezbeđena je sofisticiranom regulatornom kontrolom koja se u fiziološkim uslovima ostvaruje lokalno u strogo definisanoj mikrosredini hematopoeze. Mikrosredina hematopoeze predstavlja kompleksan molekularni milje koga čine stromalne ćelije i ćelijski produkti (molekuli ekstracelularnog matriksa i regulatorni faktori) i u okviru koga se ostvaruju specifične interakcije sa hematopoetskim ćelijama (Bugarski i sar. 2007).

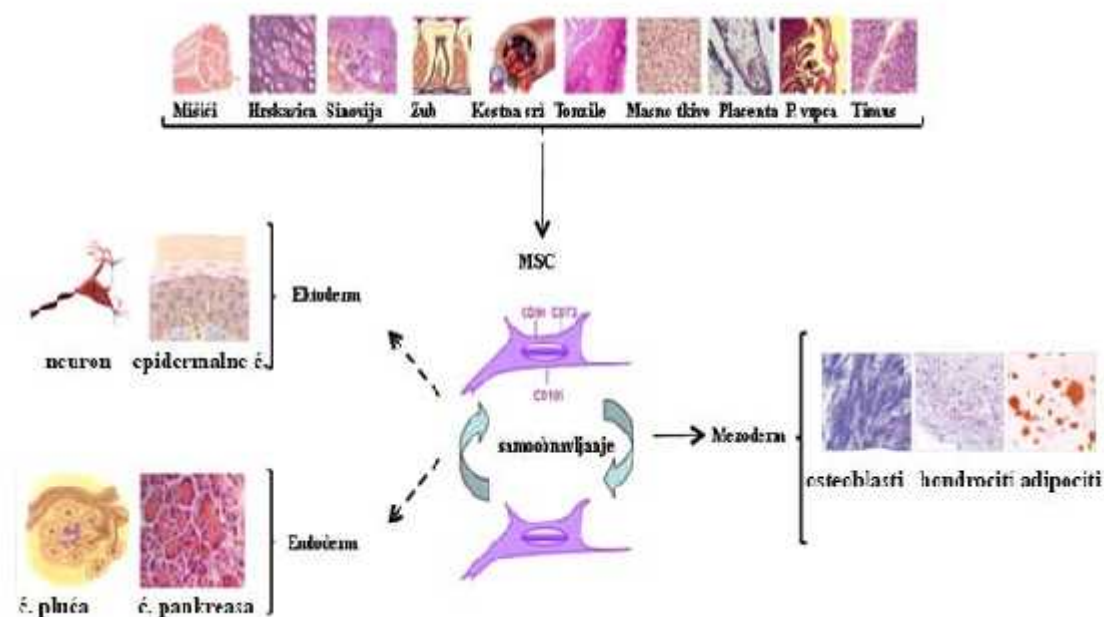
### 1.3.2. Mezenhimalne matične ćelije

Na postojanje nehematopoetskih matičnih ćelija u koštanoj srži prvi je ukazao nemački patolog Conheim pre oko 130 godina. On je pretpostavio da ove ćelije doprinose normalnom procesu zarastanja rana kao izvor fibroblasta (Prockop, 1997). Tek početkom 1970. godine, Friedenstein sa saradnicima (Friedenstein i sar. 1970) dokazuje da se u koštanoj srži, pored neadherentnih hematopoetskih ćelija, nalazi i retka populacija ćelija (otprilike 1 u 10000 ćelija sa jedrom u koštanoj srži) koje pokazuju adheziju za plastiku u kulturi i koje su klonogene u uslovima kulture. Ovu populaciju ćelija opisuje kao multipotentne stromalne prekursorske ćelije koje su vretenastog oblika i definiše ih kao ćelije koje formiraju kolonije slične fibroblastima (CFU-F, colony-forming unit fibroblasts). Takođe, dokazuje da se neke od ovih kolonija mogu diferencirati i stvarati agregate koji podsećaju na mala polja kosti ili hrskavice (Friedenstein, 1976). Ove nalaze su kasnije potvrdile i proširile brojne studije, u kojima su ove ćelije izolovane i iz humane koštane srži. Proučavanjem proliferativnih sposobnosti CFU-F ćelija, kao i fenotipskih karakteristika, pokazano je da su ove ćelije multipotentne i da se mogu diferencirati u različite mezenhimalne ćelije uključujući hondrocite, adipocite, mioblaste i osteoblaste (Bianco i sar. 2008; Caplan, 2007; Kolf i sar. 2007; Pittinger i sar. 1999). Novije studije *in vitro* i *in vivo* dokazuju da mezenhimalne matične ćelije imaju potencijal diferencijacije i u nemezenhimalne ćelijske linije: neurone, astrocite ili ćelije pankreasa (Jori i sar. 2005; Beyer Nardi i sar. 2006; Chen i sar. 2004).

Prvobitno su ove matične ćelije u literaturi označavane kao stromalne matične ćelije koštane srži (BMSC, bone marrow stromal stem cells), s obzirom da pripadaju stromi koštane srži (Owen, 1988) ili mezenhimalne matične ćelije (MSC, mesenchymal stem cells) zbog sposobnosti da se diferenciraju u mezenhimalne ćelijske linije (Caplan, 1991), ali se u današnje vreme često označavaju i kao multipotentne mezenhimalne stromalne ćelije (MSC, mesenchymal stromal cells) (Horwitz i sar. 2005), pri čemu je važno naglasiti da svi ovi nazivi označavaju istu kategoriju ćelija.

Pored koštane srži, MSC su izolovane iz različitih tkiva: skeletnih mišića (Williams i sar. 1999), masnog tkiva (Zuk i sar. 2002), pupčane vrpce (Kim i sar. 2012), amnijske

tečnosti (In't Anket i sar. 2003), sinovije (De Bari i sar. 2001), periferne krvi (Kuznetsov i sar. 2001) (**Slika 8**).



**Slika 8.** Mezenhimalne matične ćelije izolovane iz različitih tkiva. Mezenhimalne matične ćelije poseduju sposobnost samoobnove i diferentovanja u različite mezenhimalne ali i nemezenhimalne ćelijske linije. (Modifikovano prema: <http://www.cancerlink.ru/enmesenchymalstem.html>)

Regenerativni kapacitet MSC, kroz njihov nesumnjiv plasticitet, tj. sposobnost da se diferencuju u ćelije različite od ćelija koje su prisutne na mestu odakle potiču, prepoznat je kao glavni potencijal ovih ćelija za terapijske primene. Okruženje i molekularni mehanizmi koji kontrolišu diferencijaciju MSC još uvek nisu razjašnjeni, kao ni specifični markeri pomoću kojih bi se mogla predvideti određena diferencijacija. Dosadašnja saznanja ukazuju da se mobilisane MSC pod dejstvom lokalnih faktora mogu diferencovati u najmanje tri pravca: a) u tkivno specifične ćelije, potrebne za regeneraciju oštećenog tkiva, kao kod infarkta miokarda, gde MSC mogu diferencovati u kardiomiocite, glatko-mišićne ćelije i endotelne ćelije (Bartunek i sar. 2008; Psaltis i sar. 2008; Pittenger i sar. 2004); b) u funkcionalne ćelije koje imaju ulogu u stvaranju specijalne mikrosredine neophodne za obnovu tkiva (Petrie Aronin i sar. 2010); c) u regulatorne ćelije koje učestvuju u obnovi i regeneraciji tkiva pomoću sekrecije citokina sa trofičkom i imunomodulatornom funkcijom (Ankrum i sar. 2010). Način na koji dolazi do migracije MSC do oštećenog i obolelog tkiva još uvek nije u potpunosti poznat. Pretpostavlja se da specifični receptori i ligandi sekretovani od strane oštećenog

tkiva podstiču mobilizaciju MSC u cirkulaciju, ubrzavaju transport, adheziju i infiltraciju ovih ćelija ali i obezbeđuju posebno mikrookruženje za samoobnavljanje i održanje multipotentnog potencijala diferencijacije MSC (Fong i sar. 2011). Nakon naseljavanja u obolelo tkivo MSC počinju da luče brojne bioaktivne molekule kao što su glikoproteini ekstracelularnog matriksa, citokini i faktori rasta. Ovi faktori mogu delovati direktno, pokretanjem intraćelijskih mehanizama u oštećenim ćelijama ili indirektno, indukujući sekreciju funkcionalno aktivnih medijatora u susednim ćelijama (Ankrum i sar. 2010; Doorn i sar. 2012) i na taj način stimulišu tkivnu regeneraciju i smanjuju inflamaciju, apoptozu i fibrozu oštećenih tkiva.

Pored regenerativnog potencijala, brojne studije su dokazale da MSC ispoljavaju i modulatorni kapacitet prvenstveno u interakcijama sa hematopoetskim i imunskim ćelijama. Danas je poznato da MSC deluju na ćelije hematopoeze međućelijskim interakcijama direktno, kao i putem produkcije ili prezentovanja regulatornih molekula (Bugarski i sar. 2007). Istraživanja imunomodulatornih svojstava MSC ukazala su da MSC svoje delovanje na imunske ćelije (T limfocite, B limfocite, NK ćelije i dendritične ćelije) takođe ostvaruju preko direktnih ćelijskih kontakata i brojnih solubilnih faktora koje produkuju (indoleamin 2,3-dioksidaze, azot monoksid, transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Meisel i sar. 2004; Sato i sar. 2007; Sotiropoulou i sar. 2006). *In vitro* studije su pokazale da su MSC sposobne da suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T limfocita nakon izlaganja aloantigenima i nespecifičnim mitogenima (Di Nicola i sar. 2002; Krampera i sar. 2003; Le Blanc i sar. 2003; Aggarwal i sar. 2005). Takođe, pokazano je da humane MSC imaju sposobnost da modulišu funkcije B limfocita, odnosno da inhibiraju njihovu proliferaciju i diferencijaciju u plazma ćelije (Corcione i sar. 2006). Imunoregulatornom efektu MSC doprinosi i interakcija ovih ćelija sa NK ćelijama. Pokazano je da se supresija proliferacije NK ćelija ostvaruje kroz direktan kontakt i ćelijsku interakciju sa MSC, kao i sekreciju solubilnih faktora od strane MSC kao što su TGF- $\beta$  i PGE<sub>2</sub> (Sotiropoulou i sar. 2006). Pored toga, MSC deluju inhibitorno na diferencijaciju i maturaciju dendritičnih ćelija koje imaju fundamentalnu ulogu u prezentaciji antigena (Jiang i sar. 2005). MSC redukuju proinflamatorni potencijal dendritičnih ćelija inhibirajući njihovu sekreciju TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-12, a povećavajući nivo IL-10 čime se podstiče antiinflamatorni fenotip ovih ćelija (Jiang i sar. 2005; Aggarwal i sar. 2005; Beyth i sar. 2005).

### 1.3.2.1. Karakterizacija mezenhimalnih mati nih elija

Zbog rastućeg interesa primene MSC u terapijske svrhe, kao i u oblasti regenerativne medicine, tkivnog i genetičkog inženjeringa, postalo je neophodno jasno definisanje ovih ćelija zbog čega je Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju, 2006. godine, odredilo minimalne kriterijume za definisanje humanih multipotentnih mezenhimalnih stromalnih ćelija (Dominici i sar. 2006):

- adherentnost za plastiku u standardnim uslovima kultivacije
- ispoljavanje specifičnih mezenhimalnih markera (CD105, CD73 i CD 90) i odsustvo hematopoetskih linijskih markera (CD34, CD45, CD11a, CD19, HLA-DR)
- multipotentni potencijal diferencijacije, potencijal za diferencijaciju *in vitro* u najmanje tri mezenhimalne linije (osteogenu, adipogenu, hondrogenu).

Osobina vezivanja za plastičnu podlogu je dobro poznata karakteristika MSC, dok ekspresija površinskih antigena omogućava identifikaciju određene ćelijske populacije. Najčešće pominjani pozitivni markeri koje ispoljavaju MSC su: CD105 (SH2-endoglin), CD73 (ecto-5-nucleotidase), CD44 (receptor za hijaluronsku kiselinu), CD90 (Thy-1), CD71 (transferin receptor), Stro-1 (marker stromalnih ćelija), kao i adhezivni molekuli CD106 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule), CD166 (ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) i CD29 (integrin  $\beta 1$ ) (Chamberlain i sar. 2007). Opšte prihvaćeno mišljenje je da humane MSC ne ispoljavaju hematopoetske linijske markere CD45 (pan-leukocitni marker), CD34 (marker primitivnih hematopoetskih progenitora i endotelnih ćelija), CD14 ili CD11b (markeri monocita i makrofaga), kao ni kostimulatorne molekule CD80, CD86 ili CD40 ili adhezivne molekule CD31 (PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule), CD18 (LFA-1, leukocyte function-associated antigen-1).

Iako su MSC bile predmet intenzivnih istraživanja tokom poslednjih godina, brojna pitanja vezana za pravi identitet i poreklo ovih ćelija ostaju nerazjašnjena, prvenstveno zbog nedostatka specifičnih markera koji bi olakšali njihovu nedvosmislenu identifikaciju (**Tabela 1**). U brojnim istraživanjima dobijeni su vrlo heterogeni podaci, verovatno zbog korišćenja različitih metoda izolacije i *in vitro* kultivacije, od čega zavisi fenotip i funkcija proisteklih ćelijskih populacija.



**Tabela 1.** Površinski markeri korišćeni za karakterizaciju MSC

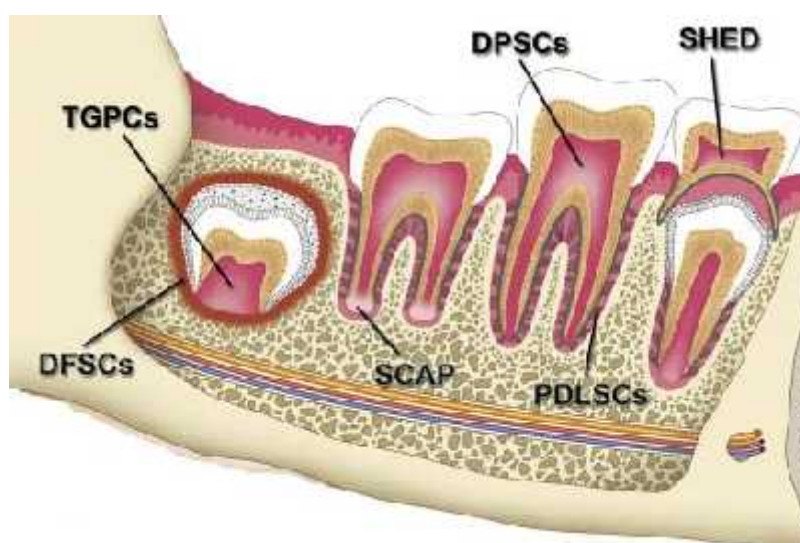
Pozitivni markeri	Negativni markeri
CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD51, CD54, CD58, CD61, CD62L, CD71, CD73, CD90, CD102, CD104, CD105, CD106, CD119, CD120a, CD120b, CD121, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, CCR10, VCAM-1, CD166, AL-CAM, ICAM-1, STRO-1 (CD140b), HER-2/erbB2 (CD340), frizzled-9 (CD349), W8B2, W3D5, W4A5, W5C4, W5C5, W7C6, 9A3, 58B1, F9-3C2F1, HEK-3D6	CD45, CD34, CD14, CD11a, CD19, CD86, CD80/CD40, CD15, CD18, CD25, CD31, CD49d, CD50, CD62E, CD62P, CD117

Multipotentni potencijal diferencijacije u pravcu tri mezenhimalne ćelijske linije, osteoblaste, hondroците i adipocite, je biološka osobina koja na najsigurniji način karakteriše MSC, zbog čega je Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju ovu karakteristiku postavilo kao treći standard za definisanje humanih MSC.

#### 1.3.2.2. Mezenhimalne matične ćelije dentalnog porekla

Na osnovu nalaza dobijenih iz različitih oblasti medicine koji ukazuju da se MSC sa uspehom mogu primenjivati u reparaciji i/ili regeneraciji kosti (Horwitz i sar. 2002), hrskavice (Murphy i sar. 2003), srca (Stamm i sar. 2003) i kičmene moždine (Mezey i sar. 2003), sprovedene su poslednjih godina različite studije sa ciljem identifikacije i karakterizacije matičnih ćelija poreklom iz zubnih tkiva koje bi se mogle primenjivati u regenerativnoj stomatologiji. Prve humane matične ćelije dentalnog porekla izolovane su iz pulpe (DPSC, dental pulp stem cells) stalnog trećeg molara 2000. godine (Gronthos i sar. 2000). Istraživanja su pokazala da ove ćelije ispoljavaju slične karakteristike kao mezenhimalne matične ćelije koštane srži, da imaju izražene proliferativne sposobnosti, da su klonogene i sposobne da se diferentuju u ćelije slične odontoplastima i

osteoblastima, kao i da mogu formirati komplekse slične dentinu i pulpi nakon transplantacije u miša sa kompromitovanim imunološkim sistemom (Morsezeck i sar. 2008). Nakon otkrića da adultne matične ćelije postoje u pulpi zuba sa uspehom su izolovani različiti tipovi matičnih ćelija zuba kao što su: matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba (SHED, stem cells from human exfoliated deciduous teeth) (Miura i sar. 2003), matične ćelije dobijene iz apikalne papile (SCAP, stem cells from apical papilla) (Sonoyama i sar. 2008) i MSC iz folikula zuba (DF-PC, dental follicle progenitor cells) (Morsezeck i sar. 2009) (**Slika 9**).

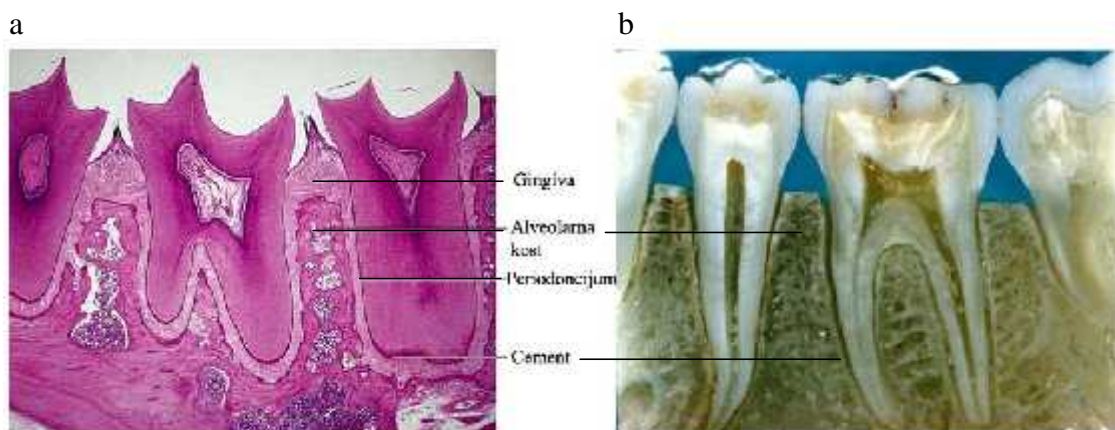


**Slika 9.** Matične ćelije dentalnog porekla: matične ćelije iz pulpe stalnog zuba (DPSC); matične ćelije iz pulpe mlečnih zuba (SHED); matične ćelije dobijene iz apikalne papile (SCAP); MSC iz folikula zuba (DFSC); progenitorne matične ćelije iz folikula zuba (TGPC); matične ćelije iz periodoncijuma zuba (PDLSC)  
(Modifikovano prema: Ergusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. J Prosthodont Res 2012; 56: 151-156).

### 1.3.2.3. Mezenhimalne matične ćelije poreklom iz periodoncijuma

Potporni aparat zuba ili parodontijum je izuzetno kompleksno tkivo koga čine gingiva, periodoncijum, cement korena zuba i alveolarna kost, a glavna uloga mu je ne samo u pričvršćivanju zuba za koštano tkivo usne duplje, već i u održavanju integriteta površine mastikatorne oralne sluznice (**Slika 10**). Periodoncijum ili periodontalni ligament (PDL, periodontal ligament) predstavlja vezivno tkivo koje okružuje zub i spaja cement korena sa laminom durom i alveolarnom kosti. U koronarnom delu nastavlja se u laminu propriju gingive od koje je odvojen snopovima kolagenih vlakana koja povezuju

alveolarnu kost i koren. Tkivo periodoncijuma je dobro prokrvljeno i sadrži heterogenu grupu ćelija: fibroblaste, osteoblaste, cementoblaste, osteoklaste, kao i epitelne i nervne ćelije. Pored važne uloge u potpori zuba, ovo tkivo doprinosi ishrani zuba i učestvuje u homeostazi i reparaciji oštećenog tkiva.



**Slika 10.** Parodontijum. a) histološki prikaz b) presek zuba in situ  
(<http://dentallecnotes.blogspot.com/2011/11/illustrative-note-powerpoint.html>)

Koncept da se matične ćelije nalaze u periodoncijumu predložio je osamdesetih godina prošlog veka Melcher (Melcher, 1985), ali naj snažniji dokaz da ove ćelije zaista i postoje dao je u svojim studijama McCulloch sa saradnicima (McCulloch, 1985; McCulloch, 1995; Lekic i sar. 1996). On je identifikovao malu populaciju progenitorskih ćelija smeštenih uz krvne sudove periodoncijuma sa karakterističnim citološkim osobinama matičnih ćelija koje su reagovala na stimulatorne faktore i imale sporo vreme ćelijskog ciklusa. Humane matične ćelije iz periodoncijuma (hPDLSC, human periodontal ligament stem cell) prvi put su izolovane 2004. godine sa morfološkim, fenotipskim i proliferativnim karakteristikama adultnih mezenhimalnih matičnih ćelija (Seo i sar. 2004). Novije studije su pokazale da ove ćelije poseduju sposobnost diferencijacije u ćelije koje podsećaju na adipocite, osteoblaste i cementoblaste u *in vitro* uslovima i da mogu proizvoditi *in vivo* tkiva koja su slična cementu i periodoncijumu zuba (Mrozik i sar. 2010; Shi i sar. 2005).

Destrukcija potpornog aparata zuba usled parodontalnih bolesti je jedan od glavnih uzroka gubitka zuba, a jedan od primarnih ciljeva parodontalne terapije je rekonstrukcija izgubljenog tkiva i funkcije potpornog aparata zuba. Međutim, sve dosadašnje regenerativne procedure, kao što su biomodifikacija površine korena zuba, vođena

regeneracija tkiva, primena faktora rasta i korišćenje koštanih supstituenata uspevaju samo delimično da postignu takvu rekonstrukciju (Chen i sar. 2010; Aichelmann-Reidy i sar. 2008). Izolacija i identifikacija hPDLSC je otvorila nove mogućnosti primene ovih ćelija u tkivnom i ćelijskom inženjeringu i razvoj potpuno novog pristupa u regenerativnoj parodontalnoj terapiji.

Savremena istraživanja donela su veliki napredak u razumevanju biologije matičnih ćelija, a njihova potencijalna klinička primena intenzivirala je ispitivanja usmerena ka novim terapijskim postupcima, prvenstveno u regenerativnoj medicini, ćelijskoj terapiji i otkriću novih lekova. S druge strane, kulture adultnih matičnih ćelija predstavljaju relevantne modele za kontrolisane *in vitro* studije procesa razvoja i remodelovanja tkiva, kao i za ispitivanje uticaja različitih faktora u normalnim i patološkim uslovima, što predstavlja osnovu za korekciju postojećih, ali i za uvođenje novih modaliteta lečenja. Matične ćelije, kao i različita tkiva u koja se mogu diferencirati, predstavljaju značajan model sistem za razvoj i ispitivanje delovanja i/ili predikciju toksičnosti novih farmakološki aktivnih supstanci, potencijalnih lekova ili terapijskih sredstava.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Na osnovu dosadašnjih saznanja o mogućnostima primene niskotemperaturne atmosferske plazme za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju u oblasti medicine i stomatologije, od izuzetne važnosti za moguću primenu modifikovane plazma igle ispitivane u ovom istraživanju je precizno definisanje uslova pod kojima plazma stvorena ovim izvorom ispoljava baktericidni efekat, ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva. Prema dostupnim podacima iz literature, do sada nije ispitivana interakcija niskotemperaturne, neravnotežne atmosferske plazme sa normalnim humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama, kao ni mogućnost primene u parodontalnoj terapiji.

Polazeći od ovih činjenica postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

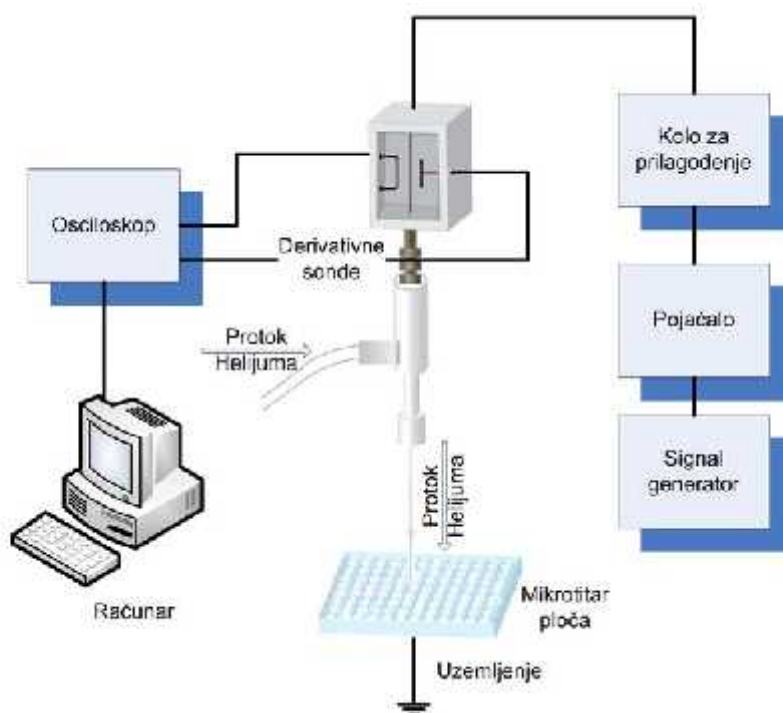
1. Ispitati uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na bakterije u suspenzijama različitih koncentracija u zavisnosti od jačine plazme, protoka gasa i dužine izlaganja:
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na Gram-pozitivne bakterije *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*.
2. Ispitati uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na biofilm bakterija u zavisnosti od jačine plazme, protoka gasa i dužine izlaganja:
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje i formiran biofilm bakterije meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje i formiran biofilm bakterije *Streptococcus mutans*.
3. Ispitati uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na preživljavanje mezenhimalnih matičnih ćelija u zavisnosti od jačine plazme, protoka gasa i dužine izlaganja:
  - analizom citotoksičnog efekta na primarnim humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi.

4. Izvršiti izolaciju, kultivaciju i karakterizaciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma ekstrahovanih zuba (hPDL-MSK) analizom ekspresije hematopoetskih i mezenhimalnih marker proteina i određivanjem multipotentnog potencijala za diferencijaciju.
  
5. Ispitati uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na različite ćelijske funkcije hPDL-MSK u zavisnosti od jačine plazme, protoka gasa i dužine izlaganja:
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na vijabilnost i adhezivnost hPDL-MSK
  
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na migraciju hPDL-MSK
  
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na proliferaciju hPDL-MSK
  
  - analizom dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na diferencijaciju hPDL-MSK u osteogenu liniju.

### 3. MATERIJAL I METOD

#### 3.1. PLAZMA IGLA

Za ispitivanje dejstva NAP na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija i humane mezenhimalne matične ćelije korišćena je plazma igla koja je konstruisana u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za fiziku u Beogradu. Plazma igla predstavlja radiofrekventni kapacitivno spregnuti izvor plazme na atmosferskom pritisku koji radi u smeši helijuma i okolnog vazduha. Ona se sastoji 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), pojačavač (Barthel RFA-0.1/50-100 B00) i kolo za prilagođenje. Pomoću derivativnih strujnih i naponskih sonde mereni su signali struje i napona na osnovu kojih je preračunavana snaga plazme. Time se ostvarivao uvid u stanje plazme i pratila reproducibilnost tokom svih tretmana (**Slika 11**).

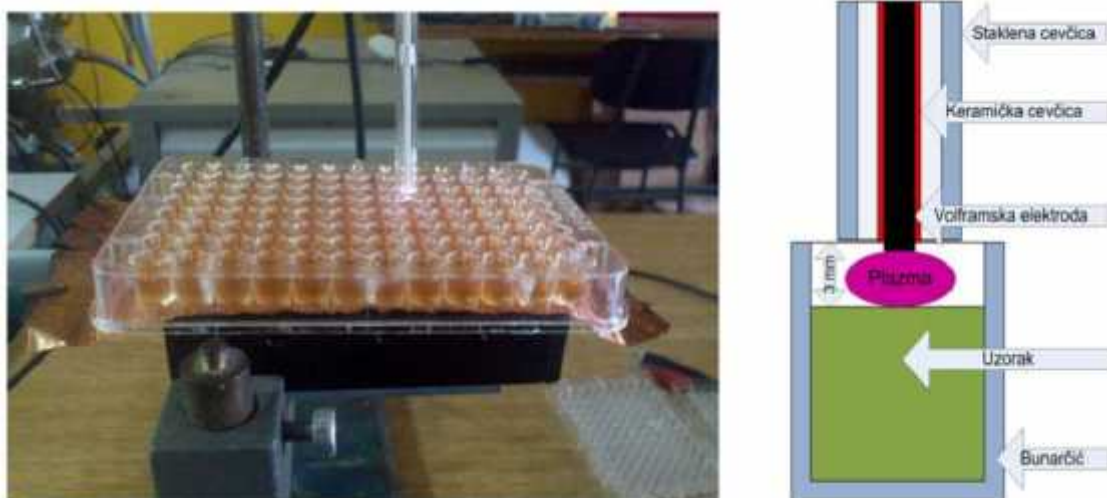


**Slika 11.** Šematski prikaz izvora niskotemperaturne atmosferske plazme

Kako bi bili sigurni da tokom tretmana temperatura uzorka ne prelazi  $42^{\circ}\text{C}$ , urađeno je posebno merenje temperature pomoću hromel-alumel termopara postavljenog na dno bunara mikrotitracione ploče, na rastojanju koje odgovara rastojanju uzorka od plazme. Merenja su vršena pri parametrima koji odgovaraju parametrima tretmana i nije primećen porast temperature za više od nekoliko stepeni u odnosu na sobnu temperaturu. Čak i na snagama većim od snaga korišćenih za tretmane i na dužim vremenima od vremena tretmana, temperatura ni u jednom trenutku nije prelazila  $40^{\circ}\text{C}$  (Lazović i sar. 2010).

### 3.2. USLOVI PLAZMA TRETMANA

Svi uzorci uključeni u ovo ispitivanje bili su izloženi dejstvu plazma igle u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za fiziku u Beogradu. Plazma igla postavljena je i fiksirana vertikalno dok su se uzorci postavljali 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 minimalno termičko dejstvo (**Slika 12**).



**Slika 12.** Plazma tretman

Za ispitivanje dejstva plazma igle na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija, kao i uticaja na vijabilnost i adheziju humanih mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz periferne krvi i periodoncijuma korišćene su tri različite snage plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W), dva protoka helijuma (0,5 slm, 1 slm, standardni litari u minuti) i različita vremena izlaganja definisana u konkretnim eksperimentalnim modelima.



Za ispitivanje uticaja plazme na migracioni potencijal, proliferaciju i diferencijaciju hPDL-MSK korišćena je plazma najveće snage (1,6 W), dva protoka He (0,5 slm, 1 slm) i dva vremena izlaganja (30 s, 60 s). Za svako pojedinačno ispitivanje korišćene su dve kontrole plazma tretmana. Prvu su činili uzorci koji nisu tretirani, a drugu uzorci koji su izloženi samo protoku helijuma, ali ne i plazmi.

### **3.3. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE**

Suspencije bakterija su pripremane u Laboratoriji za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. U radu su korišćeni referentni sojevi *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *E. faecalis* ATCC 29212. Referentni sojevi bakterija su čuvani na temperaturi od -76°C. Zamrznute bakterije aktivirane su kultivisanjem u dekstroznom bujonu (Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd, Srbija) tokom inkubacije od 20 h na 37°C, a zatim su subkultivisane na odgovarajućim čvrstim hranljivim podlogama. Za *S. aureus* i *E. faecalis* korišćen je krvni agar (Torlak), za *E. coli* endo agar (Torlak) a za *P. aeruginosa* Müller-Hinton agar (Torlak). Zasejane čvrste podloge inkubirane su tokom 20 h na 37°C. Početne koncentracije suspenzija bakterija određivane su spektrofotometrijski, tako da je optička gustina odgovarala vrednosti od  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml (CFU, colony forming units). Od ove početne suspenzije pravljena su razblaženja 1:10, 1:100 i 1:1000. Po 0,2 ml tako pripremljenih suspenzija, u opsegu koncentracija od  $1,5 \times 10^5$ -  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml, je razliveno u ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora. Nakon izlaganja bakterijskih suspenzija dejstvu NAP, po 0,05 ml suspenzije je uzeto iz svakog bunara i kultivisano na odgovarajućoj čvrstoj podlozi tokom 20 h na 37°C. Vijabilnost bakterija procenjena je na osnovu broja formiranih kolonija i opisivana arbitrarnim jedinicama od 0-6 (0 - bez porasta bakterija; 1 -  $\leq 50$  kolonija; 2 - 50-200 kolonija; 3 - 200-300 kolonija; 4 - 300-500 kolonija; 5 -  $\geq 500$  kolonija sa poljima konfluentnog rasta; 6 -konfluentan rast). Sva ispitivanja su ponovljena najmanje dva puta.

### 3.4. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM BAKTERIJA METICILIN REZISTENTNI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* I *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Bakterijski biofilmovi su pripremani na Odeljenju za bakteriologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. U radu je korišćen klinički soj MRSA i referentni soj *Streptococcus mutans* ATCC 25175. MRSA je izolovan iz hirurške rane i identifikovan pomoću BD Phoenix Automated Microbiology System (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, SAD). Za potvrdu identifikacije izvršena je molekularna detekcija *nuc* gena (Brakstad i sar. 1992), čije prisustvo dokazuje da je u pitanju vrsta *S. aureus*, dok je rezistencija na meticilin potvrđena detekcijom *mecA* gena (Kondo i sar. 2007). U pitanju je soj za koji je fenotipskim i genotipskim metodama dokazano da je snažan produktor biofilma (Ćirković, 2009). U svakom eksperimentu pripremane su po dve ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora u koje je razliveno po 180 µl odgovarajuće tečne podloge, moždano-srčani infuzioni bujon (BHI, brain-heart infusion; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Za MRSA je BHI podloga obogaćena sa 1%, a za *S. mutans* sa 2% saharoze. U svaki otvor je inokulisano po 20 µl pripremljene suspenzije bakterija. Bakterijske suspenzije su pripremane na sledeći način: nekoliko kolonija je suspendovano u fiziološkom rastvoru tako da zamućenost rastvora odgovara 0,5 McFarland standardu ( $\sim 10^8$  CFU/ml), što je određeno korišćenjem Densimat fotometra (bioMerieux, Charbonnieres les Brains, Francuska). Za ispitivanje uticaja NAP na biofilm MRSA korišćeni su inokulumi u opsegu  $10^4$ - $10^6$  CFU, dok je za ispitivanje uticaja NAP na biofilm *S. mutans* korišćen samo inokulum veličine od  $10^6$  CFU. Za ispitivanje efekta NAP na sprečavanje formiranja biofilma inokulisane ploče izlagane su dejstvu plazme 1 h nakon inokulacije, zatim inkubirane tokom 24 h na 37°C, nakon čega je vršena kvantifikacija biofilma. Da bi se ispitaio efekat NAP na formiran biofilm, inokulisane ploče su prvo inkubirane tokom 24 h na 37°C, zatim izložene dejstvu plazme, nakon čega je vršena kvantifikacija biofilma. Sva ispitivanja rađena su u triplikatu i ponovljena dva puta. Kvantifikacija biofilma je izvedena prema protokolu koji je opisao Stepanović sa saradnicima (2007). Sadržaj bunarića je ispražnjen i tri puta ispran sa po 300 µl fosfatom puferovanim fiziološkim rastvorom (PBS, phosphate buffered saline; PAA Laboratories, Pasching, Austrija). Na ovaj način odstranjene su sve ćelije koje nisu adherisale, a zadržane samo bakterijske ćelije adherisane u vidu biofilma.

Ploče su potom ostavljene da se suše preko noći, na sobnoj temperaturi, sa dnom okrenutim nagore. Zatim su adherisane bakterije fiksirane sa po 150  $\mu$ l metanola u toku 20 min, ostavljene preko noći, a zatim bojene sa 2% kristal violet bojom 15 min. Sadržaj bunarića je ispran a preostala boja rastvorena sa po 150  $\mu$ l 95% etanola 30 min. Rastvaranje boje omogućava indirektno merenje količine stvorenog biofilma. Optička gustina (OD, optical density) svakog bunarića merena je spektrofotometrom na 570 nm (Labsystems Multiskan PLUS, Finska). Za tumačenje rezultata bilo je potrebno definisati granične, „cut-off“, vrednosti (OD<sub>c</sub>) prema sledećoj formuli: OD<sub>c</sub>=srednja vrednost optičkih gustina (OD) negativne kontrole+3×SD negativnih kontrola. Produkcija biofilma je opisivana kvalitativno i kategorisana kao: 0 = nema biofilma (OD≤OD<sub>c</sub>); + = oskudan biofilm (OD<sub>c</sub><OD≤2×OD<sub>c</sub>); ++ = umereno razvijen biofilm (2×OD<sub>c</sub><OD≤4×OD<sub>c</sub>); +++ = jako razvijen biofilm (4×OD<sub>c</sub><OD). Za kvantitativnu analizu produkcije biofilma korišćene su srednje vrednosti OD.

### **3.5. ISPITIVANJE CITOTOKSI NOSTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME**

Po dobijanju dozvole etičkih komiteta Medicinskog fakulteta i Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, biološki materijal (krv, ekstrahovani umnjaci) je prikupljan uz saglasnost dobrovoljaca i pacijenata, obaveštenih o svrsi prikupljanja materijala za eksperimentalni rad.

Humane mezenhimalne matične ćelije su izolovane od mononuklearnih ćelija periferne krvi na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu gde je, shodno kriterijumima Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju, izvršena njihova karakterizacija (Trivanović i sar. 2013).

#### **3.5.1. MTT ogled**

Vijabilnost ćelija određivana je korišćenjem MTT ogleada, koji se zasniva na sposobnosti živih ćelija da preobrate rastvorljivi MTT u nerastvorljivi formazan u mitohondrijama. Sveže odlepljene hPB-MSC ( $1 \times 10^5$ /200 $\mu$ l/otvoru) su postavljene u triplikatima u ploče sa 24 otvora i kultivisane do postizanja 80-90% konfluentnosti, a zatim tretirane plazmom različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) pri protoku gasa He od 0,5 slm i tokom tri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s).

Nakon odgovarajućih tretmana ćelijama je dodavan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji 0,5 mg/ml. Ćelije su zatim inkubirane 3 h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. U mitohondrijama živih ćelija žuti MTT redukuje se u ljubičasti formazan nerastvorljiv u vodi, a nastali kristali formazana rastvarani su u 0,1 N HCl u izopropanolu. Nakon rastvaranja supernatant je iz svakog otvora ploče sa 24 otvora prebacivan u tri otvora ploče sa 96 mesta a zatim je optička gustina merena na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na 540 nm (Labsystems Multiskan PLUS, Finska). Vrednosti su prikazane indeksom preživljavanja koji predstavlja relativne vrednosti u odnosu na adekvatne kontrole (apsorbancija tretiranih/apsorbancija kontrolnih uzoraka).

### 3.5.2. Adhezioni test

Ćelije ( $1 \times 10^5$ /200 $\mu$ l/otvoru) su postavljene u triplikatu u ploče sa 24 otvora, kultivisane do postizanja 80-90% konfluentnosti a zatim su izložene delovanju plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) pri protoku gasa He od 0,5 slm i tokom tri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s). Posle tretmana, ćelije su isprane PBS-om i fiksirane hladnim metanolom 10 min. Adherentne ćelije su obojene 0,2% rastvorom kristal violet boje u PBS-u tokom 10 min. na sobnoj temperaturi i isprane pod mlazom vode. Boja je rastvorena u 33% sirćetnoj kiselini, supernatant je iz svakog otvora prebacivan u tri otvora ploče sa 96 mesta, a zatim je apsorpcija obojenog rastvora merena spektrofotometrom na 540 nm. Vrednosti su prikazane indeksom koji predstavlja relativne vrednosti u odnosu na adekvatne kontrole.

### 3.6. IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I KULTIVACIJA HUMANIH MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA IZ PERIODONCIJUMA

Humane mezenhimalne matične ćelije iz periodoncijuma (hPDL-MSK) su, prema dostupnim podacima iz literature, po prvi put izolovane u našoj zemlji. Ekstrakcija zdravih impaktiranih umnjaka iz ortodontskih razloga ili nefunkcionalnosti, vršena je na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Odmah nakon ekstrakcije je pažljivo, sterilnom kiretom, odvojen zaostali periodoncijum iz bifurkacije zuba, a zatim su dobijeni uzorci prebačeni u Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu u sterilnom medijumu. Medijum se sastojao od:

Dulbekovog modifikovanog Iglovog medijuma (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; PAA Laboratories, Pasching, Austrija) sa 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomocina (PAA Laboratories), obogaćenog 20% fetalnim goveđim serumom (FBS, fetal bovine serum; PAA Laboratories). U sterilnim uslovima uzorci periodoncijuma usitnjeni su skalpelom i prebačeni u plastičnu posudu za ćelijske kulture površine 25 cm<sup>2</sup> (T-25 flask, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka), sa 3 ml medijuma za kultivisanje obogaćenog 20% FBS-om. Kultivisani su na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO<sub>2</sub>. Medijum za kultivaciju (DMEM sa penicilinom, streptomycinom i 10% FBS-om) je menjan 2-3 puta nedeljno. Nakon 3-4 nedelje, kada je postignuta subkonfluentnost (80-90% površine dna posude pokriveno ćelijama) ćelije su isprane PBS-om, a zatim odlepljene inkubacijom 5 minuta na 37°C sa 0,05% tripsinom i 1 mM etilen-diamino tetraacetatom (trypsin/EDTA; PAA Laboratories) u PBS-u. Nakon ispiranja u medijumu sa 10% FBS-om, ćelije su izbrojane i dalje propagirane kultivacijom 5000 ćelija po cm<sup>2</sup> u flasku od 75 cm<sup>2</sup> do postizanja subkonfluentnosti i ponovnim pasažiranjem na isti način. Za eksperimente su korišćene ćelije posle najmanje 3 pasaže.

### 3.5.1. CFU-F test

CFU-F test je standardni test za određivanje broja i klonogenog potencijala stromalnih matičnih ćelija. hPDL-MSC su postavljene u plastične ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora, površine 9,5 cm<sup>2</sup>, u tri koncentracije (100, 500 i 1000 ćelija/otvoru) u medijumu za kultivaciju u duplikatu. Zatim su ćelije kultivisane 10 dana u medijumu za kultivaciju na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO<sub>2</sub>, a svaka 3 dana ćelijama je dodavan svež medijum. Nakon tog perioda ćelije su isprane PBS-om, fiksirane hladnim metanolom (Superlab, Beograd, Srbija) 5 minuta na sobnoj temperaturi i bojene 15 minuta sa 0,3% kristal violet bojom (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija). Ćelije su na kraju ispirane destilovanom vodom i preparati osušeni na vazduhu. Broj formiranih kolonija određivan je brojanjem pod inverznim mikroskopom na uveličanju 40×, pri čemu je kao jedna kolonija podrazumevana grupacija ćelija koja sadrži više od 50 ćelija. Eksperimenti su ponavljani 2 puta.

### 3.5.2. Proto na citometrija

Za utvrđivanje ekspresije markera *in vitro* propagiranih hPDL-MSC, pomoću metode protočne citometrijske analize ispitivana je ekspresija specifičnih mezenhimalnih i hematopoetskih linijskih markera. Čelije su odlepljene sa 1 mM EDTA, isprane hladnim PBS-om obogaćenim 0,5% goveđim serumskim albuminom (BSA, bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i  $2 \times 10^5$  ćelija je obeleženo (30 min. inkubacije u mraku na 4°C) monoklonalnim mišjim anti-humanim antitelima protiv sledećih antigena: CD34 (Hematopoietic Progenitor Cell Antigen; konjugovan fikoeritinom (PE, phycoerythin; Dako Cytomation, Glostrup, Danska), CD45 (uobičajeni leukocitni antigen; konjugovan fluorescein izotiocianatom (FITC); R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), CD105 (endoglin; konjugovan PE-om; Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), CD235a (glycophorinA; konjugovan PE-om; R&D Systems), CD90 (Thy-1/Thy-1.1; konjugovan PE-om; R&D Systems), CD44H (mezotelijalni marker; konjugovan PE-om; R&D Systems) i CD73 (ecto-5'-nucleotidasa; konjugovan PE-om; R&D Systems). Da bi se odredio nivo nespecifičnog vezivanja, korišćena su odgovarajuća izotipska kontrolna antitela konjugovana FITC-om, odnosno PE-om (R&D Systems). Protočna citometrija je rađena na CyFlow SL protočnom citometru (Partec, Münster, Nemačka), opremljenog laserom snage 20mW koji emituje svetlost talasne dužine 488 nm (plava). Citometar je kalibrisan pomoću kalibracionih kuglica od 3  $\mu\text{m}$  (Partec, Münster, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Rezultati su analizirani pomoću softvera Partec FlowMax 2,4 (Partec, Münster, Nemačka) i prikazani u vidu tačkastih dijagrama prednjeg i bočnog rasipanja i histograma fluorescencije. Histogram fluorescencije je definisan apsolutnim brojem registrovanih događaja na linearnoj skali ordinate i relativnim vrednostima inteziteta fluorescencije svakog pojedinačnog događaja izraženim brojevima kanala fluorescencije (0-1024) na logaritamskoj skali apscise. Procenat pozitivnih ćelija je određivan postavljanjem granične vrednosti fluorescencije na osnovu izotipske kontrole tako da su kao pozitivne brojane ćelije koje su imale intenzitet fluorescencije viši od 98% ćelija izotipske kontrole. Analizirano je najmanje 10000 ćelija po uzorku.

### 3.5.3. Indirektna imunofluorescencija

Za imunocitohemijsku analizu, hPDL-MSK ( $1 \times 10^4$ ) su postavljene na staklene ljušpice i kultivisane 24 h u medijumu za kultivaciju, a zatim fiksirane sa 4% formaldehidom u PBS-u. Za detekciju markera vimentina,  $\alpha$ -SMA i fibronektina ćelije su permeabilizovane sa 0,1% Triton X u PBS-u 5 min. Uzorci su zatim inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi sa primarnim antitelima protiv vimentina (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, SAD),  $\alpha$ -SMA (Sigma-Aldrich), fibronektina (Chemicon, Temecula, CA, SAD) i Stro-1 (R&D Systems), a nakon toga 1 h u mraku sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim FITC-om i 1  $\mu$ g/ml DAPI, bojom za jedarni materijal (Sigma-Aldrich). Uzorci su analizirani i fotografisani pomoću Axioskop 2 plus epi-fluorescentnog mikroskopa i AxioCam MRc5 kamere (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Nemačka).

### 3.5.4. Višelinijski potencijal za diferencijaciju humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma

Da bi se utvrdio potencijal za diferencijaciju hPDL-MSK u više mezenhimalnih linija, ćelije ( $1 \times 10^4/500 \mu$ l/otvoru) su kultivisane u medijumu za kultivaciju u pločama sa 24 otvora do postizanja subkonfluentnosti. Tada je osnovni medijum za kultivaciju zamenjen medijumima za indukciju specifičnog diferentovanja u cilju usmeravanja MSC ka stvaranju odgovarajućih ćelija različitih mezenhimalnih tkiva, dok su kontrolu činile ćelije kultivisane samo u osnovnom medijumu za kultivaciju.

Za osteogenu diferencijaciju, ćelije su kultivisane u DMEM-u sa 10% FBS-om, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml streptomicina, 10 nM deksametazonom (AppliChem, Darmstadt, Nemačka), 20  $\mu$ M 2-fosfat askorbinskom kiselinom (Sigma-Aldrich), i 10 mM  $\beta$ -glicerofosfatom (Sigma-Aldrich). Ćelije su inkubirane na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, a medijum je menjan tri puta nedeljno. Nakon 14 dana, osteogena diferencijacija je analizirana određivanjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) bojenjem sa 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat/nitro tetrazolium plavim (BCIP/NBT; Sigma-Aldrich). Ćelije su fotografisane korišćenjem svetlosnog mikroskopa sa digitalnom kamerom.

Za adipogenu diferencijaciju, subkonfluentne hPDL-MSC su kultivisane 3 nedelje u DMEM-u sa 10% FBS-om, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomocina, 100 µg/ml izobutil-metilksantinom (Sigma-Aldrich), 1 µM deksametazonom i 10 µg/ml insulina (Actrapid; Novovordisc, Bagsvaerd, Danska). Medijum je menjan tri puta nedeljno. Prisustvo intraćelijskih lipidnih kapi, kao indikatora adipogene diferencijacije, je potvrđeno bojenjem Oil Red O bojom (Merck Chemicals, Darmstadt, Nemačka) i fotografisano korišćenjem svetlosnog mikroskopa sa digitalnom kamerom.

Za indukovanje miogene diferencijacije, hPDL-MSC su kultivisane u DMEM-u sa 5% konjskim serumom (PAA Laboratories), 2% FBS-om, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomocina, 50 µM hidrokortizonom (Galenika, Beograd, Srbija) i 0,1 µM deksametazonom. Čelije su kultivisane 3 nedelje, a podloga je menjana 2-3 puta nedeljno. Da bi se procenila miogena diferencijacija, ćelije su fiksirane hladnim metanolom i obojene sa 0,3% kristal violet bojom. Prisustvo višejedarnih miotuba, koje ukazuju na miogenu diferencijaciju, je utvrđeno posmatranjem svetlosnim mikroskopom i fotografisano.

### **3.6. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA ELIJSKE FUNKCIJE MEZENHIMALNIH MATI NIH ELIJA IZ PERIODONCIJUMA**

#### **3.6.1. MTT ogled**

Sveže odlepljene hPDL-MSC ( $1 \times 10^4$ /200µl/otvoru) su postavljene u triplikatima u ploče sa 96 otvora i kultivisane do postizanja 80-90% konfluentnosti, a zatim tretirane plazmom različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) sa dva protoka He (0,5 slm, 1 slm) i tokom četiri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s).

Nakon odgovarajućih tretmana ćelijama je dodavan MTT, ćelije su zatim inkubirane 3h na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> nakon čega je optička gustina merena na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na 540 nm (Labsystems Multiskan PLUS, Finska). Vrednosti su prikazane indeksom preživljavanja koji predstavlja odnos apsorbancija tretiranih/apsorbanciju kontrolnih uzoraka.



### 3.6.2. Adhezioni test

Ćelije ( $1 \times 10^4 / 200 \mu\text{l}$ /otvoru) su postavljene u triplikatu u ploče sa 96 otvora, kultivisane do postizanja 80-90% konfluentnosti a zatim su izložene delovanju plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) sa dva protoka He (0,5 slm, 1 slm) i tokom četiri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s). Nakon tretmana ćelije su isprane PBS-om, fiksirane hladnim metanolom 10 min. a zatim adherentne ćelije bojene 0,2% rastvorom kristal violet boje u PBS-u 10 min, na sobnoj temperaturi. Boja je rastvorena u 33% sirćetnoj kiselini, a apsorpcija obojenog rastvora merena spektrofotometrom na 540 nm. Vrednosti su izražene indeksom adherentnosti koji predstavlja odnos apsorbancije tretiranih/apsorbanciju kontrolnih uzoraka.

### 3.6.3. Analiza elijske migracije „scratch“ testom

Migratorni potencijal hPDL-MSC analiziran je putem *in vitro* „scratch“ testa. Ćelije su postavljane u triplikatu u ploče sa 96 otvora u medijumu za kultivaciju i kultivisane do postizanja konfluentnosti. Kada su ćelije dostigle konfluentnost, vrhom nastavka za pipetu pravljen je ogrebotina u ćelijskom monosloju po dijametru svakog otvora i odlepljene ćelije isprane PBS-om. Nakon toga su ćelije izložene dejstvu plazme jačine 1,6 W sa dva protoka He (0,5 slm, 1 slm) tokom 30 s i 60 s ili samo gasu He, a zatim kultivisane 24 h. Ćelije su potom fiksirane ledenim metanolom i obojene 0,1% kristal violet bojom. Migracija ćelija u polje ogrebotine dokumentovana je na svetlosnom mikroskopu i kvantifikovana korišćenjem Tscratch programa (Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich, Švajcarska).

### 3.6.4. Test proliferacije

Da bi se ispitaio uticaj plazme na proliferaciju hPDL-MSC, ćelije su postavljene u ploče sa 96 otvora ( $5 \times 10^3 / 200 \mu\text{l}$ /otvoru) i kultivisane preko noći na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Zatim su ćelije izložene dejstvu plazme ili samo gasu He. Nekoliko sati nakon izlaganja (0. dan) kao i 2., 4., i 6. dana nakon tretmana, ćelije su odlepljene tripsinom sa EDTA i njihov broj određen bojenjem tripan plavim (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Vreme koje je potrebno da se udvostruči populacija ćelija (PDL, population

doubling time) je izračunato prema sledećoj formuli  $PDT=(T-T_0) \log_2/(\log N_t-\log N_0)$ , gde  $T_0$  predstavlja početno vreme ćelijske kulture,  $T$  završno, dok  $N_0$  i  $N_t$  predstavljaju broj ćelija na početku i završetku svake kulture.

### 3.6.5. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze

Aktivnost alkalne fosfataze u supernatantu kultura hPDL-MSK je merena korišćenjem komercijalnog kita (Behringwerke AG, Marburg, Nemačka). Ćelije su postavljene u ploče sa 96 otvora ( $5 \times 10^3/200\mu\text{l}$ /otvoru) i nakon postizanja 80-90% konfluentnosti izložene su dejstvu plazme. Nakon izlaganja plazmi, ćelije su inkubirane 10 dana u medijumu za indukciju osteogene diferencijacije. Aktivnost alkalne fosfataze u supernatantu kulture koji je prikupljen tokom poslednja tri dana, određena je merenjem spektrofotometrom na 405 nm apsorpcije p-nitrofenola, produkta reakcije alkalne fosfataze i supstrata p-nitrofenilfosfata. Da bi se prevazišao problem nejednakog broja ćelija po otvoru, vrednosti apsorpcija su normalizovane prema ukupnom iznosu ćelijskih proteina liziranih ćelija koji je određen Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, SAD).

### 3.7. STATISTIČKA ANALIZA

Na osnovu dobijenih rezultata formirana je baza podataka u programu Microsoft Excel. Primenjene su statističke metode deskriptivne i analitičke statistike. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su: apsolutni i relativni brojevi (n, %), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (SD, standardna devijacija i SEM, standardna greška).

Od analitičkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti. U okviru testova razlike, od parametrijskih testova korišćeni su t test i ANOVA sa Bonferroni i Dunnett testovima za naknadna poređenja, a od neparametrijskih Mann-Whitney U test.

Za analizu povezanosti korišćena je linearna regresiona analiza (jednostruka i višestruka). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički pomoću stubičastog i tačkastog dijagrama. Svi podaci su obrađeni u SPSS 15.0 (Chicago, Illinois, SAD) softverskom paketu. Sve p vrednosti manje od 0,05 uzete su kao vrednosti za odbacivanje nulte hipoteze.

## 4. REZULTATI

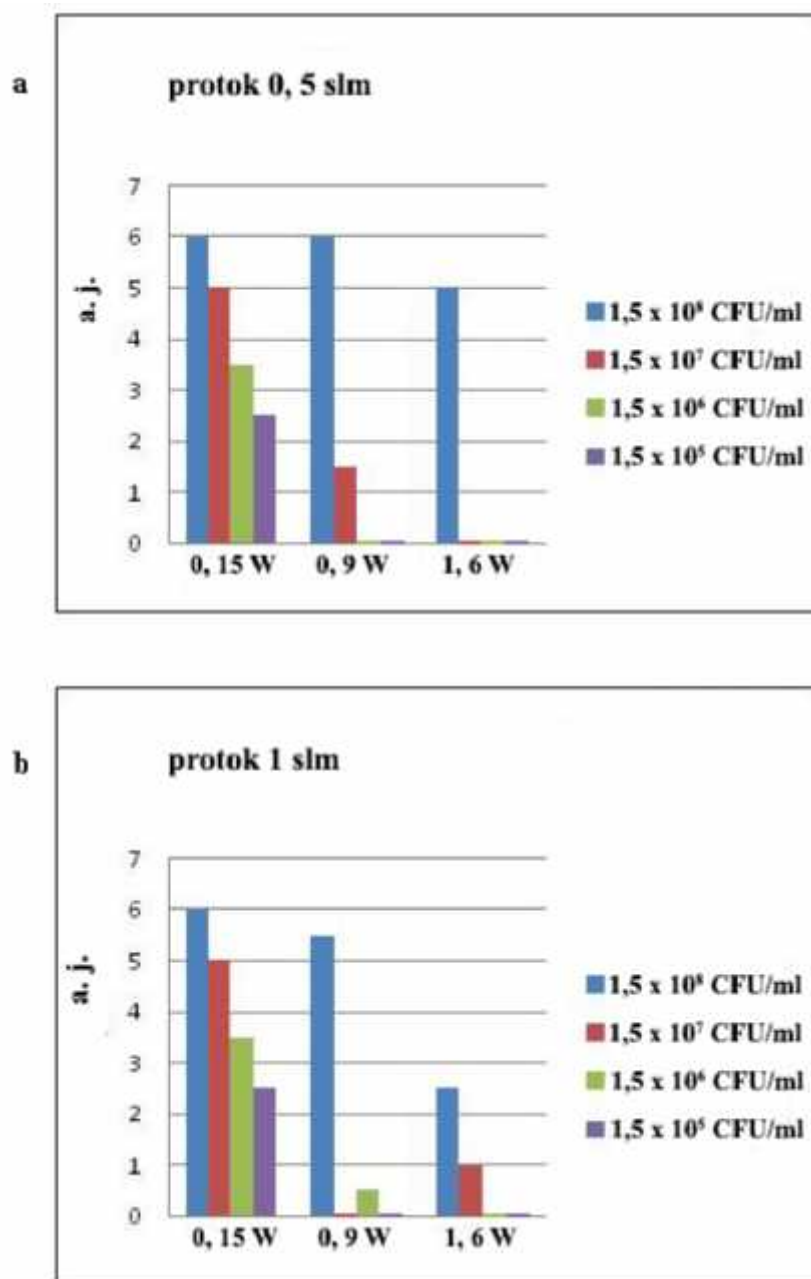
### 4.1. ISPITIVANJE DEJSTVA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE

Ispitivanje antibakterijskog dejstva neravnotežne atmosfere plazme stvorene modifikovanom plazma iglom u zavisnosti od radnih parametara, snage plazme, protoka gasa i vremena izlaganja, vršeno je na bakterije u suspenzijama različitih koncentracija. U istraživanju su korišćeni referentni sojevi Gram-negativnih bakterija *P. aeruginosa* i *E. coli* i Gram-pozitivnih *S. aureus* i *E. faecalis*. U svim eksperimentalnim uslovima je utvrđeno da gas He bez plazme ne utiče na vijabilnost bakterija.

#### 4.1.1. Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosfere plazme na Gram-negativne bakterije *P. aeruginosa* i *E. coli*

Analizom arbitrarnih jedinica utvrđeno je da su obe ispitivane Gram-negativne bakterije veoma osjetljive na dejstvo NAP. Sa povećanjem snage plazme i dužine ekspozicije, u oba protoka gasa He, broj formiranih kolonija ispitivanih Gram-negativnih bakterija se smanjivao, odnosno baktericidni efekat NAP je bio veći.

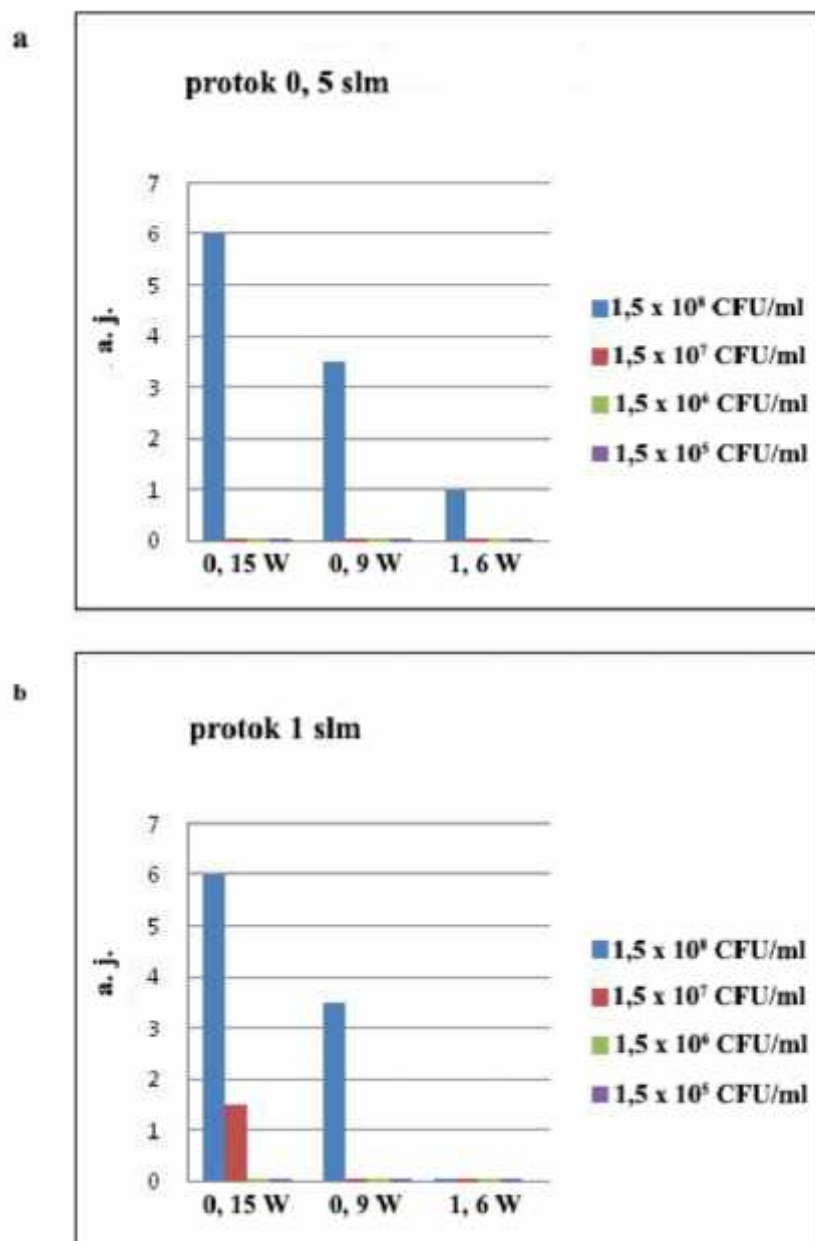
Plazme snage 0,9 W i 1,6 W u oba protoka gasa He i u sva tri vremena ekspozicije su veoma efikasno vršile inaktivaciju bakterije *P. aeruginosa* u suspenzijama najmanjih polaznih koncentracija ( $1,5 \times 10^6$  CFU/ml i  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml). Nakon izlaganja plazmi najveće snage (1,6 W) i najdužoj ekspoziciji (180 s) nije bilo porasta kolonija bakterija. Izuzetak su činile suspenzije bakterija sa najvećom početnom koncentracijom ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) (**Grafikon 1**).



**Grafikon 1.** Efekat NAP na porast bakterije *P. aeruginosa* u suspenzijama različite koncentracije u zavisnosti od snage plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W), pri protoku gasa He od 0,5 slm (a) i 1 slm (b) i pri najdužem vremenu izlaganja (180 s). Prikazane su srednje vrednosti arbitrarnih jedinica (a. j.) iz dva odvojena eksperimenta.

Analizom arbitrarnih jedinica dobijenih nakon izlaganja *E. coli* u suspenzijama različite koncentracije utvrđeno je da je ova bakterija izrazito osetljiva na dejstvo NAP. Nakon dejstva plazme na suspenzije najmanjih početnih koncentracija ( $1,5 \times 10^6$  CFU/ml,  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml), snagama 1,6 W i 0,9 W u oba protoka gasa He i sve tri dužine izlaganja, kao i pri dejstvu plazme snage 0,15 W, pri protoku od 1 slm i najdužem vremenu izlaganja, utvrđeno je da nije bilo preživelih bakterija. Potpunu inaktivaciju

bakterija u suspenzijama koncentracije  $1,5 \times 10^7$  CFU/ml vršila je plazma najveće jačine (1,6 W) tokom sva tri vremena izlaganja, kao i plazma jačine 0,9 W i najdužem vremenu izlaganja (180 s). U slučaju najveće početne koncentracije suspenzija ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) potpuno odsustvo porasta bakterijskih kolonija konstatovano je samo nakon izlaganja plazmi snage 1,6 W, pri protoku gasa He od 1 slm i najdužem vremenu ekspozicije. Na **Grafikonu 2** prikazani su rezultati arbitrarnih jedinica za najduže vreme izlaganja.



**Grafikon 2.** Efekat NAP na porast bakterije *E. coli* u suspenzijama različite koncentracije u zavisnosti od snage plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W), pri protoku gasa He od 0,5 slm (a) i 1 slm (b) i pri najdužem vremenu izlaganja (180 s). Prikazane su prosečne vrednosti arbitrarnih jedinica (a. j.) iz dva odvojena eksperimenta.

Višefaktorska regresiona analiza varijansi je korišćena da bi se izvršila evaluacija uticaja NAP na broj formiranih kolonija ispitivanih Gram-negativnih bakterija u zavisnosti od primenjene jačine plazme, dužine ekspozicije, protoka gasa i početne koncentracije suspenzije bakterija (**Tabela 2**). Utvrđeno je da se kao statistički značajni faktori delovanja NAP na obe vrste ispitivanih bakterija izdvajaju jačina plazme, dužina ekspozicije i polazna koncentracija bakterija.

**Tabela 2.** Multipla regresiona analiza evaluacije efekta NAP na *E. coli* i *P. aeruginosa* u zavisnosti od protoka gasa, primenjene jačine plazme, dužine ekspozicije i početne koncentracije suspenzije bakterija

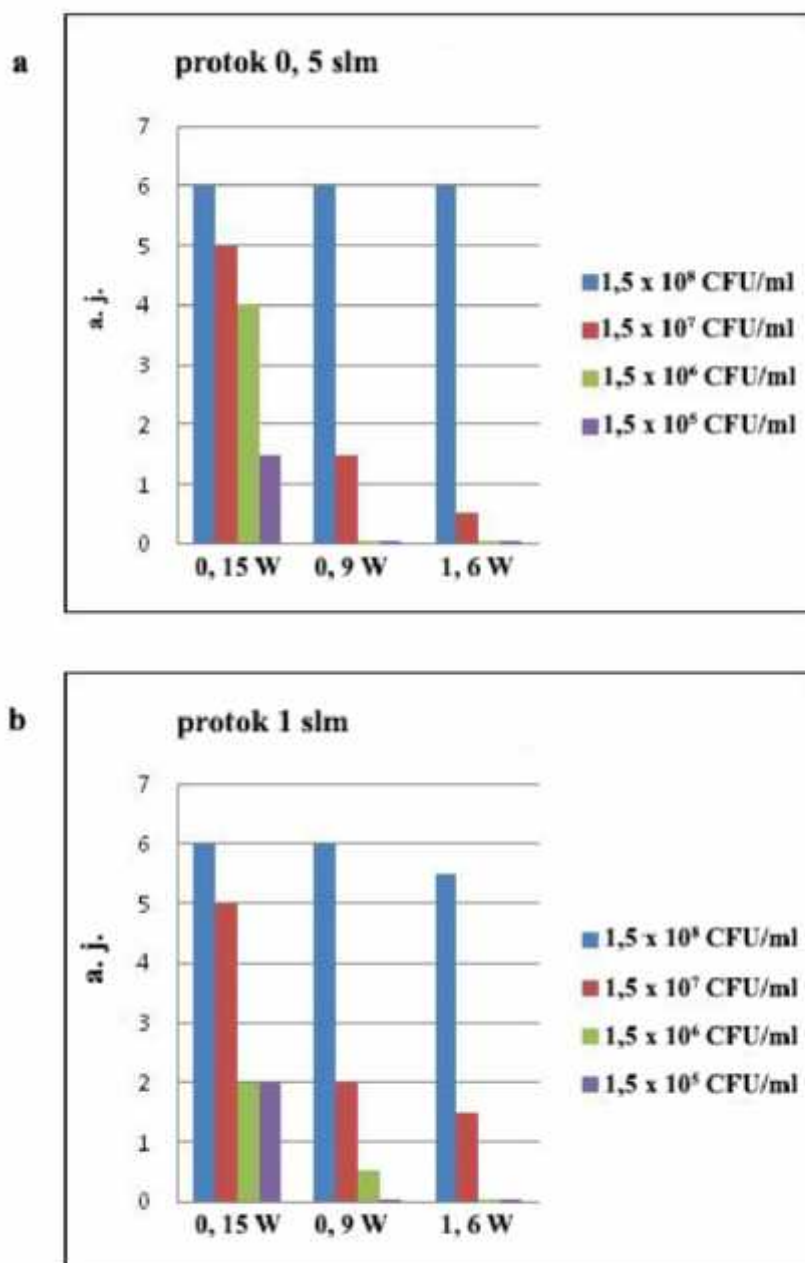
Posmatran faktor	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Linearna regresija			
	B (95% CI)	p vrednost	B (95% CI)	p vrednost
protok gasa	-0,083 (-0,844; 0,678)	0,829	-0,236 (-1,039; 0,567)	0,562
jačina plazme	1,208 (0,788; 1,629)	0,000	1,323 (0,882; 1,763)	0,000
polazna koncentracija	-1,294 (-1,559; -1,030)	0,000	-1,581 (-1,826; -1,335)	0,000
dužina ekspozicije	0,667 (0,214; 1,119)	0,004	0,469 (-0,017; 0,955)	0,050

#### 4.1.2. Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i *E. faecalis*

Analizom arbitrarnih jedinica dobijenih nakon izlaganja suspenzija ispitivanih Gram-pozitivnih bakterija utvrđeno je da su ove bakterije manje osetljive na dejstvo NAP od Gram-negativnih bakterija.

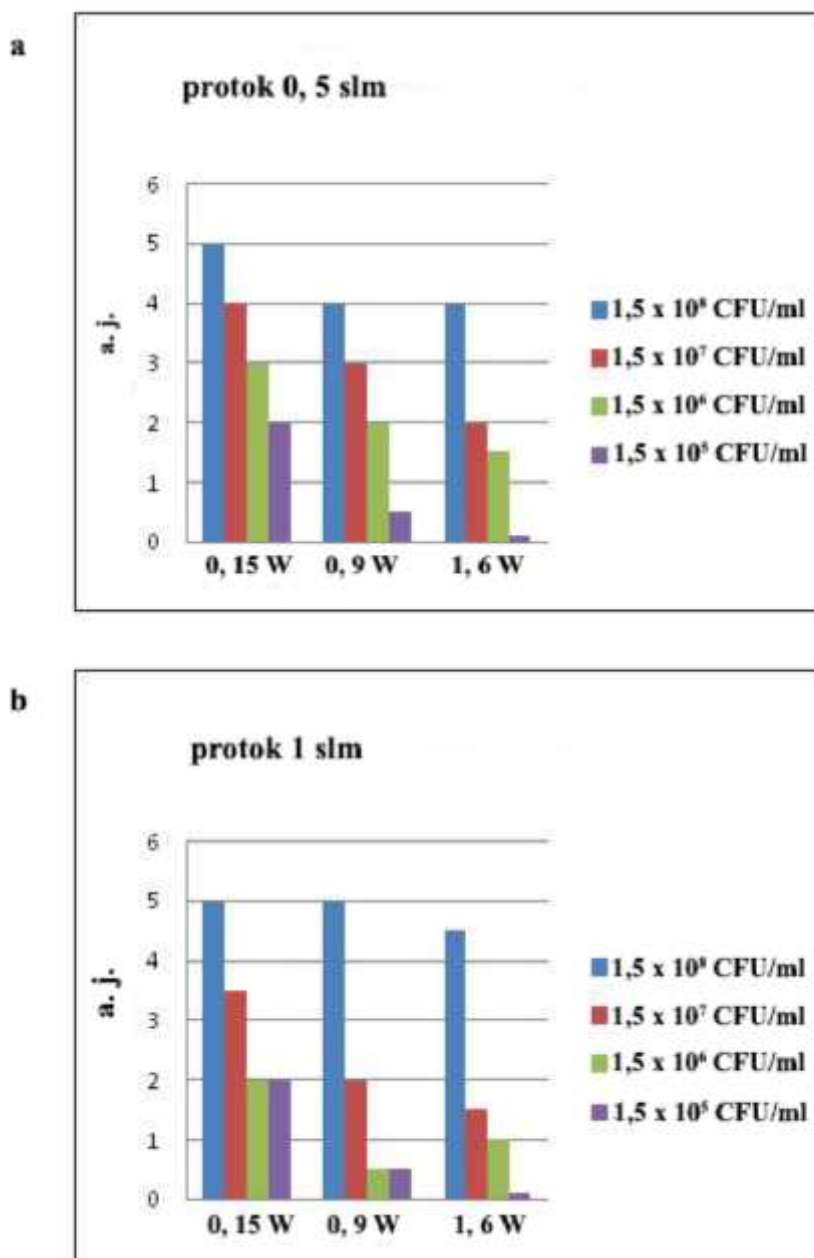
Kompletna inaktivacija *S. aureus* u suspenziji početne koncentracije  $1,5 \times 10^5$  CFU/ml konstatovana je nakon izlaganja plazme jačine 1,6 W u oba protoka gasa He i pri svim vremenima izlaganja kao i nakon dejstva plazme jačine 0,9 W i ekspoziciji od 120 s i 180 s. Nakon izlaganja plazmi suspenzija početne koncentracije  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml, utvrđeno je da plazme jačine 1,6 W i 0,9 W pri najdužoj ekspoziciji u oba protoka gasa

He vrše potpunu inaktivaciju bakterija, dok u slučaju većih polaznih koncentracija plazma nije bila efikasna. Na **Grafikonu 3** pokazan je porast bakterijskih kolonija *S. aureus* izraženim u arbitrarnim jedinicama, nakon izlaganja NAP pri najdužoj ekspoziciji.



**Grafikon 3.** Efekat NAP na porast bakterije *S. aureus* u suspenzijama različite koncentracije u zavisnosti od snage plazme, pri protoku gasa He od 0,5 slm (a) i 1 slm (b) i pri najdužem vremenu izlaganja. Prikazane su prosečne vrednosti arbitrarnih jedinica (a. j.) iz dva odvojena eksperimenta.

Analizom arbitrarnih jedinica je utvrđeno da je *E. faecalis* bila najmanje osetljiva na dejstvo NAP od svih ispitivanih. Potpuno odsustvo porasta bakterijskih kolonija konstatovano je samo u slučaju delovanja plazme najveće snage (1,6 W) u oba protoka gasa He i pri najdužem vremenu izlaganja na suspenzije najmanje početne koncentracije ( $1,5 \times 10^5$  CFU/ml) (**Grafikon 4**).



**Grafikon 4.** Efekat NAP na porast bakterije *E. faecalis* u suspenzijama različite koncentracije u zavisnosti od snage plazme, pri protoku gasa He od 0,5 slm (a) i 1 slm (b) i pri najdužem vremenu izlaganja. Prikazane su prosečne vrednosti arbitrarnih jedinica (a. j.) iz dva odvojena eksperimenta.



Multiplom regresionom analizom utvrđeno je da se kao statistički značajni faktori od kojih zavisi broj formiranih kolonija ispitivanih Gram-pozitivnih bakterija nakon izlaganja plazmi izdvajaju jačina plazme i polazna koncentracija suspenzije (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Multipla regresiona analiza evaluacije efekta NAP na *S. aureus* i *E. faecalis* u zavisnosti od protoka gasa, primenjene jačine plazme, dužine ekspozicije i početne koncentracije suspenzije bakterija

Posmatran faktor	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	Linearna regresija			
	B (95% CI)	p vrednost	B (95% CI)	p vrednost
protok gasa	-0,292 (-1,077; 0,494)	0,464	-0,403 (-0,949; 0,143)	0,147
jačina plazme	0,990 (0,536; 1,443)	0,000	0,687 (0,371; 1,004)	0,000
polazna koncentracija	-1,708 (-1,917; -1,499)	0,000	-1,247 (-1,380; -1,114)	0,000
dužina ekspozicije	0,406 (-0,071; 0,884)	0,095	0,229 (-0,105; 0,564)	0,178

#### 4.2. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM METICILIN REZISTENTNOG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Tokom ovog istraživanja ispitivan je uticaj NAP kako na formiranje, tako i na formiran biofilm MRSA inokuluma  $10^4$ - $10^6$  CFU, pri čemu su korišćene plazme različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W), dva protoka gasa He (0,5 slm i 1 slm) i različita vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s). U svim eksperimentalnim uslovima je utvrđeno da samo gas He ne utiče na formiranje i formirani biofilm.

#### 4.2.1. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje biofilma MRSA

Kvantifikacijom biofilma konstatovano je da, nakon izlaganja najmanjeg inokuluma ( $10^4$  CFU) NAP u oba protoka gasa He nije došlo do formiranja biofilma u uzorcima koji su bili izloženi plazmi jačine 0,9 W i pri najdužoj ekspoziciji (120 s), dok je plazma najveće jačine (1,6 W) delovala inhibitorno i pri ekspoziciji od 30 s, 60 s i 120 s (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Produkcija biofilma MRSA inokuluma  $10^4$  CFU nakon plazma tretmana

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Produkcija biofilma	
		protok 0,5 slm	protok 1 slm
0,15	10	++	++
	30	++	+
	60	+	+
	120	++	+
0,9	10	++	+
	30	+	+
	60	+	+
	120	0	0
1,6	10	+	+
	30	0	0
	60	0	0
	120	+	0

0=nema biofilma; +=oskudan biofilm; ++=umereno razvijen biofilm; +++=jako razvijen biofilm

S obzirom da je u istraživanju bilo više od dve grupe uzoraka, primenom analize varijansi (ANOVA) pokazano je da se srednje vrednosti optičkih gustina ispitivanih grupa uzoraka statistički značajno razlikuju u zavisnosti od vremena izlaganja za sve tri ispitivane jačine plazmi, u slučaju protoka gasa He od 1 slm. Pri protoku od 0,5 slm značajnost je utvrđena za jačine plazme od 0,9 W i 1,6 W (**Tabela 5**).

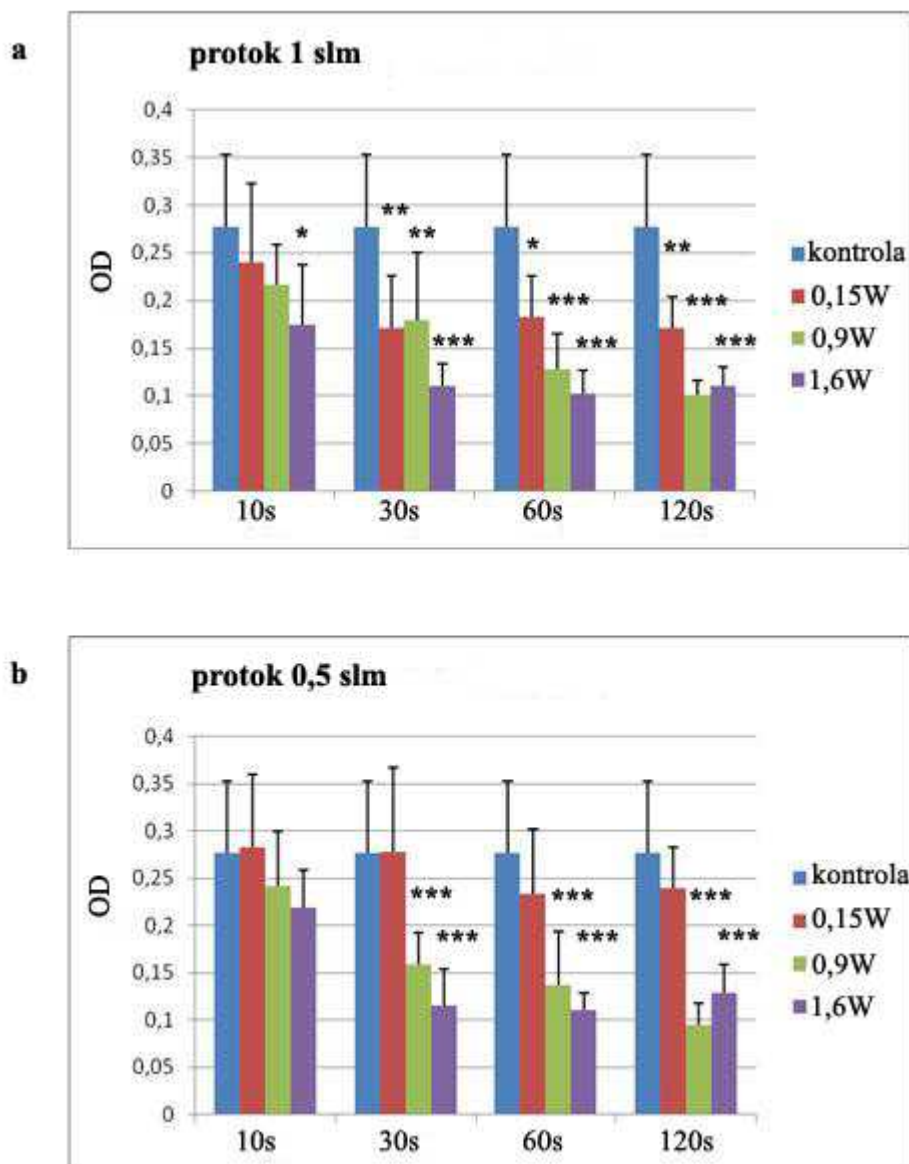
**Tabela 5.** Poređenje srednjih vrednosti optičkih gustina (OD) ispitivanih grupa uzoraka

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Protok 0,5 slm		Protok 1 slm	
		Srednja vrednost OD±SD	ANOVA	Srednja vrednost OD±SD	ANOVA
0,15	kontrola	0,277 ± 0,076		0,277 ± 0,076	
	10	0,283 ± 0,077		0,240 ± 0,083	
	30	0,278 ± 0,090		0,171 ± 0,056	
	60	0,236 ± 0,068	F=0,702	0,183 ± 0,044	F=5,416
	120	0,237 ± 0,044	p=0,596	0,171 ± 0,033	p= <b>0,002</b>
	Total	0,266 ± 0,073		0,228 ± 0,079	
0,9	kontrola	0,277 ± 0,076		0,277 ± 0,076	
	10	0,241 ± 0,058		0,217 ± 0,041	
	30	0,159 ± 0,033		0,180 ± 0,071	
	60	0,137 ± 0,056	F=14,19	0,128 ± 0,037	F=13,138
	120	0,095 ± 0,022	p= <b>0,000</b>	0,101 ± 0,015	p= <b>0,000</b>
	Total	0,209 ± 0,093		0,208 ± 0,091	
1,6	kontrola	0,277 ± 0,076		0,277 ± 0,076	
	10	0,220 ± 0,040		0,174 ± 0,063	
	30	0,117 ± 0,039		0,110 ± 0,023	
	60	0,110 ± 0,019	F=15,93	0,103 ± 0,024	F=18,203
	120	0,129 ± 0,030	p= <b>0,000</b>	0,110 ± 0,020	p= <b>0,000</b>
	Total	0,205 ± 0,092		0,192 ± 0,097	

Naknadnom statističkom analizom, Dunnett-ovim testom, poređenjem srednjih vrednosti optičkih gustina uzoraka koji su bili izloženi plazmi i netretiranih, kontrolnih, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u produkciji biofilma u uzorcima koji su bili izloženi plazmi pri protoku gasa He od 1 slm, u svim eksperimentalnim uslovima, osim u

slučaju jačine plazme od 0,9 W i 0,15 W i najkraćem vremenu izlaganja (**Grafikon 5a**).

Pri protoku gasa od 0,5 slm, značajna razlika u produkciji biofilma je utvrđena za plazme jačine 0,9 W i 1,6 W pri vremenima od 30 s, 60 s i 120 s (**Grafikon 5b**).



**Grafikon 5.** Efekat NAP na formiranje biofilma MRSA ( $10^4$  CFU) u zavisnosti od različite primenjene jačine plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) i dužine ekspozicije (10 s, 30 s, 60 s, 120 s) pri protoku gasa He od a) 1 slm b) 0,5 slm. Kontrolnu grupu su činile ćelije koje nisu izložene dejstvu plazme. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa kontrolama (Dunnett test).

Delovanjem plazme na inokulum MRSA veličine  $10^5$ CFU, nakon kvantifikacije biofilma utvrđeno je da biofilm nije formiran u uzorcima koji su bili izloženi plazmi jačine 0,9 W i najdužoj ekspoziciji, kao i jačini 1,6 W i vremenima izlaganja od 60 s i 120 s u oba protoka gasa He (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Produkcija biofilma MRSA inokuluma  $10^5$  CFU nakon plazma tretmana

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Produkcija biofilma	
		protok 0,5 slm	protok 1 slm
0,15	10	++	++
	30	++	++
	60	++	+
	120	+	+
0,9	10	++	++
	30	+	+
	60	+	+
	120	0	0
1,6	10	+	+
	30	+	+
	60	0	0
	120	0	0

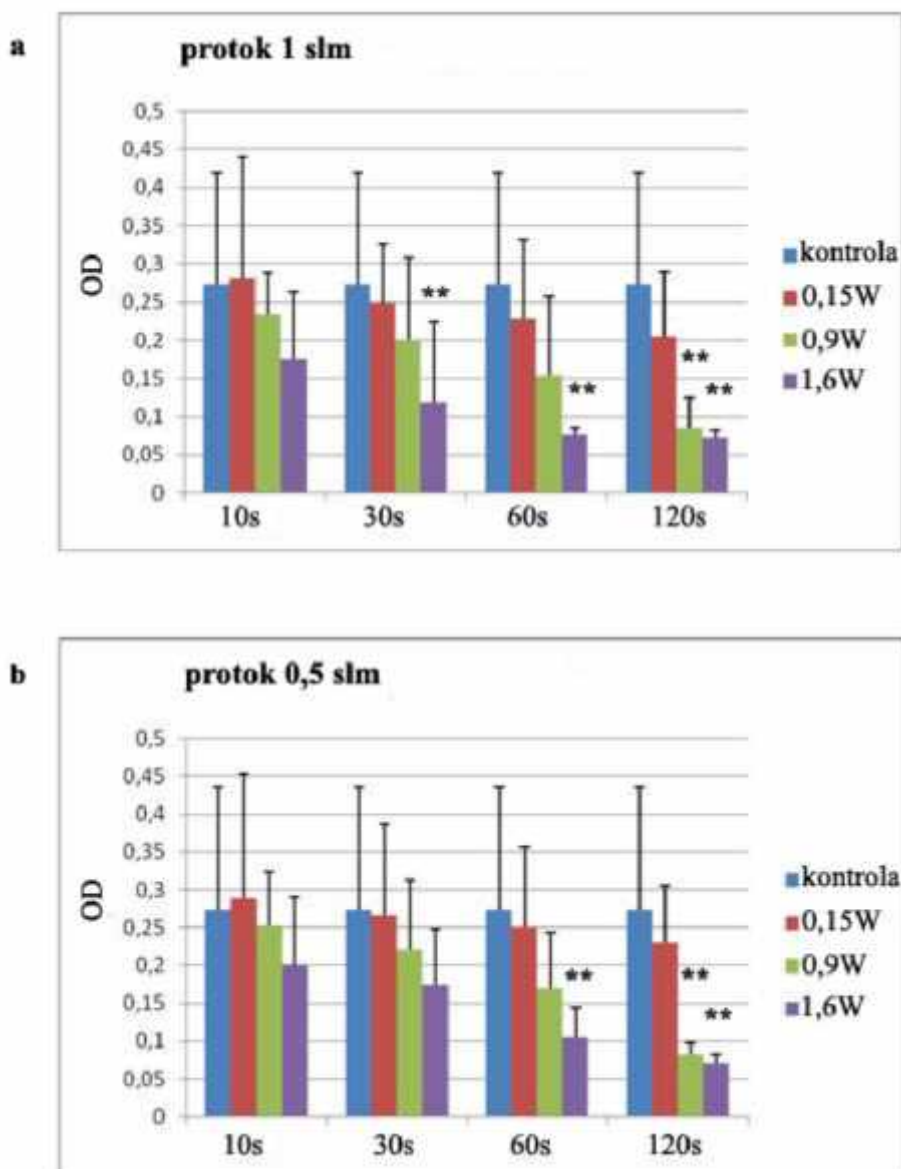
0=nema biofilma; +=oskudan biofilm; ++=umereno razvijen biofilm; +++=jako razvijen biofilm

ANOVA test je pokazao da se u oba protoka gasa He srednje vrednosti optičkih gustina statistički značajno razlikuju u zavisnosti od vremena izlaganja za plazme jačine 0,9 W i 1,6 W (Tabela 7).

**Tabela 7.** Poređenje srednjih vrednosti optičkih gustina (OD) ispitivanih grupa uzoraka

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Protok 0,5 slm		Protok 1 slm	
		Srednja vrednost OD±SD	ANOVA	Srednja vrednost OD±SD	ANOVA
0,15	kontrola	0,274 ± 0,146		0,274 ± 0,146	
	10	0,289 ± 0,164		0,280 ± 0,160	
	30	0,266 ± 0,121		0,249 ± 0,077	
	60	0,251 ± 0,105	F=0,190	0,228 ± 0,104	F=0,442
	120	0,230 ± 0,076	p=0,942	0,204 ± 0,085	p=0,777
	Total	0,264 ± 0,124		0,252 ± 0,121	
0,9	kontrola	0,274 ± 0,146		0,274 ± 0,146	
	10	0,252 ± 0,071		0,234 ± 0,055	
	30	0,220 ± 0,092		0,201 ± 0,107	
	60	0,170 ± 0,073	F=3,947	0,155 ± 0,102	F=3,453
	120	0,082 ± 0,015	p= <b>0,011</b>	0,086 ± 0,040	p= <b>0,019</b>
	Total	0,212 ± 0,119		0,204 ± 0,123	
1,6	kontrola	0,274 ± 0,146		0,274 ± 0,146	
	10	0,200 ± 0,089		0,176 ± 0,088	
	30	0,174 ± 0,074		0,120 ± 0,104	
	60	0,105 ± 0,039	F=5,408	0,077 ± 0,008	F=6,009
	120	0,070 ± 0,012	p= <b>0,002</b>	0,072 ± 0,010	p= <b>0,001</b>
	Total	0,183 ± 0,122		0,165 ± 0,129	

Upoređivanjem prosečnih vrednosti optičkih gustina tretiranih i netretiranih, kontrolnih uzoraka, primenom Dunnett-ovog testa, utvrđeno je da postoji značajna razlika u produkciji biofilma kod uzoraka koji su bili izloženi plazmi jačine 0,9 W tokom 120 s i jačini 1,6 W tokom 60 s i 120 s, u oba protoka gasa He, a u protoku gasa od 1 slm i u slučaju delovanja najjače plazme tokom 30 s (**Grafikon 6**).



**Grafikon 6.** Efekat NAP na formiranje biofilma MRSA ( $10^5$  CFU) u zavisnosti od različite primenjene jačine plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) i dužine ekspozicije (10 s, 30 s, 60 s, 120 s) pri protoku gasa He od a) 1 slm b) 0,5 slm. Kontrolnu grupu su činile ćelije koje nisu izložene dejstvu plazme. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta. \*\*  $p < 0,01$  u poređenju sa kontrolama (Dunnett test).

Kvantifikacijom biofilma najvećeg inokuluma ( $10^6$  CFU) je utvrđeno da se nakon izlaganja NAP biofilm nije formirao samo u uzorcima koji su bili izloženi najjačoj plazmi (1,6 W) i najdužem vremenu izlaganja (120s) pri protoku gasa He od 1 slm (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Produkcija biofilma MRSA inokuluma  $10^6$  CFU nakon plazma tretmana

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Produkcija biofilma	
		protok 0,5 slm	protok 1 slm
0,15	10	++	++
	30	++	++
	60	++	+
	120	+	+
0,9	10	++	++
	30	++	+
	60	+	+
	120	+	+
1,6	10	+	+
	30	+	+
	60	+	+
	120	+	0

0=nema biofilma; +=oskudan biofilm; ++=umereno razvijen biofilm; +++=jako razvijen biofilm

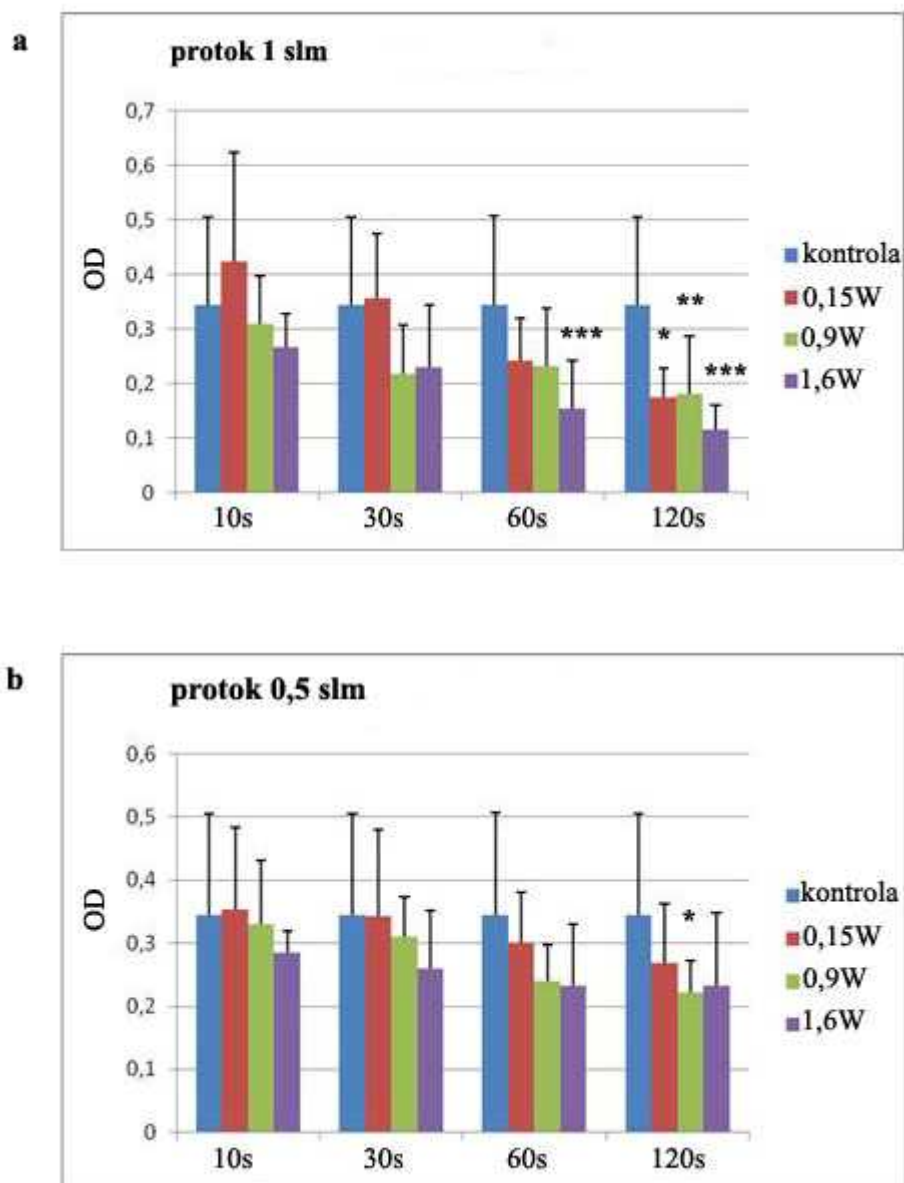
Analiza varijansi (ANOVA) je pokazala da postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima optičkih gustina između posmatranih grupa u sve tri jačine plazme pri protoku gasa od 1 slm. Za protok gasa od 0,5 slm, značajna razlika u prosečnim vrednostima optičkih gustina uzoraka u zavisnosti od primenjenog vremena izlaganja utvrđena je samo za plazmu jačine 0,9 W (**Tabela 9**).



**Tabela 9.** Poređenje srednjih vrednosti optičkih gustina (OD) ispitivanih grupa uzoraka

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Protok 0,5 slm		Protok 1 slm	
		Srednja vrednost OD±SD	ANOVA	Srednja vrednost OD±SD	ANOVA
0,15	kontrola	0,344 ± 0,162		0,344 ± 0,162	
	10	0,354 ± 0,131		0,424 ± 0,199	
	30	0,343 ± 0,137		0,356 ± 0,120	
	60	0,300 ± 0,081	F=0,726	0,243 ± 0,077	F=4,682
	120	0,269 ± 0,093	p=0,578	0,174 ± 0,055	p= <b>0,003</b>
	Total	0,326 ± 0,131		0,314 ± 0,157	
0,9	kontrola	0,344 ± 0,162		0,344 ± 0,162	
	10	0,331 ± 0,101		0,309 ± 0,089	
	30	0,310 ± 0,064		0,218 ± 0,089	
	60	0,241 ± 0,056	F=2,660	0,231 ± 0,107	F=3,582
	120	0,221 ± 0,051	p= <b>0,044</b>	0,182 ± 0,104	p= <b>0,012</b>
	Total	0,298 ± 0,118		0,271 ± 0,135	
1,6	kontrola	0,344 ± 0,162		0,344 ± 0,162	
	10	0,285 ± 0,035		0,267 ± 0,060	
	30	0,260 ± 0,092		0,229 ± 0,115	
	60	0,232 ± 0,099	F=2,048	0,155 ± 0,087	F=7,568
	120	0,233 ± 0,115	p=0,102	0,116 ± 0,045	p= <b>0,000</b>
	Total	0,283 ± 0,125		0,242 ± 0,142	

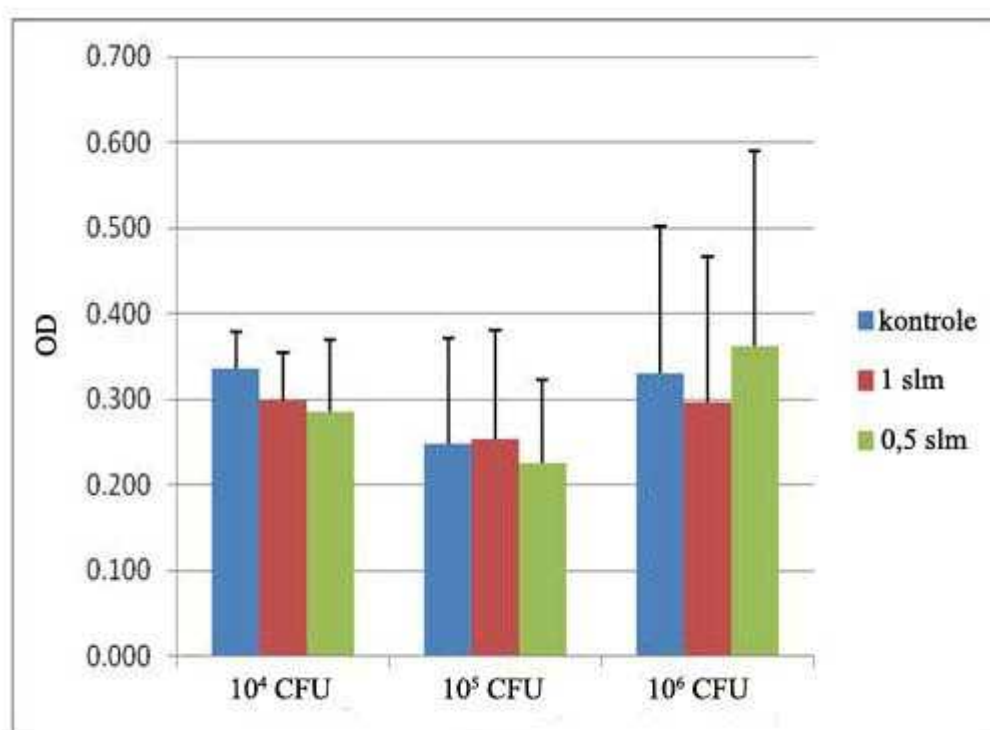
Primenom Dunnett-ovog testa utvrđeno je da postoji značajna razlika u količini stvorenog biofilma kod uzoraka koji su bili izloženi plazmi jačine 0,15 W i 0,9 W tokom 120 s i jačini 1,6 W tokom 60 s i 120 s pri protoku gasa od 1 slm, kada se uporede sa kontrolnim, netretiranim uzorcima (**Grafikon 7a**). Pri protoku gasa od 0,5 slm, značajna razlika u produkciji biofilma nađena je samo kod onih uzoraka koji su bili izloženi plazmi jačine 0,9 W i najdužem vremenu izlaganja (**Grafikon 7 b**).



**Grafikon 7.** Efekat NAP na formiranje biofilma MRSA ( $10^6$  CFU) u zavisnosti od različite primenjene jačine plazme i dužine ekspozicije, pri protoku gasa He od a) 1 slm b) 0,5 slm. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa kontrolama (Dunnett test).

#### 4.2.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formirani biofilm MRSA

Ovim istraživanjem je utvrđeno da, pod eksperimentalnim uslovima koji su korišćeni, NAP nije uticala značajno na formirani biofilm MRSA, bez obzira na veličinu inokuluma. Nije nađena statistički značajna razlika u količini stvorenog biofilma između kontrolnih i tretiranih uzoraka, čak ni u slučaju uzoraka koji su bili izloženi plazmi najveće jačine (1,6 W) tokom najdužeg vremena izlaganja (120 s) (**Grafikon 8**).



**Grafikon 8.** Efekat NAP na formiran biofilm MRSA tri različita inokuluma ( $10^4$  CFU,  $10^5$  CFU,  $10^6$  CFU) pri jačini plazme od 1,6W i dužini ekspozicije od 120s u oba protoka gasa He. Kontrolnu grupu su činili uzorci koji nisu bili izloženi dejstvu plazme. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta.

### 4.3. ISPITIVANJE DEJSTVA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA FORMIRANJE I FORMIRANI BIOFILM *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Za ispitivanje uticaja NAP na formiranje i formirani biofilm *S. mutans* korišćeni su isti eksperimentalni uslovi koji su korišćeni za ispitivanje uticaja na biofilm MRSA.

Kvantifikacijom biofilma *S. mutans* inokuluma  $10^6$  CFU konstatovano je da se biofilm nije formirao samo u onim uzorcima koji su bili izloženi plazmi najveće jačine (1,6 W) tokom 60 s i 120 s pri protoku gasa He od 1 slm (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Produkcija biofilma bakterije *S. mutans* inokuluma  $10^6$  CFU nakon plazma tretmana

Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Produkcija biofilma	
		protok 0,5 slm	protok 1 slm
0,15	10	+++	+++
	30	+++	+++
	60	+++	+++
	120	+++	+++
0,9	10	+++	+++
	30	+++	++
	60	+++	++
	120	++	+
1,6	10	+++	++
	30	++	++
	60	++	0
	120	+	0

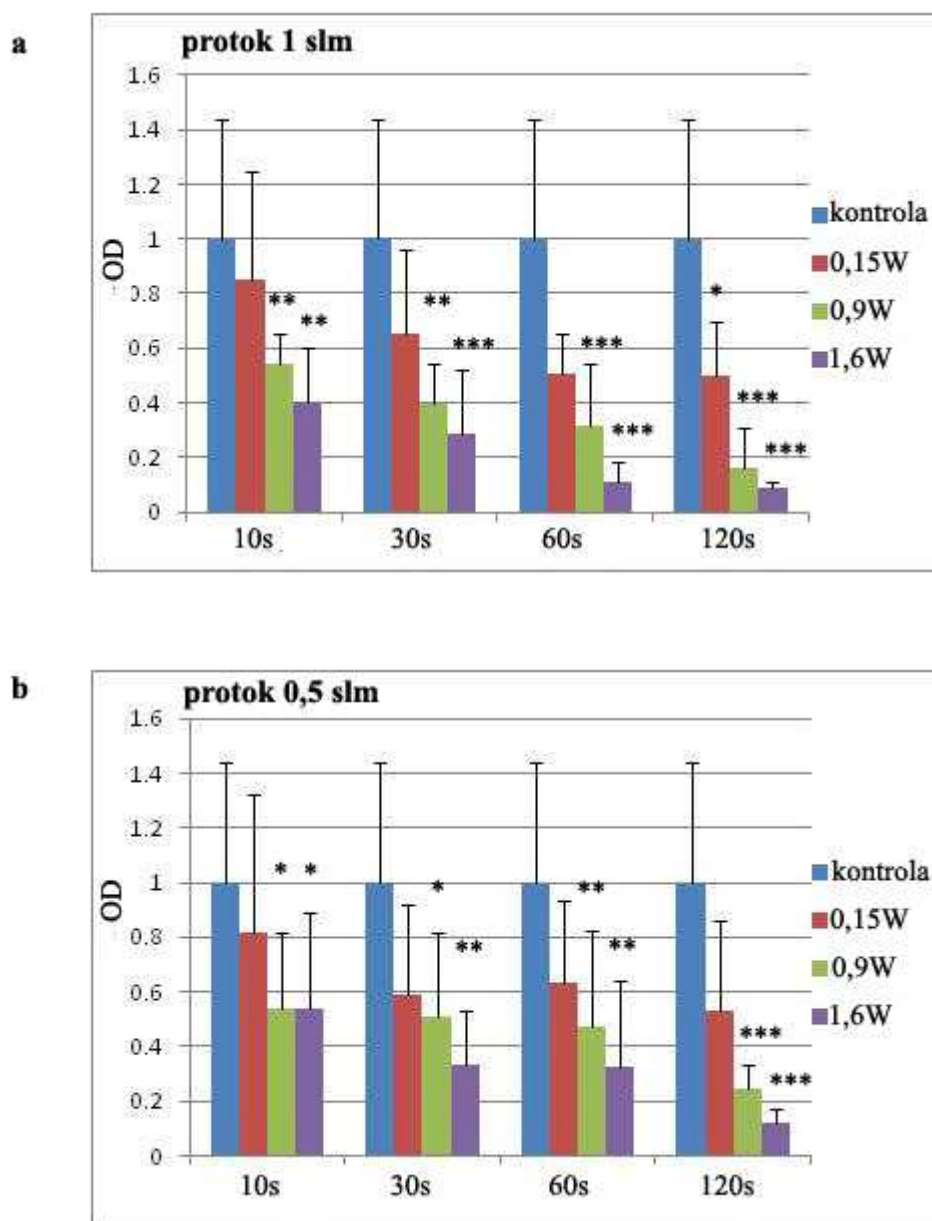
0=nema biofilma; +=oskudan biofilm; ++=umereno razvijen biofilm; +++=jako razvijen biofilm

Analiza varijansi je pokazala da postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima optičkih gustina u zavisnosti od vremena izlaganja za sve tri jačine plazme u slučaju protoka gasa od 1 slm. Za protok gasa od 0,5 slm značajna razlika je utvrđena za jačine 0,9 W i 1,6 W (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Poređenje srednjih vrednosti optičkih gustina (OD) ispitivanih grupa uzoraka

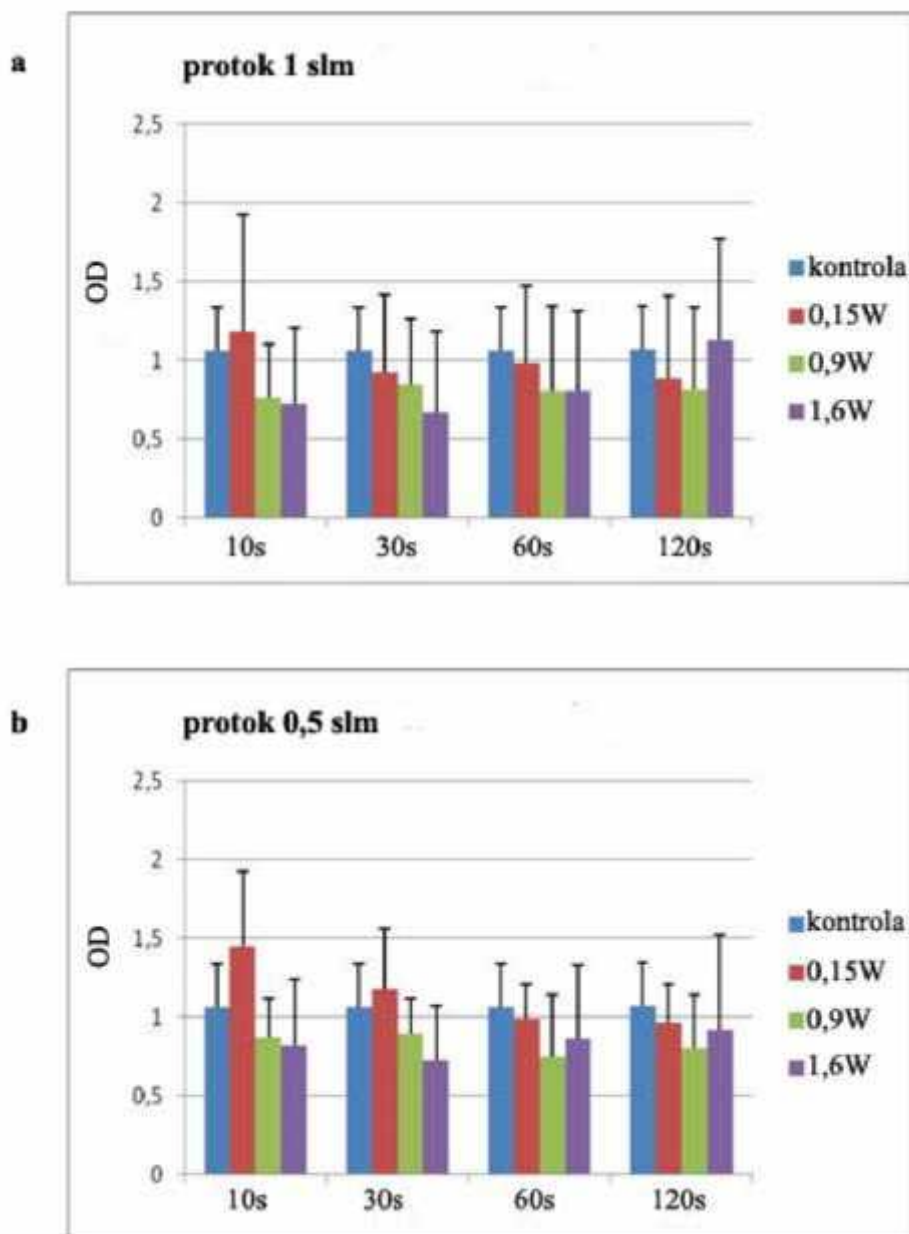
Jačina plazme (W)	Dužina ekspozicije (s)	Protok 0,5 slm		Protok 1 slm	
		Srednja vrednost OD $\pm$ SD	ANOVA	Srednja vrednost OD $\pm$ SD	ANOVA
0,15	kontrola	1,001 $\pm$ 0,436		1,001 $\pm$ 0,436	
	10	0,815 $\pm$ 0,508		0,854 $\pm$ 0,393	
	30	0,592 $\pm$ 0,325		0,654 $\pm$ 0,309	
	60	0,630 $\pm$ 0,304	F=2,055	0,505 $\pm$ 0,146	F=3,450
	120	0,529 $\pm$ 0,334	p=0,111	0,496 $\pm$ 0,198	p= <b>0,019</b>
	Total	0,761 $\pm$ 0,422		0,752 $\pm$ 0,388	
0,9	kontrola	1,001 $\pm$ 0,436		1,001 $\pm$ 0,436	
	10	0,540 $\pm$ 0,276		0,544 $\pm$ 0,105	
	30	0,512 $\pm$ 0,308		0,399 $\pm$ 0,147	
	60	0,472 $\pm$ 0,352	F=6,044	0,317 $\pm$ 0,225	F=11,216
	120	0,248 $\pm$ 0,082	p= <b>0,001</b>	0,164 $\pm$ 0,143	p= <b>0,000</b>
	Total	0,629 $\pm$ 0,428		0,571 $\pm$ 0,427	
1,6	kontrola	1,001 $\pm$ 0,436		1,001 $\pm$ 0,436	
	10	0,538 $\pm$ 0,350		0,403 $\pm$ 0,197	
	30	0,335 $\pm$ 0,197		0,284 $\pm$ 0,236	
	60	0,329 $\pm$ 0,314	F=9,337	0,109 $\pm$ 0,076	F=15,695
	120	0,123 $\pm$ 0,052	p= <b>0,000</b>	0,089 $\pm$ 0,023	p= <b>0,000</b>
	Total	0,554 $\pm$ 0,463		0,481 $\pm$ 0,474	

Dunnnett-ovim testom je utvrđena statistički značajna razlika u produkciji biofilma između kontrolnih i uzoraka koji su bili izloženi dejstvu plazme jačine 0,15 W tokom 60 s i 120 s i jačinama 0,9 W i 1,6 W tokom svih vremena izlaganja za protok gasa He od 1 slm (**Grafikon 9 a**). Pri protoku gasa od 0,5 slm značajna razlika je utvrđena kod uzoraka koji su bili izloženi plazmi jačine 0,9 W i 1,6 W tokom svih vremena izlaganja (**Grafikon 9 b**).



**Grafikon 9.** Efekat NAP na formiranje biofilma *S. mutans* ( $10^6$  CFU) u zavisnosti od različite primenjene jačine plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) i dužine ekspozicije (10 s, 30 s, 60 s, 120 s) pri protoku gasa He od a) 1 slm b) 0,5 slm. Kontrolnu grupu su činile ćelije koje nisu izložene dejstvu plazme. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa kontrolama (Dunnett test).

Ispitivanjem uticaja NAP na formirani biofilm *S. mutans* utvrđeno je da pod eksperimentalnim uslovima koji su primenjeni u ovom istraživanju plazma nije uticala značajno na formiran biofilm (**Grafikon 10**).

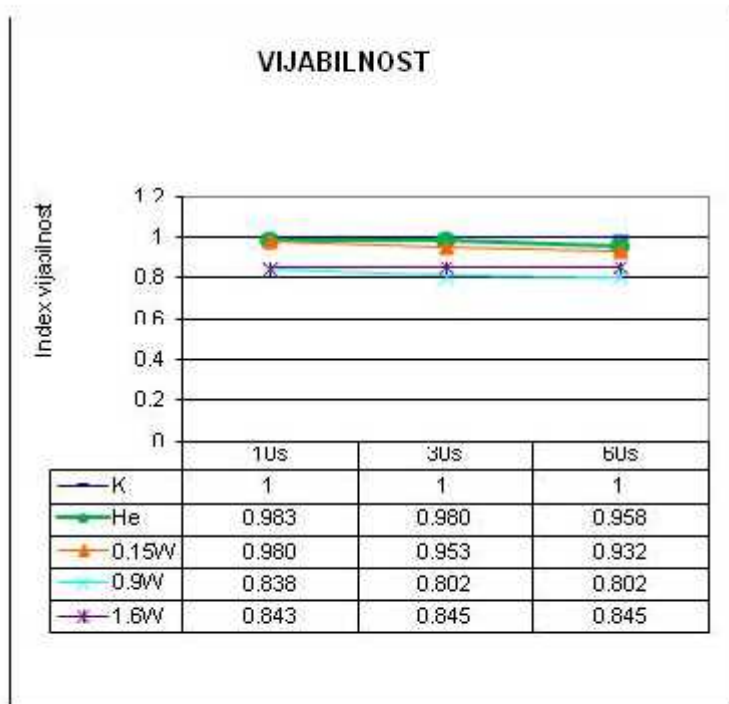


**Grafikon 10.** Efekat NAP na formirani biofilm *S. mutans* inokuluma  $10^6$  CFU u zavisnosti od različite primenjene jačine plazme (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) i dužine ekspozicije (10 s, 30 s, 60 s, 120 s) pri protoku gasa He od a) 1 slm b) 0,5 slm. Kontrolnu grupu su činili uzorci koji nisu bili izloženi dejstvu plazme. Prikazane su srednje vrednosti optičkih gustina  $\pm$  SD triplikata iz dva odvojena eksperimenta

#### 4.4. EFEKTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA HUMANE MEZENHIMALNE MATI NE ELIJE

##### 4.4.1. Analiza citotoksi nosti na humanim mezenhimalnim mati nim elijama izolovanim iz periferne krvi

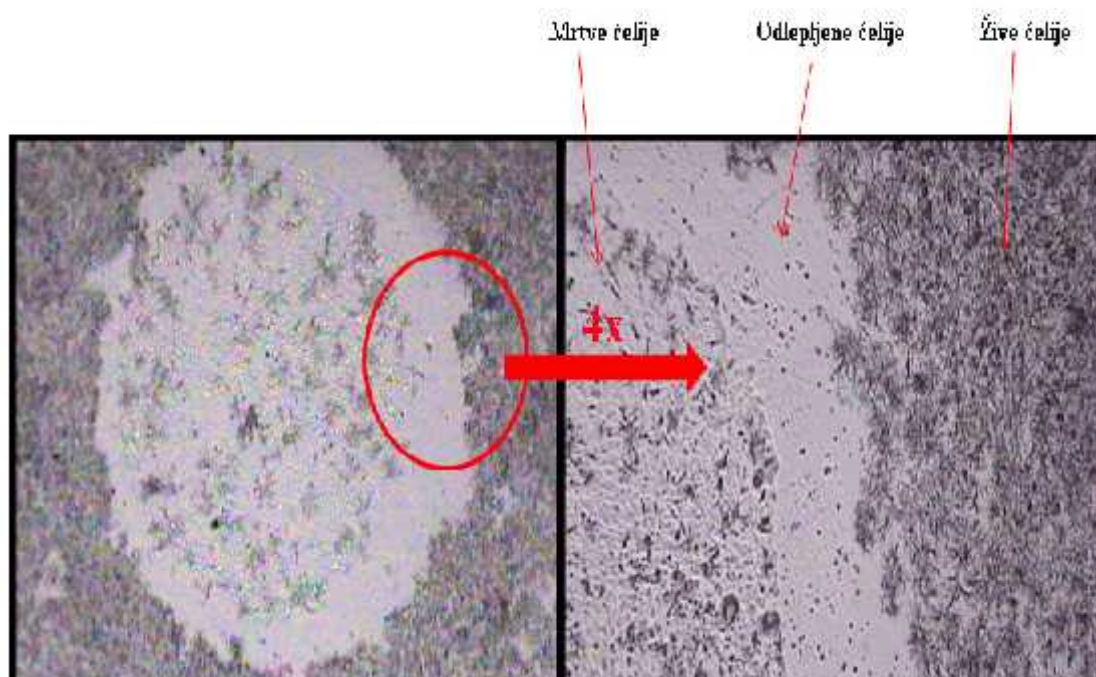
Da bi se utvrdilo delovanje NAP na primarne humane ćelije i eventualna citotoksičnost ispitivali smo uticaj na vijabilnost i adhezivnost hPB-MSC u *in vitro* uslovima. Ćelije su postavljene ( $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ /otvoru) u ploče sa 24 otvora i izložene plazmi tri snage (1,6 W, 0,9 W, 0,15 W), pri protoku gasa He od 0,5 slm i tokom tri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s). Analizom rezultata dobijenih MTT testom utvrđeno je da plazma, bez obzira na primenjenu snagu i vreme izlaganja, ne menja značajno vijabilnost ovih ćelija. Naime, kada se vrednosti dobijene u uzorcima ćelija uporede sa vrednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima, i to kako netretiranih ćelija, tako i ćelija tretiranih samo gasom He, nije ustanovljena statistički značajna razlika (**Grafikon 11**).



**Grafikon 11.** Efekat NAP na vijabilnost hPB-MSC. Ćelije su izložene plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) ili samo gasu He, pri protoku gasa od 0,5 slm, u tri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s). Vijabilnost hPB-MSC nakon izlaganja utvrđena je MTT testom. Vrednosti su predstavljene indeksom vijabilnosti (relativan nivo vijabilnosti uzorka normalizovan na nivo kontrola)

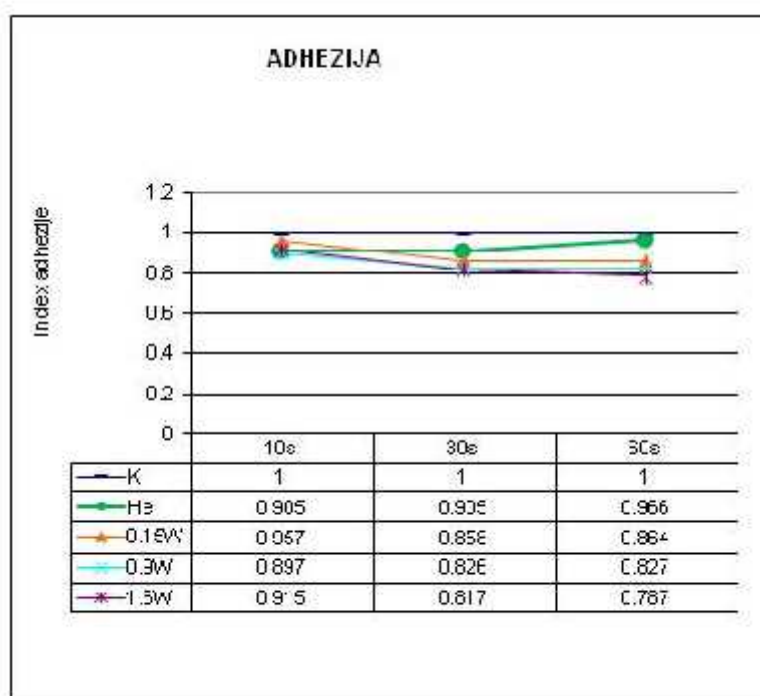


Nakon urađenog MTT testa, ćelije su fotografisane korišćenjem svetlosnog mikroskopa sa digitalnom kamerom. Konstatovano je postojanje tri zone u tretiranim bunarima sa ćelijama: centralna, sa mrtvim ćelijama, u kojoj su ćelije bile direktno ispod vrha plazma igle; na periferiji ove zone, odlepljene ćelije; i u oblasti spolja prema zidu bunara, žive ćelije (**Slika 13**).



**Slika 13.** Fotografija dna bunara mikrotitarske ploče sa hPB-MSC nakon tretmana plazmom i urađenog MTT testa

Analiza rezultata adhezionog testa je pokazala da, pod primenjenim uslovima, plazma tretman ne dovodi do značajnog odlepljivanja ćelija, kada se uporedi sa kontrolnim netretiranim ćelijama kao i ćelijama koje su bile izložene samo gasu He. Rezultat adhezionog testa prikazan je na **Grafikonu 12**.



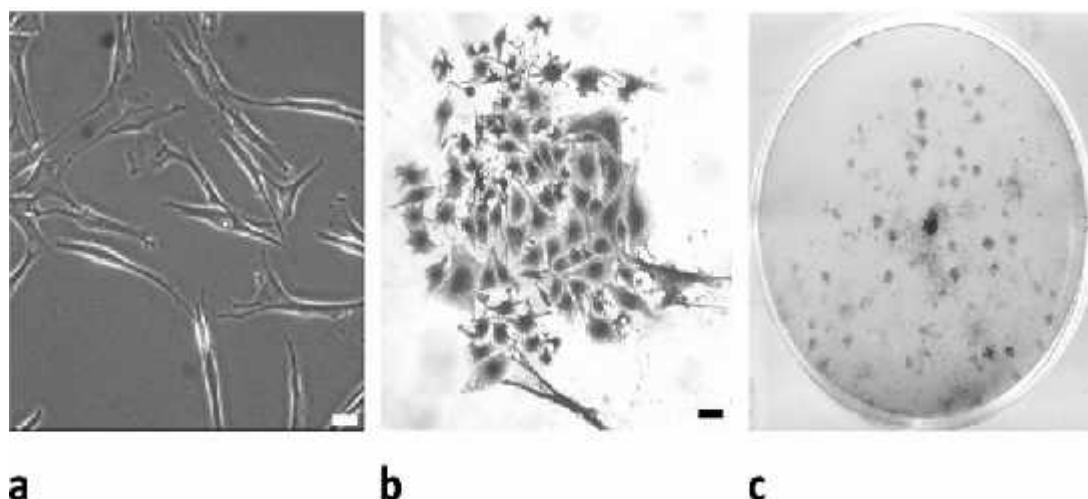
**Grafikon 12.** Efekat NAP na adhezivnost hPB-MSC. Čelije su izložene plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) ili samo gasu He, pri protoku gasa od 0,5 slm, u tri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s). Adhezivnost hPB-MSC nakon izlaganja utvrđena je adhezionim testom. Vrednosti su predstavljene indeksom adhezivnosti (relativan nivo adhezivnosti uzorka normalizovan na nivo kontrola)

#### 4.5. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA HUMANIH MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA IZ PERIODONCIJUMA

Konstrukcija plazma igle i stvaranje “blage” plazme su svakako osnov za potencijalnu primenu NAP u oblasti stomatologije, posebno u parodontalnoj terapiji. Stoga, da bi se ispitao uticaj NAP na ćelije iz ovog tkiva, u ovom radu su, prema dostupnim podacima iz literature, po prvi put u našoj zemlji izolovane multipotentne matične ćelije iz periodoncijuma zuba.

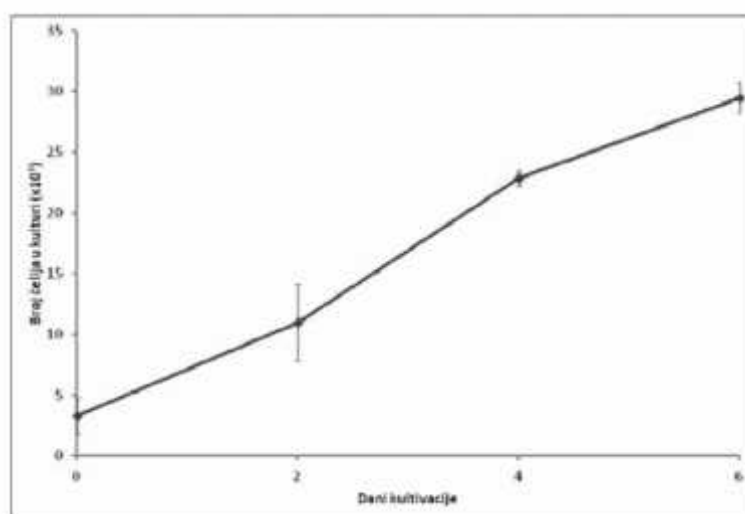
Uzorci periodoncijuma, dobijeni nakon ekstrakcije zdravih umnjaka, su u sterilnim uslovima usitnjeni skalpelom, prebačeni u plastičnu posudu za ćelijske kulture sa medijumom za kultivisanje, a zatim kultivisani na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom sa 5% CO<sub>2</sub>. Posle 4. dana, oko delova periodoncijuma pojavile su se ćelije nalik fibroblastima, a nakon 7. dana i prve kolonije.

Shodno kriterijumima predloženim 2006. godine od strane Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju (Dominici i sar. 2006) prvo je pokazano da izolovane i umnožene hPDL-MSC rastu kao ćelije vretenastog oblika koje podsećaju na fibroblaste, da adheriraju za plastiku u kulturi i da formiraju kolonije ćelija koje podsećaju na fibroblaste (**Slika 14**).



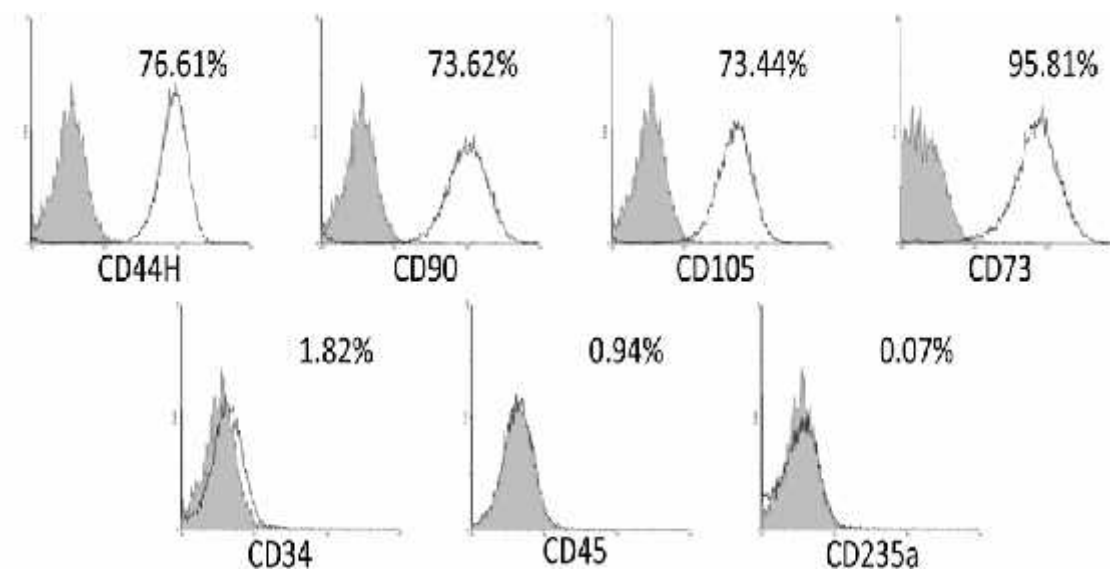
**Slika 14.** Karakteristike hPDL-MSC. (a) fazno-kontrastnom mikroskopijom je utvrđena morfologija hPDL-MSC koja podseća na fibroblaste nakon 4 dana kultivacije. Razmernik: 25 µm. (b) Kolonija nastala od jedne ćelije nakon 10 dana kultivacije, obojena kristal violet bojom. Razmernik: 100 µm. (c) CFU-F test.

Određivanje proliferacije hPDL-MSC u kratkotrajnim kulturama, odnosno određivanje njihovog broja u kulturama do 6. dana inkubacije, ukazalo je na visoki proliferativni kapacitet ovih ćelija, s obzirom da je već 2. dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio trostruko veći, dok je 6. dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio i 10 puta veći u odnosu na početni broj ćelija (**Grafikon 13**). Prosečno vreme dupliranja populacije (PDT) bilo je  $36,28 \pm 3,95$  h. Nije uočena pojava spontane diferencijacije, odnosno i tokom više pasaža ćelije su zadržale nepromenjenu sposobnost proliferacije.



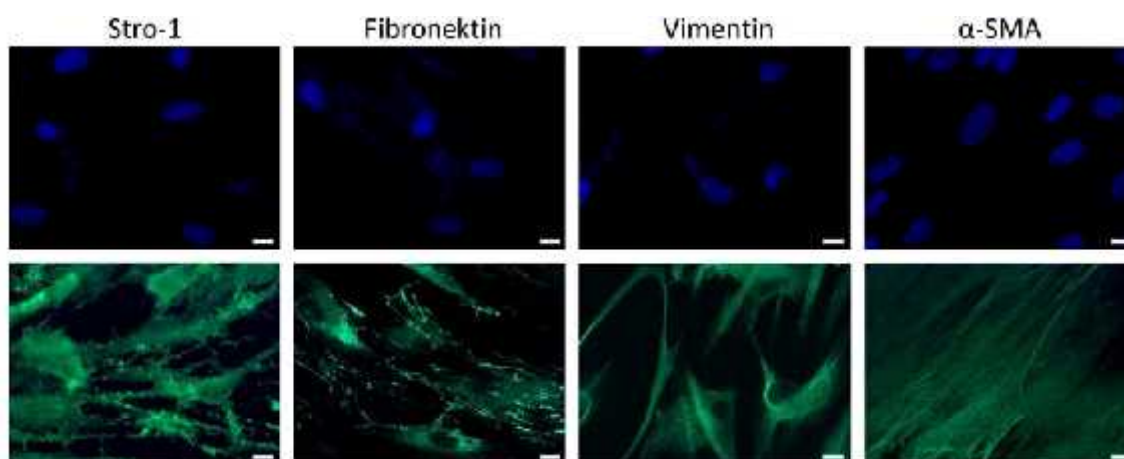
**Grafikon 13.** Proliferativni kapacitet hPDL-MSC u kratkotrajnim kulturama. Prikazane su srednje vrednosti broja ćelija  $\pm$  SEM za 0., 2., 4. i 6. dan inkubacije iz dva odvojena eksperimenta.

Da bi analizirali imunofenotipske karakteristike umnoženih hPDL-MSC, ispitivana je ekspresija površinskih markera protočnom citometrijom i imunofluorescentnom mikroskopijom. Rezultati protočne citometrije su pokazali da preko 70% ćelija ispoljava mezenhimalne linijske markere, kao što su CD44, CD73, CD90 i CD105, a da se ne ispoljavaju hematopoetski linijski markeri CD34, CD45 i CD235a (pozitivnost u manje od 2% ćelija) (**Slika 15**).



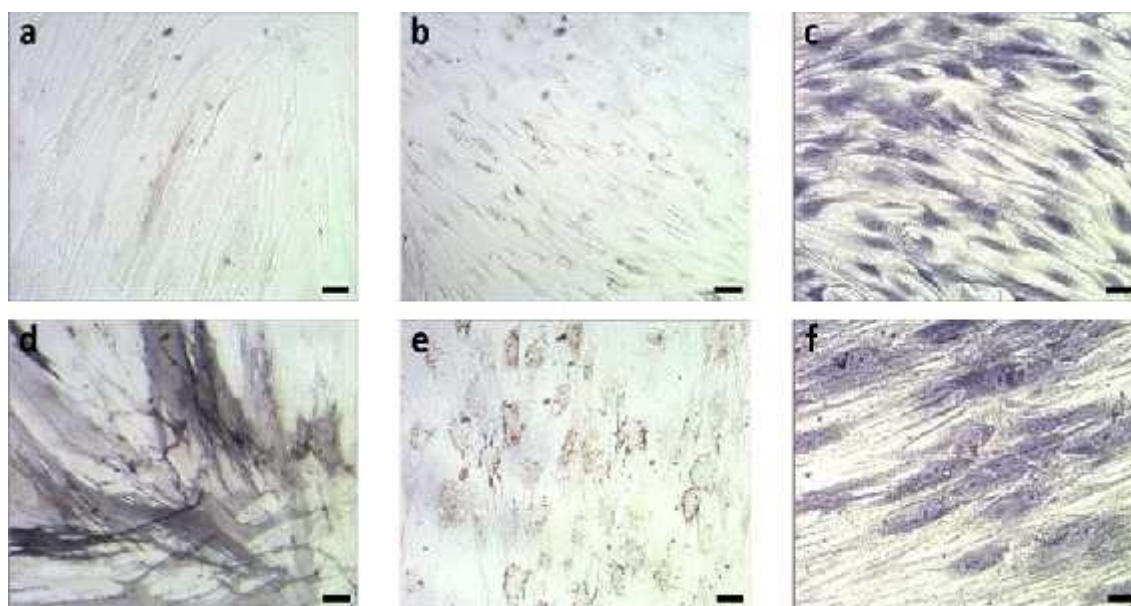
**Slika 15.** Imunofenotipske karakteristike hPDL-MSC. Reprezentativni histogrami protočne citometrije pokazuju ekspresiju određenih mezenhimalnih linijskih molekula (CD44H, CD90, CD105, CD73) i hematopoetskih markera (CD34, CD45, CD235a) (neosenčeni histogrami) sa procentima pozitivnih ćelija, u poređenju sa odgovarajućim izotipskim kontrolama (osenčeni histogrami)

Daljom analizom imunofluorescentnom mikroskopijom kod ispitivanih hPDL-MSC utvrđena je i pozitivna ekspresija mezenhimalnih markera, Stro-1, fibronektin, vimentin i  $\alpha$ -SMA (**Slika 16**).



**Slika 16.** Imunofenotipske karakteristike hPDL-MSC. Reprezentativni paneli imunocitohemijske detekcije mezenhimalnih markera STRO-1, fibronektina, vimentina i  $\alpha$ -SMA. Pozitivno citoplazmatsko bojenje intracelularnih markera indirektnom fluorescencijom pomoću specifičnih antitela i odgovarajućih FITC sekundarnih antitela (zeleno). Jedra su bojena pomoću DAPI (plavo). Za analizu bojenja je korišćen imunofluorescentni mikroskop (400 $\times$ uvećanje). Razmernik: 25  $\mu$ m.

Da bi se ispitaio multipotentni potencijal za diferencijaciju hPDL-MSC u pravcu mezenhimalnih ćelijskih linija (osteogenu, adipogenu i miogenu), ćelije su kultivisane 7 dana (osteogena) i 21 dan (adipogena i miogena) u odgovarajućim medijumima za diferencijaciju. Osteogeni potencijal diferencijacije potvrđen je ekspresijom ranog osteogenog markera, ALP, a aktivnost ALP je pokazana delovanjem odgovarajućeg supstrata za ovaj enzim, nakon čega se ćelije u kojima postoji prisustvo ALP boje intenzivno teget-sivom bojom (**Slika 17d**). Indukcija adipogene diferencijacije potvrđena je prisustvom lipidnih kapi unutar ćelija, a bojenjem sa Oli Red O dokazano je da je većina ćelija aktivno deponovala unutarćelijske lipide (**Slika 17e**). Kapacitet za miogenu diferencijaciju hPDL-MSC je potvrđen formiranjem izduženih višejedarnih ćelija, miotuba koje su, nakon bojenja kristal violet bojom koja omogućava jasno uočavanje jedara u ćelijama, bile vidljive pod mikroskopom (**Slika 17f**).

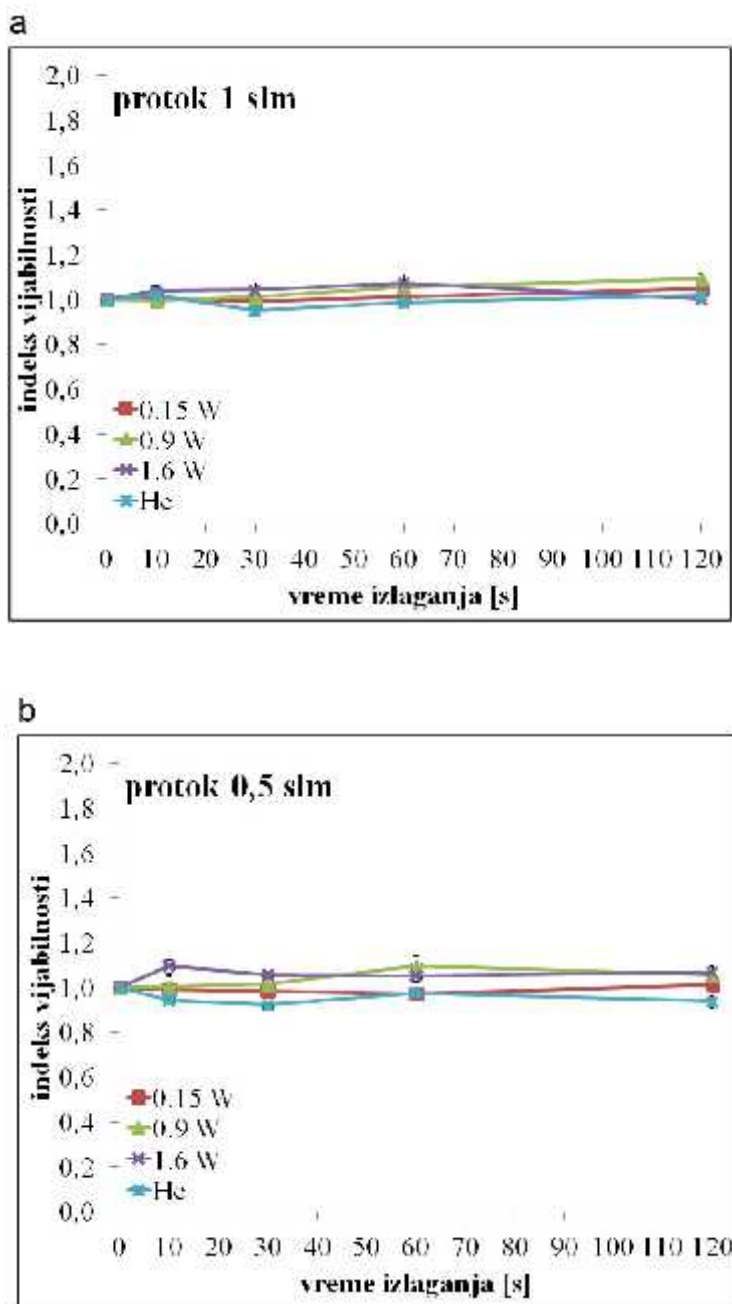


**Slika 17.** Višelinjski potencijal za diferencijaciju hPDL-MSC. Ćelije su kultivisane u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju (d-f) ili kontrolnom medijumu (a-c). Osteogeni potencijal je utvrđen bojenjem ćelija na aktivnost ALP (d). Prisustvo intraćelijskih kapljica masti, kao potvrda adipogene diferencijacije, potvrđeno je bojenjem sa Oli Red O (e). Kapacitet za miogenu diferencijaciju je potvrđena na osnovu formacija višejedarnih miotuba (f). Razmernik: 50  $\mu\text{m}$ .

#### **4.6. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA ELIJSKE FUNKCIJE HUMANIH MEZENHIMALNIH MATI NIH IZ PERIODONCIJUMA**

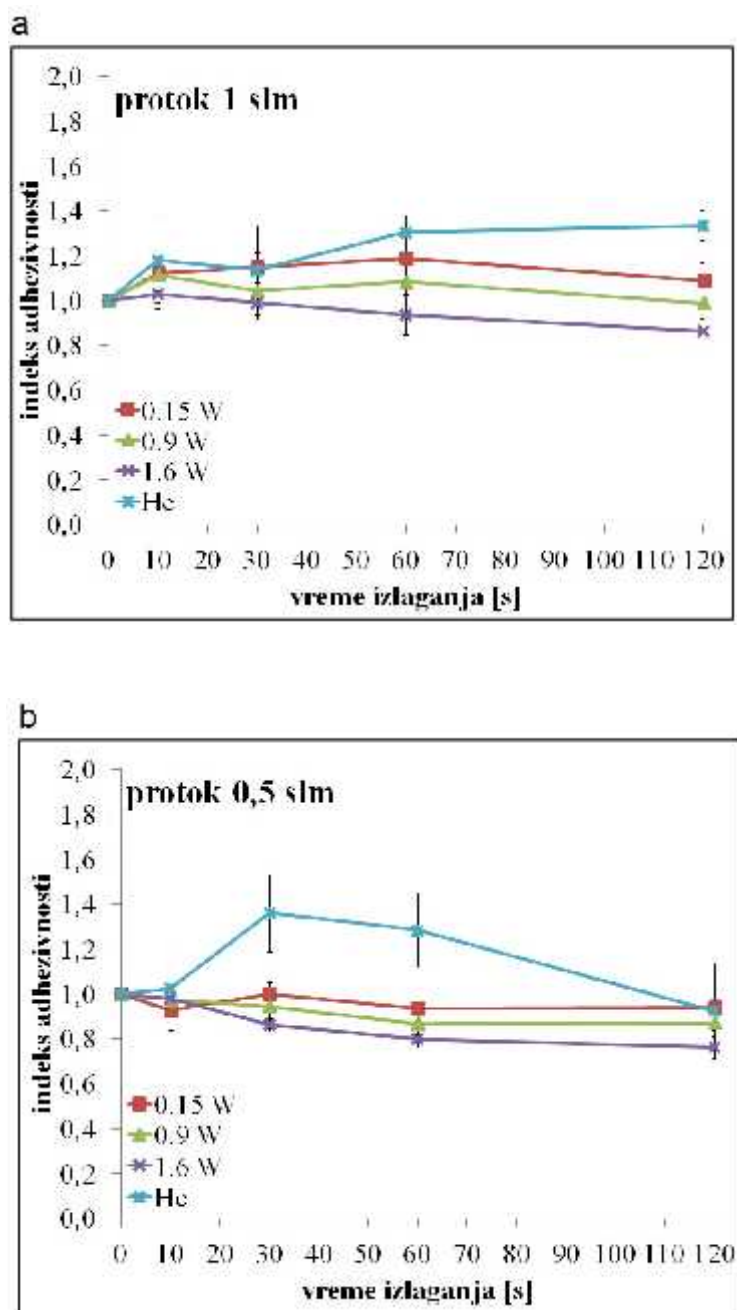
##### **4.6.1. Efekat niskotemperaturne atmosferske plazme na vijabilnost i adheziju hPDL-MSC**

Uticaj NAP na vijabilnost i adhezivnost hPDL-MSC ispitivan je za tri različite snage plazme (0,15 W, 0,9 W i 1,6 W), dva protoka He (0,5 slm, 1 slm) i četiri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s). Da bi se utvrdilo da efekat nije nastao dejstvom gasa He, jednu kontrolnu grupu su činile ćelije koje su izložene samo ovom gasu. Analizom rezultata dobijenih MTT testom i poređenjem vrednosti dobijenih u uzorcima ćelija tretiranih plazmom sa vrednostima dobijenim u kontrolnim uzorcima, kako netretiranih ćelija, tako i ćelija tretiranih samo sa He, utvrđeno je da plazma ne menja značajno vijabilnost ćelija (**Grafikon 14**).



**Grafikon 14.** Efekat niskotemperaturne atmosfere plazme na vijabilnost hPDL-MSC. Čelije su izložene plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) ili samo gasu He, kombinovano sa dva protoka gasa a) 0,5 slm, b) 1 slm i četiri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s). Vijabilnost hPDL-MSC nakon izlaganja je utvrđena MTT testom. Vrednosti su predstavljene indeksom vijabilnosti (relativan nivo vijabilnosti uzorka normalizovan na nivo kontrola)  $\pm$  SEM iz tri odvojena eksperimenta.

Analizom rezultata dobijenih adhezionim testom utvrđeno je da NAP ne uzrokuje značajno odlepljivanje ćelija od podloge, ali je uočeno da jače snage u kombinaciji sa manjim protokom gasa dovode do određenog odlepljivanja ćelija. Rezultat adhezionog testa je prikazan na **Grafikonu 15**.

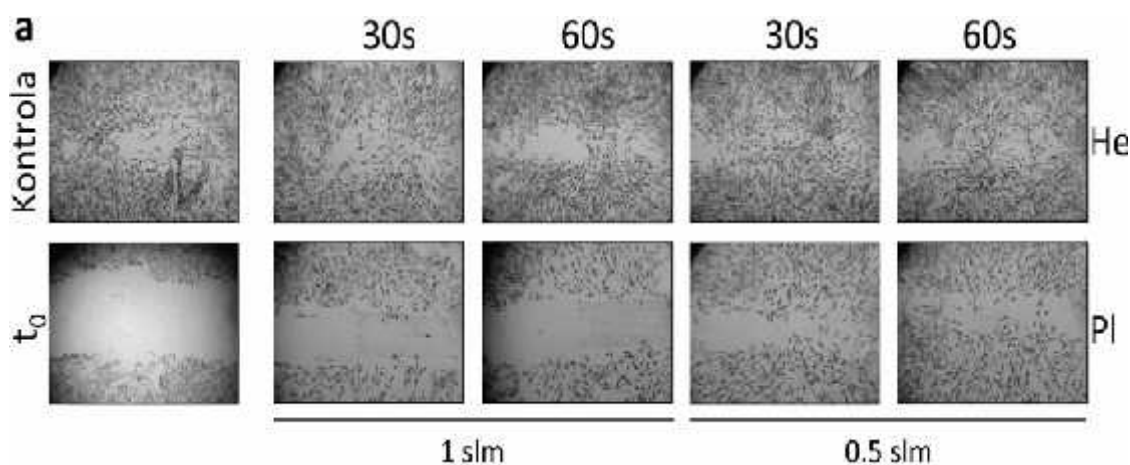


**Grafikon 15.** Efekat niskotemperaturne atmosferske plazme na adheziju hPDL-MS. Ćelije su izložene plazmi različite snage (0,15 W, 0,9 W, 1,6 W) ili samo gasu He, kombinovano sa dva protoka gasa a) 1 slm, b) 0,5 slm i četiri vremena izlaganja (10 s, 30 s, 60 s, 120 s). Uticaj na adhezivnost ćelija određen je adhezionim testom. Vrednosti su predstavljene indeksom adhezivnosti (relativan nivo adhezivnosti uzorka normalizovan na nivo kontrola)  $\pm$  SEM iz tri odvojena eksperimenta.



#### 4.6.2. Efekat niskotemperaturne atmosferske plazme na migratorni potencijal hPDL-MSK

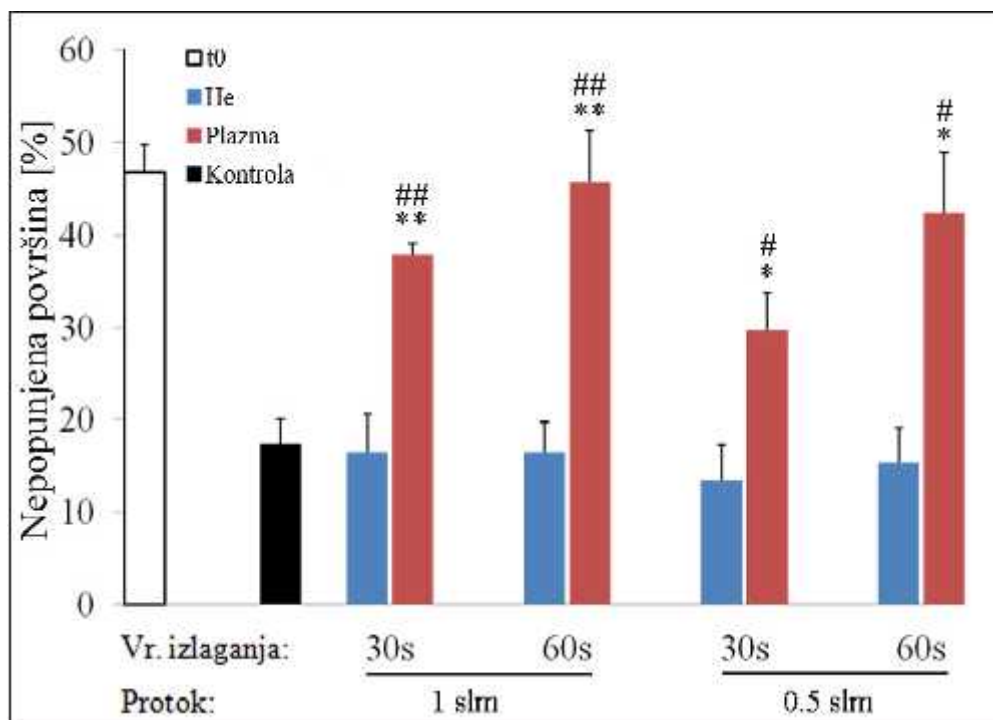
Uticaj NAP na migratorni potencijal hPDL-MSK ispitan je korišćenjem *in vitro* “scratch” testa. Odmah nakon što je napravljena ogrebotina u konfluentnom monosloju hPDL-MSK, ćelije su izložene dejstvu plazme jačine 1,6 W ili samo gasu He, pri protoku gasa He od 0,5 slm i 1 slm tokom 30 s i 60 s. Migracija ćelija je praćena na svetlosnom mikroskopu i uočeno je da plazma uzrokuje smanjenje migratorne sposobnosti ćelija (Slika 18).



**Slika 18.** Efekat NAP na migratorni potencijal hPDL-MSK. Nakon dostizanja konfluentnosti napravljena je ogrebotina u ćelijskom monosloju ( $t_0$ ) nakon čega su ćelije izložene plazmi (Pl) jačine 1,6 W ili samo gasu He, pri protoku gasa od 0,5 slm i 1 slm i dva vremena ekspozicije (30 s, 60 s). Migracija ćelija u polje ogrebotine dokumentovana je svetlosnim mikroskopom i fotografisana.

Tscratch programom kvantifikovan je procenat površine polja ogrebotine koja nije popunjena ćelijama. Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da plazma tretman značajno inhibira rekolonizaciju ogrebotine ćelijama. Testiranjem parova Mann-Whitney testom dokazano je da postoji i statistički značajna razlika u procentu nepopunjene površine ćelijama između tretiranih i netretiranih ćelija pri protoku gasa 1 slm ( $p < 0,01$ ), kao i protoku gasa 0,5 slm ( $p < 0,05$ ), bez obzira na vreme izlaganja ćelija.

Statistički značajna razlika konstatovana je i u odnosu na ćelije koje su bile izložene samo gasu He u oba protoka gasa (**Grafikon 16**).

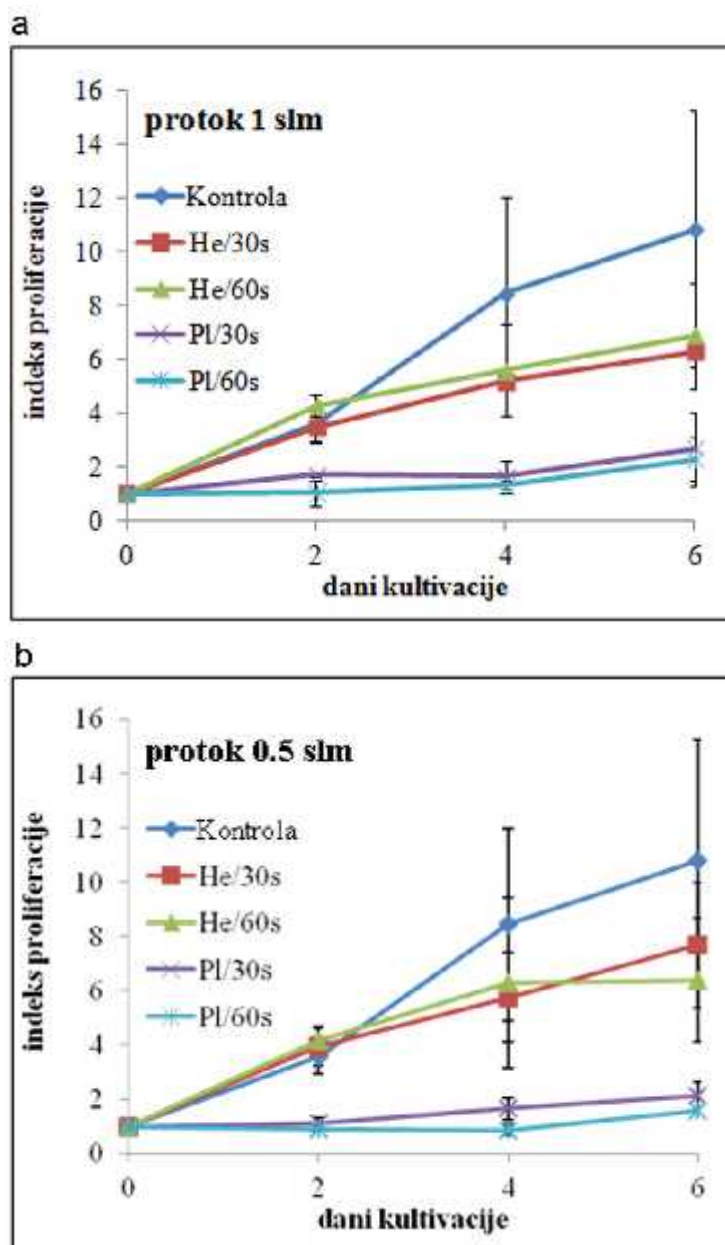


**Grafikon 16.** Efekat NAP na migratorni potencijal hPDL-MSC. Nakon dostizanja konfluentnosti napravljena je ogrebotina u ćelijskom monosloju (t0) nakon čega su ćelije izložene plazmi (Pl) jačine 1,6 W ili samo gasu He, pri protoku gasa od 0,5 slm i 1 slm i dva vremena ekspozicije (30 s, 60 s). Kvantifikacija je izvršena korišćenjem TScratch programa. Rezultati su predstavljeni srednom vrednošću procenta nepopunjene površine ćelijama  $\pm$  SEM iz dva odvojena eksperimenta (b). \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  u poređenju sa netretiranim ćelijama, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  u poređenju sa ćelijama izloženim samo gasu He (Mann-Whitney test)

#### 4.6.3. Efekat niskotemperaturne atmosferske plazme na proliferaciju hPDL-MSC

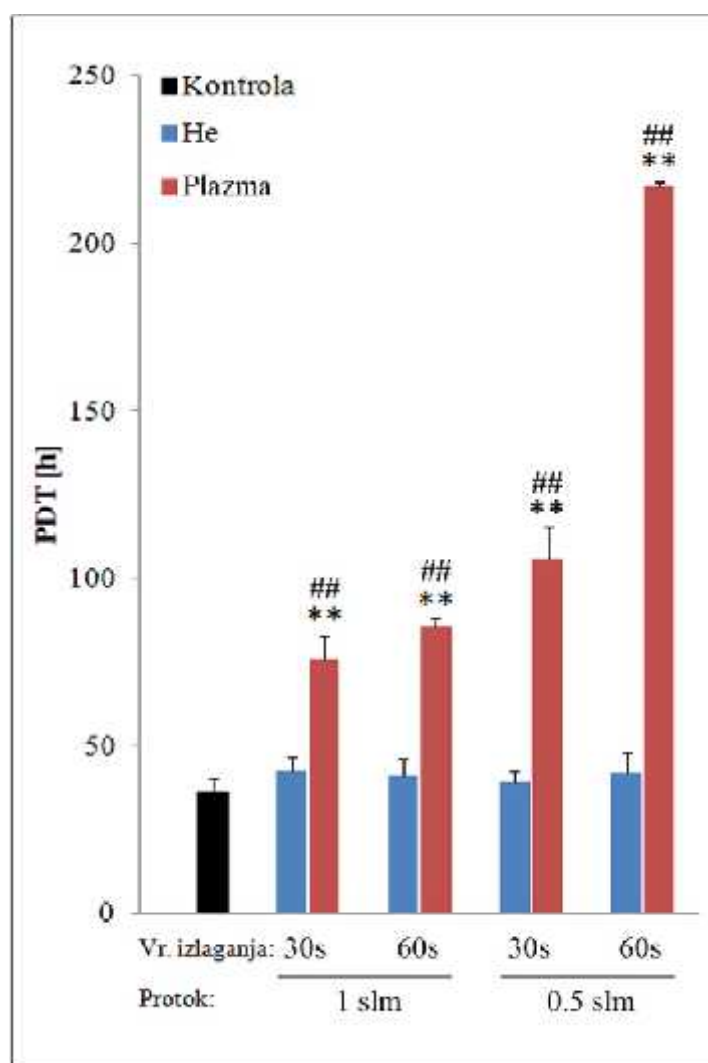
Proliferacija ćelija je određena na osnovu broja ćelija u kulturi nakon odgovarajućeg vremenskog perioda. Kao što je već prikazano u delu rezultata Izolacija i karakterizacija hPDL-MSC, proliferativni potencijal netretiranih ćelija bio je veoma visok, odnosno već 2. dana inkubacije broj ćelija u kulturama bio je trostruko veći, a nakon 6. dana inkubacije čak 10 puta veći u odnosu na početni broj ćelija. Međutim, kod tretiranih

ćelija tokom istog vremenskog intervala, broj ćelija se jedva udvostručio, bez obzira na primenjeni protok gasa He i vreme izlaganja ćelija plazmom (**Grafikon 17**).



**Grafikon 17.** Efekat NAP na proliferaciju hPDL-MSC (a, b) Posle izlaganja ćelija plazmi jačine 1,6 W (PI) ili samo gasu (He), pri protoku od 0,5 slm i 1 slm i ekspoziciji od 30 s i 60 s ćelije su dalje kultivisane i izbrojane 0., 2., 4. i 6. dana. Netretirane ćelije su služile kao kontrola. Rezultati su prikazani indeksom proliferacije koji predstavlja odnos broja ćelija određenog dana prema početnom broju ćelija (0. dan). Rezultati su predstavljeni srednjom vrednošću  $\pm$  SEM iz tri odvojena eksperimenta.

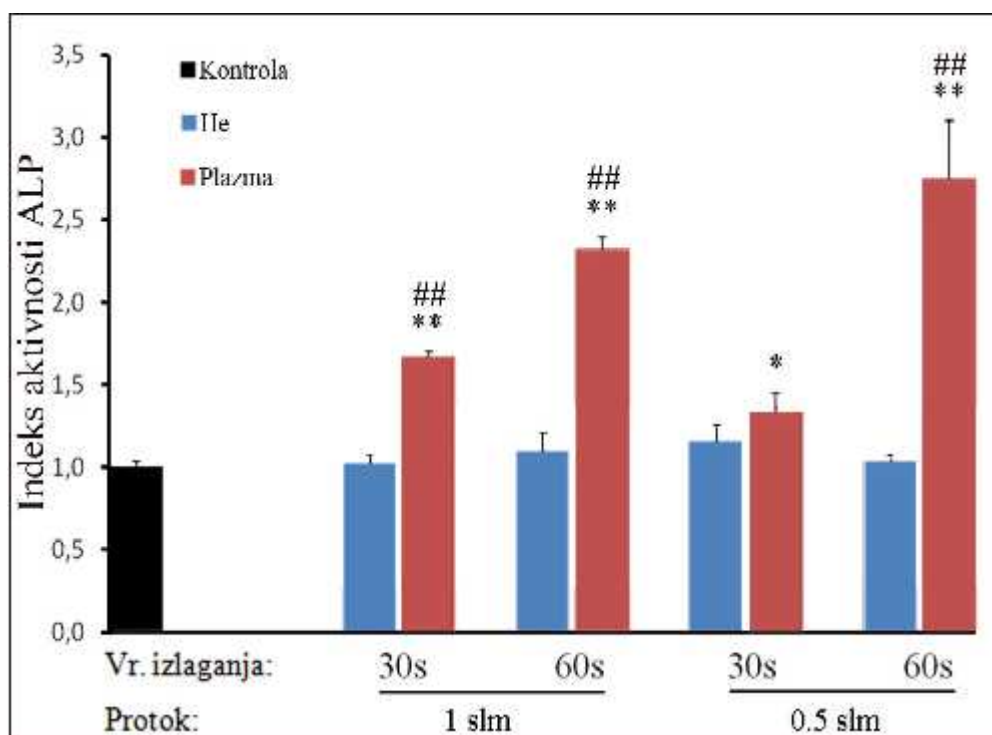
Izračunavanjem PDT potvrđeno je da plazma tretman usporava proliferaciju hPDL-  
MSC. Vrednosti PDT tretiranih ćelija su bile statistički značajno veće kada se uporede sa  
vrednostima netretiranih kontrola ( $p < 0,01$ ). Iako su ćelije koje su bile izložene samo  
gasu He pokazale nešto sporiju proliferaciju, vrednosti PDT nisu bile statistički značajno  
veće kada se uporede sa netretiranim kontrolama (**Grafikon 18**).



**Grafikon 18.** Efekat NAP na proliferaciju hPDL-MSC. Posle izlaganja ćelija plazmi jačine 1,6 W (PI) ili samo gasu (He), pri protoku od 0,5 slm i 1 slm i ekspoziciji od 30 s i 60 s ćelije su dalje kultivisane i izbrojane 0., 2., 4. i 6. dana. Netretirane ćelije su služile kao kontrola. PDT - vreme dupliranja ćelijske populacije je prikazano kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz tri odvojena eksperimenta. \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na netretirane ćelije; ##  $p < 0,01$  u odnosu na ćelije izložene samo gasu (Mann-Whitney U test)

#### 4.6.4. Efekat niske temperature atmosfere plazme na diferencijaciju u osteogenu liniju hPDL-MSK

U cilju ispitivanja uticaja plazme na potencijal diferencijacije hPDL-MSK u pravcu osteogene linije, kao i kvantifikovanja uticaja niske temperature atmosfere plazme, merena je aktivnost ALP u supernatantu kultura ćelija koje su izložene plazmi, samo gasu He i kontrolnih, netretiranih ćelija. Rezultati su pokazali značajno povećanje aktivnosti ALP u uzorcima ćelija tretiranih plazmom u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama u svim primenjenim eksperimentalnim uslovima (**Grafikon 19**), što bi moglo da ukaže na to da plazma tretman povećava osteogeni potencijal hPDL-MSK. U analiziranim uzorcima ćelija koje su bile izložene samo gasu He nije utvrđena statistički značajna promena aktivnosti ALP.



**Grafikon 19.** Aktivnost alkalne fosfataze hPDL-MSK nakon izlaganja NAP. Vrednosti su normalizovane prema ukupnom iznosu ćelijskih proteina i predstavljene indeksom (odnos normalizovanih vrednosti tretiranih ćelija prema normalizovanim vrednostima kontrolnih ćelija). Rezultat je prikazan kao srednja vrednost indeksa  $\pm$  SEM iz tri odvojena eksperimenta. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  u poređenju sa netretiranim kontrolama, ## $p < 0,01$  u poređenju sa ćelijama izloženim samo gasu (Student t test)

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BAKTERIJE U SUSPENZIJAMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da neravnotežna atmosferska plazma stvorena plazma iglom deluje snažno antimikrobno na bakterije u suspenzijama, kao i da efikasnost raste sa povećanjem snage plazme i produžavanjem vremena ekspozicije. Ovakav nalaz je očekivan s obzirom na to da se povećanjem snage povećava prinos radikala i naelektrisanih čestica u plazmi. Iako statističkom analizom nije utvrđena direktna zavisnost između protoka gasa He i broja formiranih kolonija nakon plazma tretmana, u svim eksperimentima su dobijeni bolji rezultati pri manjem protoku gasa, 0,5 slm, što je u skladu sa nalazima drugih studija (Goree i sar. 2006). Povećanjem protoka inertnog gasa smanjuje se mogućnost da molekuli iz atmosfere difunduju u oblast u kojoj je kreirana plazma i samim tim smanjuje se efikasnost produkcije reaktivnih čestica odgovornih za baktericidno dejstvo plazme. Takođe, radni uslovi pod kojima se tretiraju uzorci mogu da variraju jer u velikoj meri zavise i od vlažnosti okolnog atmosferskog vazduha. Kako bi utvrdili mogući uticaj sastava atmosfere, u laboratoriji u kojoj su vršeni tretmani urađena su detaljna ispitivanja sastava vazduha i pokazano je da se sastav vazduha i njegova vlažnost ne menjaju značajno ni tokom dužeg vremenskog perioda (Šešlak, 2009; Malović i sar. 2010). Utvrđena je direktna zavisnost efikasnosti niskotemperaturne plazme od početne koncentracije ispitivanih suspenzija bakterija, kao i da je efekat NAP na suspenzije najveće početne koncentracije, pod uslovima koji su korišćeni u ovom istraživanju, bio zanemarljiv.

Mehanizam kojim NAP deluje antimikrobno je suštinsko pitanje, međutim uprkos brojnim istraživanjima u ovoj oblasti, tačan mehanizam kojim plazme deluju još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Jedan od razloga je korišćenje nestandardizovanih metoda od strane različitih autora zbog čega je interpretacija i poređenje rezultata veoma teško, posebno zbog činjenice da mala varijacija u primenjenim parametrima može značajno da utiče na rezultat.

Pretpostavlja se da UV zračenje, reaktivne kiseonične vrste (ROS - reactive oxygen species), reaktivne azotne vrste (RNS - reactive nitric species), naelektrisane čestice i električno polje udruženo deluju na različite ćelijske komponente i metaboličke procese bakterija, zbog čega je manje verovatno razvijanje rezistencije, što je od posebnog značaja. Niskotemperaturne plazme su izvor UV zračenja različitih talasnih dužina, ali samo UV zračenje talasne dužine u opsegu 200-300 nm i dozi od nekoliko  $\text{mJ/cm}^2$  uzrokuje značajno oštećenje bakterijskih ćelija (Fridman i sar. 2008; Laroussi, 2005). Ova oštećenja pretežno nastaju formiranjem dimera timinskih baza u bakterijskoj DNK čime se onemogućava normalno sparivanje baza i sinteza DNK, a time i umnožavanje bakterija. Intenzitet UV zračenja i opsezi talasnih dužina prvenstveno zavise od pritiska na kojem nastaje plazma. Poznato je da plazme koje se stvaraju na niskim pritiscima predstavljaju bogat izvor UV zračenja kratkih talasa koji imaju najsnažnije germicidno dejstvo. Međutim, istraživanja pokazuju da je intenzitet UV zračenja u niskotemperaturnim atmosferskim plazmama mali zbog čega se pretpostavlja da ono nema važan uticaj u procesu inaktivacije. Izuzetak čine atmosferske plazme koje koriste gas Ar (Trompeter i sar. 2002) ili mešavinu  $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}_2$  (Boudam i sar. 2006) u kojima UV fotoni, pod specifičnim primenjenim uslovima, mogu predstavljati glavne inaktivirajuće faktore. Jedan od mogućih načina utvrđivanja uticaja UV zračenja u plazmi na inaktivaciju mikroorganizama je postavljanje kvarcnog stakla između ispitivanog uzorka i plazme. Na taj način se blokira dolazak čestica iz plazme, dok se UV zračenje iznad 200 nm propušta. Na Institutu za fiziku je sproveden ovakav eksperiment, kojim je utvrđeno da između uzoraka koji su bili tretirani kroz kvarcno staklo i netretiranih, kontrolnih uzoraka, nije bilo značajne razlike u porastu bakterija na osnovu čega bi moglo da se pretpostavi da u slučaju našeg ispitivanog izvora NAP, UV zračenje ne igra važnu ulogu u inaktivaciji (neobjavljeni rezultat). Međutim, dodatna merenja su svakako neophodna da bi se doneo konačan zaključak.

Prihvaćeno je mišljenje da su za baktericidne karakteristike neravnotežnih atmosferskih plazmi najodgovornije ROS, RNS i RONS koje se stvaraju kroz elastične i neelastične sudare čestica u plazmi. Vrsta prisutnih čestica prvenstveno zavisi od vrste gasa u kome se formira plazma. U većini studija u kojima se ispitivalo baktericidno dejstvo plazme korišćena su pražnjenja u plemenitim gasovima kao što su He i Ar (Ermolaeva i sar.

2011; Daeschlein i sar. 2010; Hammann i sar. 2010; Rupf i sar. 2010). Ova dva gasa služe samo kao gasovi nosioci, jer njihovo prisustvo smanjuje napon potreban da bi došlo do proboja i formiranja pražnjenja. Oni sami po sebi nemaju baktericidno dejstvo što je i ispitano tokom izvršenih merenja. Jedna od kontrola je bila i tretman uzoraka samo helijumom bez paljenja plazme. Korišćeni su protoci od 0,5 i 1 slm kao i ista vremena tretmana u slučajevima kada je upaljena plazma. Pokazalo se da helijum kao gas nema nikakvo baktericidno dejstvo. Da bi se povećala antimikrobna efikasnost NAP, često se koristi smeša ovih gasova sa kiseonikom, vazduhom ili drugim gasovima. U pražnjenjima u vazduhu dominantne vrste su O, O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, O<sub>3</sub>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub> (Laroussi, 2002; Herrmann i sar. 1999). Ove čestice oštećuju bakterijske proteine (fragmentacijom peptida, oksidacijom sulfhidril grupa), lipide (peroksidacijom lipida, produkcijom aldehida), membranu (povećanjem hidrofobnosti ili smanjenjem fluidnosti) ili direktno DNK, koja kod bakterija nije zaštićena jedarnom membranom. U različitim studijama se ističe da oksidativni stres predstavlja jedan od mogućih mehanizama inaktivacije bakterija (Gaunt i sar. 2006; Kong i sar. 2009; Wende i sar. 2010). Novija istraživanja su pokazala da plazma tretman indukuje oksidativni stres i stvaranje ROS koji utiču na ćelijsku membranu i morfologiju *E. coli*, kao i da dovode do oksidativne modifikacije bakterijske DNK (Joshi i sar. 2011). Plazma igla koja je korišćena u našem istraživanju je pre upotrebe u tretmanima bakterija i ćelija bila detaljno ispitana. Ispitivanja su vršena električnim sondama, optičkom i masenom spektroskopijom. Sem snage kao jednog od najvažnijih parametara tretmana, bilo je potrebno utvrditi koje reaktivne čestice nastaju u pražnjenju plazma igle. Pokazano je da su od neutralnih atoma i molekula kreiranih u plazmi najdominantniji O, N, NO, kao i OH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali. Uz njih dominantni su O<sub>2</sub> i N<sub>2</sub>, ali oni se nalaze u značajnom procentu u vazduhu i nisu direktan proizvod plazme (Malović i sar. 2010). Za razliku od drugih izvora na atmosferskom pritisku (npr. μAPPJ uređaja), plazma igla ne proizvodi primetan broj molekula ozona. U plazmi se, takođe, nalazi veliki broj metastabila kiseonika, kao i pobuđenih molekula i atoma koji lakše mogu da se jonizuju i da pređu npr. u superoksidni anjon koji je odgovoran za oksidativni stres ćelija. Sem neutrala, plazma je bogata jonima i tu su najzastupljeniji joni kiseonika i azota, O<sub>2</sub><sup>+</sup>, O<sup>+</sup>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, NO<sup>+</sup>, kao i hidroksilni joni (Malović i sar. 2010).



Ovim istraživanjem je utvrđeno da su na dejstvo NAP stvorene plazma iglom osetljivije ispitivane Gram-negativne bakterije, *P. aeruginosa* i *E. coli*, od Gram-pozitivnih, *S. aureus* i *E. faecalis*. Analizom dobijenih rezultata je utvrđeno da je na dejstvo niskotemperaturne atmosfere plazme najosetljivija bakterija *E. coli*. Konstatovano je da se broj formiranih kolonija ove bakterije smanjuje za faktor  $10^4$ , odnosno da je više od 99% bakterija koje su se nalazile u suspenziji bilo uništeno. Nešto manju osetljivost na dejstvo plazme je pokazala bakterija *P. aeruginosa*. Od Gram-pozitivnih ispitivanih bakterija na dejstvo NAP je bila osetljivija bakterija *S. aureus*. Višefaktorskom regresionom analizom varijansi je utvrđeno da se kao značajni faktori, od kojih zavisi efekat NAP, u slučaju Gram-negativnih bakterija izdvajaju snaga plazme, dužina ekspozicije i polazna koncentracija suspenzija, dok u slučaju Gram-pozitivnih samo snaga plazme i polazna koncentracija.

Veća osetljivost Gram-negativnih bakterija na dejstvo plazme se prvenstveno može objasniti razlikom u građi ćelijskog zida između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Ćelijski zid Gram-pozitivnih bakterija je relativno debeo (15-80 nm) i najvećim delom sastavljen od peptidoglikana. Ćelijski zid Gram-negativnih bakterija je tanji (10-15 nm), manje kompaktan i sadrži tanak sloj peptidoglikana iznad koga se nalazi spoljašnji omotač sa lipopolisaharidom kao ključnom komponentom. NAP delovanjem električnog polja ili bombardovanjem visokoenergetskim jonima može uzrokovati mehaničke erozije ćelijskog zida bakterija, što bi predstavljalo jedan od mogućih mehanizama antibakterijskog dejstva. Kako je ćelijski zid Gram-negativnih bakterija tanji može se pretpostaviti da će pretrpeti veća oštećenja. Mogući razlozi koji dovode do rupture ćelijske membrane Gram-negativnih bakterija su alteracija membranskih lipida formiranjem peroksida masnih kiselina (Montie i sar. 2000) i akumulacija naelektrisanja na spoljašnjoj površini membrane (Mendis i sar. 2000). U slučaju bakterija u suspenzijama, naelektrisanje ćelijskog zida elektronima je malo verovatno, s obzirom na to da naelektrisane čestice ne mogu da prodru u tečnost. Laroussi sa saradnicima (1999) i Montie sa saradnicima (2000) u svojim istraživanjima su pokazali da perforacije na membrani *E. coli* nastaju nakon kratkog vremena izlaganja, a da dužim izlaganjem nastaje ćelijska fragmentacija. Više različitih studija je poredilo inaktivaciju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija plazmom, a dobijeni su

različiti rezultati. U nekoliko studija je utvrđeno da su plazme efikasnije u inaktivaciji Gram-negativnih organizama (Ermolaeva i sar. 2011; Daeschlein i sar. 2010; Hong i sar. 2009), dok rezultati drugih ukazuju na suprotan efekat (Feng i sar. 2009; Hamman i sar. 2010; Rupf i sar. 2010; Scholtz i sar. 2007; Sohbatzadeh i sar. 2010). Ovakve razlike prvenstveno nastaju zbog korišćenja različitih izvora plazme, uslova pod kojim su tretirani uzorci kao i različitog sastava hranljivih podloga/rastvora u kojima je vršena inaktivacija bakterija.

U ovom istraživanju korišćene su četiri vrste bakterija koje su ciljano izabrane s obzirom na brojne mehanizme rezistencije koje razvijaju na različite antimikrobne agense. Nalaz da su ispitivane Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije osetljive na dejstvo NAP stvorene modifikovanom plazma iglom, za koju nije realno očekivati razvoj mehanizama rezistencije, je od izuzetne važnosti za potencijalnu primenu ovog plazma izvora.

## **5.2. ISPITIVANJE UTICAJA NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA BIOFILM BAKTERIJA**

### **5.2.1. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje i formirani biofilm MRSA**

Poslednjih godina je više različitih studija pokazalo da NAP deluju snažno antibakterijski na Gram-pozitivne, Gram-negativne bakterije, kao i na biofilm različitih vrsta bakterija (Joshi i sar. 2010; Lazović i sar. 2010; Hong i sar. 2009; Lee i sar. 2006; Yu i sar. 2006; Lee i sar. 2009). Međutim, veoma je malo podataka o uticaju NAP na biofilm MRSA (Joshi i sar. 2010; Cotter i sar. 2011). Pojava sojeva MRSA, koji su rezistentni na sve beta laktamske antibiotike, a često i na druge grupe antibiotika, predstavlja jedan od veoma važnih zdravstvenih problema danas. Poznato je da stafilokoke, uključujući i MRSA, poseduju sposobnost vezivanja za različite površine i formiranja biofilma. MRSA biofilmovi, pored multirezistencije same bakterije, poseduju i dodatnu otpornost na antimikrobne agense, usled rasta u vidu biofilma. U okviru ove studije sprovedeno je opsežno *in vitro* istraživanje dejstva niskotemperaturne plazme na atmosferskom pritisku stvorene modifikovanom plazma iglom, na biofilm kliničkog soja MRSA. Izvršena je evaluacija efekta plazme, u zavisnosti od snage plazme i protoka gasa tokom tri različita vremena izlaganja, na biofilm MRSA, koji su formirali

inokulumi veličine od  $10^4$  do  $10^6$  CFU. Rezultati su pokazali da niskotemperaturna plazma stvorena ovim izvorom poseduje inhibitorni efekat na rast MRSA u biofilmu. Ovaj inhibitorni efekat je u pozitivnoj korelaciji sa snagom plazme, protokom gasa i vremenom izlaganja. Ovakav nalaz je u skladu sa karakteristikama izvora plazme. Naime, sa većim protokom gasa više plazma čestica dolazi u kontakt sa bakterijskim ćelijama, dok se povećanjem snage plazme povećava prinos reaktivnih čestica. Vrsta i sastav baktericidnih čestica u plazmi prvenstveno zavise od konstrukcije izvora, vrste gasa koji se koristi, vlažnosti vazduha, snage i dr. Reaktivne čestice plazme, prvenstveno ROS i RNS, direktno utiču na bakterije, posebno na njihovu spoljašnju membranu. Hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) radikal je veoma reaktivan unutar zidova ćelija i reaguje sa većinom biomolekula. Ovaj radikal dovodi do oksidativnog oštećenja membrane i ćelijskog zida modifikovanjem membranskih belančevina i izazivanjem lipidne peroksidacije. Jedan od dominantnih hemijski aktivnih molekula u slučaju plazme stvorene plazma iglom koja je korišćena u ovom istraživanju, je i azot monoksid (NO) (Lazović i sar. 2008; Malović i sar. 2010). Ovaj molekul je snažan antimikrobni agens, a njegova efikasnost je pokazana protiv brojnih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, uključujući i *S. aureus* (Ghaffari i sar. 2006). Antimikrobno dejstvo ovog molekula potiče od direktne modifikacije biomolekula ili formiranja reaktivnih azotnih i kiseoničnih vrsta (RNOS) kao što su peroksinitrit ( $\text{OONO}^\cdot$ ), S-nitrozotiol (RSNO), azot dioksid ( $\text{NO}_2$ ), azot trioksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) i azot tetraoksid ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Ove reaktivne vrste antimikrobno dejstvo ostvaruju indukujući lipidnu peroksidaciju ili oštećujući DNK (Schairer i sar. 2012). Pored toga, RNOS mogu uzrokovati nitrozaciju proteinskih tiol grupa i nitrozilaciju Fe-S centra proteina, čime se modifikuje funkcija proteina koji su esencijalni za ćelijske procese (Friedman i sar. 2011; Han i sar. 2009).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je inhibicija biofilma zavisna ne samo od parametara plazme već i od veličine inokuluma. U slučaju najvećeg ispitivanog inokuluma ( $10^6$  CFU), plazma nije značajno uticala na formiranje biofilma, čak ni u slučaju najveće snage i najdužeg vremena izlaganja pri protoku gasa He od 0,5 slm. Inhibitorni efekat plazme na formiranje biofilma od strane najvećeg inokuluma je konstatovan pri protoku gasa He od 1 slm u kombinaciji sa drugim plazma parametrima.

U slučaju najmanje veličine inokuluma ( $10^4$  CFU), utvrđen je visok nivo inhibitornog efekta plazme na biofilm. Pri protoku gasa od 0,5 slm plazma snage 0,9 W je bila dovoljna da se postigne značajno smanjenje formiranja biofilma, bez obzira na vreme izlaganja. Pri većem protoku gasa, sve kombinacije plazma parametara su bile efikasne u inhibiciji formiranja biofilma.

Ovim istraživanjem je utvrđeno da plazma inhibitorno deluje na formiranje MRSA biofilma, međutim, efekat na već formirani biofilm bio je zanemarljiv. Ovo bi se moglo objasniti debljinom biofilma. Bakterije koje su najviše izložene aktivnim česticama plazme su svakako one u površinskim slojevima biofilma, zbog čega dolazi do njihove inaktivacije. Međutim, baktericidni produkti plazme verovatno ne prodiru u dublje slojeve, zbog čega ne dolazi do eradikacije biofilma. Nedavno je u *in vitro* uslovima pokazano da se He/O<sub>2</sub> plazmom postiže potpuna eradikacija biofilma bakterija *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus* već nakon 45 s i 2 minuta, dok je za biofilm Gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* bilo potrebno duže vreme (Alkawareek i sar. 2012). U drugim studijama je korišćena Ar plazma kojom je za kratko vreme postignuta potpuna eliminacija biofilma bakterija *E. coli*, *S. epidermidis* i MRSA (Lee i sar. 2009), a sličan rezultat je dobijen i pražnjenjem na vazduhu pomoću dielektrične barijere (Joshi i sar. 2010). Novija *in vivo* istraživanja pokazuju da se Ar plazmom postiže efikasna eliminacija biofilma bakterije *P. aeruginosa* u inficiranim ranama na koži pacova čime se poboljšava proces zarastanja (Ermolaeva i sar. 2011). Ranija istraživanja su utvrdila da reaktivne i naelektrisane čestice plazme mogu uticati na integritet polisaharidnog matriksa koga sekretuju bakterije u biofilmu. Pokazano je da izlaganje plazmi dovodi do povećanja poroznosti biofilma, gubitka biomase i smanjenja debljine, čime se destabilizuje celokupna struktura biofilma (Moisan i sar. 2001; Laroussi i sar. 2003; Joaquin i sar. 2009; Lee i sar. 2009). U slučaju našeg izvora plazme, eradikacija biofilma bi se možda mogla postići povećanjem snage plazme, imajući u vidu da se povećanjem primenjene snage povećava i prinos reaktivnih čestica pri čemu ne dolazi do značajnog povećanja temperature tretiranog uzorka (Lazović i sar. 2010), što je od presudnog značaja kod primene plazme *in vivo*.

### 5.2.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na formiranje i formirani biofilm *S. mutans*

Dentalni plak-biofilm predstavlja složenu zajednicu mikroorganizama oralne mikroflore koji su odgovorni za nastanak najrasprostranjenijih infektivnih oboljenja kod čoveka, zubnog karijesa i parodontalnih bolesti. Dentalni karijes je infektivna bolest mineralizovanih zubnih tkiva, gleđi, dentina i cementa. Danas se zna da karijes počinje kao posledica delovanja kiselina na površinu gleđi zuba gde dolazi do najveće akumulacije plaka. Terapija karijesa podrazumeva uklanjanje karijesnog dentina, a najrasprostranjeniji način uklanjanja karijesnog dentina u svakodnevnoj praksi je mašinskim rotirajućim instrumentima. Iako efikasni, njima se uklanja i zdrava zubna supstanca, a tokom rada se stvaraju vibracije i razvija toplota koji izazivaju iritaciju zubne pulpe i nelagodnost kod pacijenta. Osim toga, brojna istraživanja su ukazala da nakon preparacije kaviteta opstaju mikroorganizmi u dentinu i dentinskim tubulima, što dovodi do razvoja sekundarnog karijesa. Moderni koncept minimalno interventne stomatologije temelji se na očuvanju što više prirodnog zubnog tkiva u svrhu minimalnog daljeg oštećenja zuba, zbog čega se poslednje decenije istražuju različite alternative konvencionalnim metodama u terapiji karijesa, kao što su ultrazvučno i lasersko uklanjanje karijesnog dentina, korišćenje ozona, hemijsko-mehanička metoda ili tehnika vazdušne abrazije (Banerjee i sar. 2000; Banerjee i sar. 2000).

Jedna od veoma interesantnih potencijalnih primena niskotemperaturnih atmosferskih plazmi jeste *in vivo* dezinfekcija u oralnoj regiji, prvenstveno kaviteta zuba nastalih karijesom, inficiranih kanala korena i parodontalnih džepova. Izvor NAP koji po svojim karakteristikama odgovara ovakvoj primeni je plazma igla. Konstrukcija ovog izvora je takva da omogućava laku dostupnost mestu tretmana, pri čemu se stvara "blaga" plazma snažnog antimikrobnog dejstva, bez pratećeg zagrevanja tretiranog uzorka.

Ovim istraživanjem je izvršena evaluacija efekta NAP, stvorene plazma iglom, na biofilm bakterije *S. mutans* inokuluma od  $10^6$  CFU u zavisnosti od različitih parametara plazme i vremena izlaganja. Utvrđeno je da je, bez obzira na protok gasa He, plazma snage od 0,9 W, u svim vremenima izlaganja, dovoljna da se značajno inhibira rast *S.*

*mutans* u vidu biofilma. Značajna inhibicija rasta je postignuta i sa najmanjom primenjenom snagom plazme, 0,15 W, ali samo u kombinaciji sa najvećim protokom gasa He i najdužim vremenom izlaganja. Nasuprot snažnom inhibitornom dejstvu na formiranje biofilma, efekat plazme na već formiran biofilm je bio i u ovom slučaju, kao i kod biofilma MRSA, zanemarljiv. Nalazi dobijeni u ovom istraživanju su u skladu sa nalazima drugih studija. Stoffels sa saradnicima (2002) je, koristeći plazma iglu kao izvor NAP, pokazala da se postiže efikasna inaktivacija *Streptococcus mutans* u radijusu od 5-8 mm već nakon 60 s, dok je Goree sa saradnicima (2005), koristeći veoma sličan izvor, ukazao na direktnu zavisnost antibakterijskog efekta plazme od primenjenog protoka gasa. U studiji Sladek i saradnika (Sladek i sar. 2007) antimikrobna aktivnost NAP protiv biofilma *S. mutans* je poređena sa sredstvom za ispiranje usta koje sadrži 0,2% hlorheksidin glukonat. Rezultati su pokazali da ni 12 h posle tretmana plazmom nije uočen porast bakterija koje su odlepljene od biofilma. Iako je pokazano inhibitorno dejstvo plazme, ovi efekti su zavisili od prisustva saharoze. Druge studije dokazale su da se NAP može vršiti eliminacija oralnih patogena sa površine dentina (Rupf i sar. 2010) što je realniji model za ispitivanje, s obzirom da mikroorganizmi mogu prodrati u dentinske tubule čime je njihova eliminacija otežana. Osim toga, ovakvim tretmanom bi se mogla izvršiti modifikacija površine dentina i priprema za trajno vezivanje sa kompozitnim restaurativnim materijalima (Ritts i sar. 2010).

Biofilm *S. mutans* možda ne predstavlja najadekvatniji model za ispitivanje dejstva NAP na dentalni plak, s obzirom da ne imitira u potpunosti uslove koji vladaju u oralnoj regiji. Da bi se procenio potencijal ovog izvora kao novog terapijskog postupka za efikasnu kontrolu i uklanjanje plaka ne samo u terapiji karijesa, neophodno je ispitati efekat na biofilm kultivisan *ex vivo* iz salive ili subgingivalnog plaka. Međutim, ovi preliminarni rezultati predstavljaju dobar osnov za dalja istraživanja. Ova istraživanja treba usmeriti prvenstveno u pravcu utvrđivanja parametara pod kojim bi se mogla izvršiti potpuna eradikacija biofilma.

### 5.3. EFEKTI NISKOTEMPERATURNE ATMOSFERSKE PLAZME NA HUMANE MEZENHIMALNE MATI NE ELIJE

#### 5.3.1. Analiza citotoksi nosti niskotemperaturne atmosferske plazme na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi

Za buduću primenu NAP *in vivo*, od presudnog značaja je jasno definisanje uslova pod kojim se ostvaruju željeni efekti, pri čemu ne dolazi do oštećenja okolnog tkiva. Poslednjih godina je više različitih *in vitro* testova razvijeno kao alternativa *in vivo* testiranjima toksičnosti na eksperimentalnim životinjama. Za ispitivanje toksičnosti *in vitro* korišćene su različite ćelijske linije, kao što su imortalizovane ćelije i primarne ćelije izolovane iz tkiva životinja (Ekwall i sar. 1983; Evans i sar. 2001; Gennari i sar. 2004). Imortalizovane ćelije su veoma dostupne i lake za održavanje, međutim često sa abnormalnostima u ponašanju i fenotipu, zbog čega ne oslikavaju mehanizme koji bi postojali u njihovim homologim normalnim ćelijama. Iz tog razloga se primarne ćelije smatraju boljim model sistemom za ispitivanje citotoksičnosti *in vitro*, a do sada su korišćene različite ćelijske linije za ovakva ispitivanja, kao što su mišiji fibroblasti i normalni humani keratinociti.

Jedinstvene osobine mezenhimalnih ćelija, tj. neograničena sposobnost proliferacije i sposobnost diferentovanja u različite ćelijske linije, kao i laka dostupnost izvorima humanih ćelija, su prepoznate kao prednosti za ispitivanje toksičnosti različitih sredstava (Davila i sar. 2004). Scanu sa saradnicima (2011) je po prvi put koristio ćelijsku liniju hMSC kao *in vitro* model sistem za ispitivanje akutne toksičnosti hemikalija, pokazujući da ove ćelije pružaju preciznije modelovanje *in vivo* uslova.

U ovom istraživanju je toksičnost NAP, prema podacima iz literature, po prvi put ispitivana na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi, pri čemu su korišćeni plazma parametri pod kojim plazma ostvaruje snažno antimikrobno dejstvo. Utvrđeno je da, bez obzira na kombinaciju plazma parametara, ona ne utiče značajno na vijabilnost ovih ćelija niti dovodi do njihovog odlepljivanja od podloge. Međutim, korišćenjem svetlosnog mikroskopa uočeno je da postoje različite zone u tretiranim bunarićima sa ćelijama, što je u skladu sa geometrijom plazme koja se stvara ovim izvorom. U centralnoj zoni u tretiranim bunarićima, nalazile su se mrtve

ćelije. Ove ćelije su se u tretmanu nalazile direktno ispod vrha plazma igle, gde je dejstvo plazme bilo najjače. Kako su u ovim eksperimentima ćelije postavljane u ploče sa 24 otvora, plazma igla nije mogla biti precizno fiksirana na udaljenosti od 3 mm. Samim tim, možemo pretpostaviti da se smanjenjem udaljenosti od tretiranog uzorka povećao fluks naelektrisanih čestica, kao i termički efekat, što je zajedno moglo da dovede do smrti ćelija. Na periferiji ove zone, gde je dejstvo plazme bilo slabije, konstatovana je zona sa odlepljenim ćelijama. Rezultati drugih autora koji su ispitivali uticaj NAP na adheziju, ukazuju da efekat zavisi prvenstveno od korišćenog izvora plazme i primenjenih uslova. Čak i u slučaju da je plazma tretman doveo do odlepljivanja adherentnih ćelija, nije uticao na njihovu vijabilnost, a efekat je bio reverzibilnog karaktera (Kieft i sar. 2005, Shashurin i sar. 2008, Yonson i sar. 2006). Različite studije koje su ispitivale efekat NAP na ćelije sisara pokazuju da efekti direktno zavise od plazma parametara i dužine izlaganja. Noviji eksperimenti koji su vršeni na kulturama fibroblasta poreklom iz pluća kineskog hrčka pokazali su da plazma tretman, u različitim primenjenim dozama, pa i onim koje deluju antibakterijski, nije toksičan niti indukuje mutagenost (Boxhammer i sar. 2013). Welz sa saradnicima (2013), ispitujući kratkoročne efekte NAP na mukozne ćelije pokazuje da tretman plazmom do 120 s ne utiče značajno na njihovu vijabilnost. Druge studije su takođe pokazale da je plazma relativno netoksična, primenjena u manjoj dozi i kraćim vremenima izlaganja nije uticala značajno na vijabilnost ispitivanih ćelija čak ni 24 h nakon tretmana (Brun i sar. 2012; Kalghatgi i sar. 2011). Međutim, veće doze i ekspozicija od 120 s su indukovale ćelijsku smrt, izazivajući apoptozu.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na to da je NAP stvorena plazma iglom netoksična pod primenjenim uslovima, međutim, za buduću primenu ovog izvora *in vivo* neophodno je detaljno ispitati ne samo kratkoročne, već i dugoročne moguće štetne efekte NAP na ćelije.



### 5.3.2. Ispitivanje uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periodoncijuma

Fizička konstrukcija plazma igle koja omogućava lokalizovano i kontrolisano dejstvo i stvaranje plazme snažnog antibakterijskog dejstva su svakako karakteristike zbog kojih bi NAP, stvorene ovakvim izvorom, mogle naći primenu i u oblasti stomatologije, posebno za tretman dentalnih kaviteta stvorenih karijesom i parodontalnih džepova. Prema podacima koji su dostupni u literaturi, do sada nije ispitivana mogućnost primene NAP u parodontalnoj terapiji, kao ni uticaj na parodontalno tkivo. Stoga je u ovom radu po prvi put ispitivan uticaj NAP na različite ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma, kao što su vijabilnost, adhezija, motilitet i proliferacija. Osim toga, kako su hPDL-MSC prepoznate kao ćelije koje bi mogle imati važnu ulogu za potencijalnu primenu u regenerativnoj parodontalnoj terapiji, ispitivan je i efekat NAP na diferencijaciju ovih ćelija u osteogenu liniju (Miletić i sar. 2013).

U ovom radu su po prvi put u našoj zemlji izolovane i okarakterisane multipotentne matične ćelije iz periodoncijuma zuba (Miletić i sar. u štampi). Izolovane i umnožene hPDL-MSC pokazale su slične karakteristike sa drugim adultnim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz različitih izvora (Dominici i sar. 2006), kao što su adhezija za plastiku u kulturi, tipična morfologija koja podseća na fibroblaste, formiranje CFU-F kolonija od jedne ćelije i izražene proliferativne sposobnosti *in vitro*. Visoki proliferativni kapacitet koji je utvrđen za ove ćelije bi mogao da se pripíše razvojnoj fazi tkiva iz koga su ove ćelije izolovane. Ovo istraživanje je pokazalo da se sposobnost proliferacije hPDL-MSC tokom više pasaža ne menja, što je veoma važno za moguću terapijsku primenu ovih ćelija.

Dalje su analizirane imunofenotipske karakteristike umnoženih hPDL-MSC ispitivanjem ekspresije specifičnih markera protočnom citometrijom. Analiza protočnom citometrijom je pokazala da hPDL-MSC u visokom procentu (70-90%) ispoljavaju mezenhimalne marker proteine CD44 (IN), CD73 (E5NT), CD90 (Thy1) i CD105 (endoglin), dok u isto vreme ne ispoljavaju hematopoetske markere kao što su CD34, CD45 i CD235a što je u skladu sa nalazima drugih studija (Nagatomo i sar. 2006; Iwata i sar. 2010). Dalja imunocitohemijska analiza je utvrdila ispoljavanje ranog mezenhimalnog površinskog markera Stro-1, i intracelularnih markera, fibronektina,

vimentina i  $\alpha$ -SMA, koji dodatno potvrđuju mezenhimalno poreklo ovih ćelija. Na kraju, kao najrelevantniji kriterijum koji potvrđuje matičnu prirodu ovih ćelija, analizirana je sposobnost diferentovanja u različite mezenhimalne ćelije. Korišćenjem medijumima za indukciju specifičnog diferentovanja uspešno je dokazana njihova multipotentnost, s obzirom da su ove ćelije pokazale da imaju sposobnost diferentovanja u osteogenu, miogenu i adipogenu liniju.

Za ispitivanje uticaja NAP na ćelijske funkcije hPDL-MSC odabrani su eksperimentalni uslovi pod kojima plazma ispoljava snažno antibakterijsko dejstvo na suspenzije bakterija i biofilm. Selektivno antimikrobno dejstvo bez oštećenja okolnog zdravog tkiva je svakako preduslov za buduću kliničku primenu NAP. Pod uslovima primenjenim u ovoj studiji utvrđeno je da plazma ne deluje citotoksično na primarne ćelije izolovane iz periodoncijuma zuba, što je od presudnog značaja za buduću primenu u parodontalnoj terapiji.

Dalja ispitivanja su pokazala da tretman plazmom, posebno u protoku gasa He od 0,5 slm, pri najvećoj snazi plazme i najdužem vremenu izlaganja, indukuje, mada ne značajno, odlepljivanje hPDL-MSC od površine ploče u kojoj su kultivisane. U isto vreme, plazma značajno inhibira migraciju ovih ćelija. Ovi nalazi su u neku ruku neočekivani, s obzirom na to da je utvrđeno da plazma ne utiče na vijabilnost ovih ćelija. Različite studije su ispitivale efekat plazme na adheziju i migraciju adherentnih ćelija. Pokazano je da se dejstvom He plazme slabog intenziteta na fibroblaste, endotelne i glatko mišićne ćelije, indukuje prekid adhezije ćelije na ćeliju i sledstveno tome dolazi do odlepljivanja ćelija od supstrata, što je zavisilo od primenjene doze (Kieft i sar. 2005, Shashurin i sar. 2008, Yonson i sar. 2006). Veoma važno je da su ovi efekti bili reverzibilnog karaktera, odnosno nakon plazma tretmana, nije uočena promena vijabilnosti odlepljenih ćelija, a nakon kratkog perioda inkubacije je dolazilo do njihove ponovne adhezije za površinu ploče i nastavka proliferacije. Međutim, NAP koje se stvaraju različitim izvorima je veoma teško međusobno porediti s obzirom na to da je radne parametre pod kojim se primenjuju gotovo nemoguće standardizovati, što otežava interpretaciju i poređenje efekata koji nastaju njihovim dejstvom.

Naredni deo istraživanja sproveden je u cilju ispitivanja uticaja plazma tretmana na proliferaciju i diferencijaciju hPDL-MSC u osteogenu liniju. S obzirom na višelinijiski potencijal hPDL-MSC, poslednjih godina se intenzivno proučava mogućnost primene

ovih ćelija u oblasti tkivnog inženjeringa dentalnih tkiva i regenerativnoj parodontalnoj terapiji (Maeda i sar. 2011). S druge strane, primena plazma tehnologije u oblasti inženjeringa kosti i parodontalnog tkiva do sada nije proučavana. Rezultati u okviru ovog istraživanja su pokazali da se plazma tretmanom značajno smanjuje proliferacija hPDL-MSC. Međutim, interesantno je da primenjena pod istim uslovima, NAP indukuje značajno povećanje aktivnosti ALP u ovim ćelijama. Kako je ALP rani marker osteogene diferencijacije, ovakav rezultat sugerise na to da plazma tretman podstiče osteogenu diferencijaciju hPDL-MSC. Kako se proces diferencijacije nadovezuje na smanjenje ćelijske proliferacije, možemo pretpostaviti da plazma indukuje smanjenje stope ćelijskog rasta, što rezultira povećanim nivoom diferencijacije. Danas se, osim otkrića da se indirektnim plazma tretmanom može uzrokovati apoptoza (Kieft i sar. 2006), nekroza (Kieft i sar. 2005) i odlepljivanje ćelija (Stoffels i sar. 2008), veoma malo zna o uticaju plazme na druge ćelijske funkcije, posebno na humane MSC i njihov kapacitet proliferacije i diferencijacije. Noviji podaci ukazuju na mogućnost plazma tehnologije da modifikuje fizičko-hemijske osobine površine biomaterijala, što predstavlja potencijalno efikasnu strategiju u kontroli različitih ćelijskih funkcija humanih MSC (Tan i sar. 2012) i mogućnost da se utiče na proliferaciju i diferencijaciju pre-osteoblastnih ćelija (Barradas i sar. 2012). Istraživanja koja su se praktično odvijala u isto vreme kao i naša, ukazala su takođe na potencijal NAP da podstakne osteogenu diferencijaciju matičnih ćelija, istovremeno suprimirajući njihovu proliferaciju (Freeman i sar. 2012). Ukoliko buduća istraživanja potvrde da plazma tretman usmerava i utiče na osteogenu diferencijaciju hMSC, NAP bi mogle da predstavljaju poželjnu i korisnu tehnologiju u oblasti regeneracije kosti i tkivnom inženjeringu, zajedno sa hPDL-MSC.

Kao što je napomenuto ranije, plazme je veoma teško kompletno okarakterisati i porediti. Osim toga, brojnost i različitost biološki aktivnih čestica u plazmi otežavaju ispitivanje njihovog efekta kao i objašnjavanje mehanizama kojim se specifični efekti postižu. ROS i RNS se često generišu u plazmama koje su pogodne za primenu u oblasti biomedicine i veruje se da ove vrste utiču na mnoge ćelijske odgovore (Morfill i sar. 2009). Novije studije ukazuju da na proliferaciju endotelih ćelija deluju ROS stvoreni plazma tretmanom (Kalghatgi i sar. 2010), tako da se može pretpostaviti da su ove reaktivne čestice uključene i u efekte NAP na proliferaciju i diferencijaciju hPDL-MSC. Utvrđeno je da je u slučaju NAP stvorene modifikovanom plazma iglom, NO dominantan hemijski aktivan molekul (Malović i sar. 2010). NO je uključen u sve

funkcije ćelija sisara (MacMicking i sar. 1997), pa i proliferaciju i diferencijaciju nervnih (Cheng i sar. 2003) i hematopoetskih matičnih ćelija (Epperly i sar. 2007, Krasnov i sar. 2008, Krstić i sar. 2010). Pored toga, postoje dokazi da je NO važan faktor u indukciji diferencijacije MSC (Ocarino i sar. 2008) i hPDL ćelija (Orciani i sar. 2009) u osteoprogenitorne ćelije sa specifičnim uticajem na povećanje ALP aktivnosti i formiranje mineralizovanih nodula (Mei i sar. 2007). Stoga su neophodna dalja intenzivna istraživanja usmerena na otkrivanje i razumevanje, kako osobina i karakteristika plazme koja utiču na specifične funkcije MSC, tako i mehanizama kojim NAP utiču na proliferaciju i diferencijaciju hPDL-MSK.

## 6. ZAKLJUČAK

- Niskotemperaturna amosferska plazma, stvorena modifikovanom plazma iglom, deluje baktericidno na bakterije u supenzijama različitih koncentracija, pri čemu ovo dejstvo direktno zavisi od primenjene snage plazme, vremena izlaganja i koncentracije suspenzija. Rezultati su pokazali da su ispitivane Gram-negativne bakterije, *E. coli* i *P. aeruginosa* osetljivije na dejstvo plazme od Gram-pozitivnih, *S. aureus* i *E. faecalis*.
- Utvrđeno je da niskotemperaturna atmosferska plazma deluje inhibitorno na produkciju biofilma bakterije MRSA. Ovaj inhibitorski efekat je u pozitivnoj korelaciji sa snagom plazme, protokom gasa, vremenom izlaganja a zavisao od veličine inokuluma.
- Pod uslovima koji su korišćeni u ovoj studiji nije utvrđen efekat niskotemperaturne atmosferske plazme na već formirani biofilm MRSA.
- Rezultati u okviru ovog istraživanja pokazali su da niskotemperaturna atmosferska plazma poseduje inhibitorski efekat na formiranje biofilma bakterije *S. mutans*, dok je efekat na već formirani biofilm bio zanemarljiv.
- Primenjena pod uslovima pod kojim ispoljava snažno antibakterijsko dejstvo, niskotemperaturna atmosferska plazma ne deluje citotoksično na humane mezenhimalne matične ćelije izolovane iz periferne krvi.
- Izolovane i kultivisane humane mezenhimalne matične ćelije iz periodoncijuma pokazale su tipične karakteristike mezenhimalnih matičnih ćelija izolovanih iz različitih izvora kao što su: sposobnost adhezije, fibroblastna morfologija, visok klonogeni potencijal, visok proliferativni kapacitet, multipotentni potencijal diferencijacije i ispoljavanje mezenhimalnih marker proteina..
- Analizom uticaja niskotemperaturne atmosferske plazme na ćelijske funkcije humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma, utvrđeno je da plazma stvorena modifikovanom plazma iglom, bez obzira na primenjene uslove, ne utiče značajno na vijabilnost i adhezivnost. Delovanjem plazme najveće snage, bez obzira na protok gasa i vreme izlaganja, smanjuje se migratorni potencijal i proliferacija humanih mezenhimalnih matičnih ćelija iz periodoncijuma, dok istovremeno značajno povećava aktivnost alkalne fosfataze, ranog markera osteogene diferencijacije mezenhimalnih matičnih ćelija.

---

## 7. LITERATURA

1. Aggarwal S, Pittinger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-1822.
2. Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *J Periodontol* 2008; 79: 387-393.
3. Alkawareek MY, Algwari QT, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, Gilmore BF. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65: 381-384.
4. Anderson MH, Molvar MP, Powell LV. Treating dental caries as an infectious disease. *Oper Dent* 1991; 16: 21-28.
5. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. *Trends Mol Med* 2010; 16: 203-209.
6. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J* 2000; 45: 235-245.
7. Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Res* 2000; 34: 144-150.
8. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J* 2000; 188: 476-482.
9. Barradas AM, Lachmann K, Hlawacek G, Frielink C, Truckenmoller R, Boerman OC, van Gastel R, Garritsen H, Thomas M, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J. Surface modifications by gas plasma control osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. *Acta Biomater* 2012; 8: 2969-2977.

10. Bartunek J, Behfar A, Vanderheyden M, Wijns W, Terzic A. Mesenchymal stem cells and cardiac repair: principles and practice. *J Cardiovasc Transl Res* 2008; 1: 115-119.
11. Baxter HC, Campbell GA, Whittaker AG, Jones AC, Aitken A, Simpson AH, Casey M, Bountiff L, Gibbard L, Baxter RL. Elimination of transmissible spongiform encephalopathy infectivity and decontamination of surgical instruments by using radio-frequency gas-plasma treatment. *J Gen Virol* 2005; 86: 2393-2399.
12. Becker K, Koutsospyros A, Yin SM, Christodoulatos C, Abramzon N, Joaquin JC, Brelles-Marino M. Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Contr Fusion* 2005; 47: B513-B523.
13. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 174: 249-282.
14. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells after antigen-presenting cell maturation and induced T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-2219.
15. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells revisiting history, concepts and assay. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 313-319.
16. Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R, van der Mullen J. Gas discharge plasmas and their application. *Spectrochimica Acta Part B* 2002; 57: 609-658.
17. Bogle MA. Plasma skin regeneration technology. *Skin Therapy Letter* 2006; 11: 7-9.
18. Boucher HW, Corey RG. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; 46: S344-S349.

19. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1-12.
20. Boudam MK, Moisan M, Saoudi B, Popovici C, Gherardi N, Massines F. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *J Phys D: Appl Phys* 2006; 39: 3494-3507.
21. Boxhammer V, Li YF, Köritzer J, Shimizu T, Maisch T, Thomas HM, Schlegel J, Morfill GE, Zimmermann JL. Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages. *Mutat Res* 2013; 753: 23-28.
22. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1654-60.
23. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19: 419-426.
24. Bridier A, Briandent R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 2011; 27: 1017-1032.
25. Brun J, Brun P, Vono M, Venier P, Tarricone E, Deligianni V, Martines E, Zuin M, Spagnolo S, Cavazzana R, Cardin R, Castagliuolo I, Valerio AL, Leonardi A. Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. *PLoS ONE* 2012; 7: e33245.
26. Buchanan LS. Cleaning and shaping the root canal system: negotiating canals to the termini. *Dentistry Today* 1994; 13: 76-81.
27. Bugarski D, Krstić A, Mojsilović S, Vlaški M, Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Milenković P. Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 156-63.



28. Calfee DP. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant entrococci, and other Gram-positives in healthcare. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 385-394.
29. Cao Z, Walsh JL, Kong MG. Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment. *Appl Phys Lett* 2009; 94: 021501.
30. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213: 341-347.
31. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
32. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem cells* 2007; 25: 2739-2749.
33. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* 2010; 31: 7892-7927.
34. Chen L, Wen Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 66-73.
35. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3016-3020.
36. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain *Dev Biol* 2003; 258: 319-333.
37. Cheruthezhkatt S, Cernak M, Slavicek P, Havel J. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *J Appl Biomed* 2010; 8: 55-66.

38. Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41: 124-129.
39. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mat Sci Eng R* 2002; 36: 143-206.
40. Ćirković I. Genotipska i fenotipska karakterizacije sojeva meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* izolovanih u Republici Srbiji, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2009.
41. Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille Michaud A. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 33275-33283.
42. Compton KT, Langmuir I. Electric discharges in gases, Part I. Survey of fundamental processes. *Rev Mod Phys* 1930; 2: 123-242.
43. Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci Technol* 2000; 9: 441-454.
44. Corcione AF, Benvenuto E, Ferretti D, Giunti V, Cappiello F, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107: 367-372.
45. Cos P, Toté K, Horemans T, Maes L. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 2279-2295.
46. Cotter JJ, Maguire P, Soberon F, Daniels S, O'Gara JP, Casey E. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *J Hosp Infect* 2011; 78: 204-207.

47. Daeschlein G, von Woedke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Junger M. Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment. *Plasma Process Polym* 2010; 7: 224-230.
48. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
49. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 2004; 79: 214-223.
50. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1928-1942.
51. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43: 1131-1138.
52. Desvarieux M, Demmer RT, Jacobs DR Jr, Rundek T, Boden-Albala B, Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *J Hypertens* 2010; 28: 1413-1421.
53. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.
54. Dinakaran S, Kayarkar VV. Debris on processed ophthalmic instruments: a cause for concern. *Eye* 2002; 16: 281-284.
55. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

- 
56. Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal biofilms: challenges and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6(2): 141-144.
  57. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
  58. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterwijk C, de Boer J. Therapeutic application of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(2): 101-115.
  59. Ekwall B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann NY Acad Sci* 1983; 407: 64-77.
  60. Epperly MW, Cao S, Yhang X, Franicola D, Shen H, Greenberger EE, Epperly LD, Greenberger JS. Increased longevity of hematopoiesis in continuous bone marrow cultures derived from NOS1 (nNOS, mtNOS) homozygous recombinant negative mice correlates with radioresistance of hematopoietic and marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2007; 35: 137-145.
  61. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva II, Shimizu T, Sysolyatina EV, Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol* 2011; 60: 75–78.
  62. Evans SM, Casartelli A, Herreros E, Minnick DT, Day C, George E, Westmoreland C. Development of a high throughput in vitro toxicity screen predictive of high acute in vivo toxic potential. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 579-584.
  63. Feng H, Sun P, Chai Y, Tong G, Zhang J, Zhu W, Fang J. The interaction of a direct-current cold atmospheric-pressure air plasma with bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci* 2009; 37: 121–127.

64. Fong EL, Chan CK, Goodman SB. Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials* 2011; 32: 395-409.
65. Fothergill JL, Winstanley C, James CE. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 219-235.
66. Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 227-238.
67. Freeman TA, Steinbeck MJ, Fridman G, Zhang J, Shainsky N, Friedman G, Fridman A. Nonthermal dielectric barrier discharge plasma enhances skeletal cell differentiation and autopad development. Book of abstract, ICPM4, Orleans, France, 2012.
68. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 2008; 5: 503-533.
69. Fridman G, Peddlinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gusol A, Brooks A. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process* 2006; 26: 425-442.
70. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
71. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47: 327-355.
72. Friedman A, Blecher K, Sanchez D, Tuckman-Vernon C, Gialanella P, Friedman JM, Martinez LR, Nosanchuk JD. Susceptibility of Gram-positive and -negative bacteria to novel nitric oxide-releasing nanoparticle technology. *Virulence* 2011; 2: 217-221.

- 
73. Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34: 1257-1269.
  74. Gennari A, van den Berghe C, Casati S, Castell J, Clemenson C, Coecke S, Colombo A, Curren R, Dal Negro G, Goldberg A, Gosmore C, Hartung T, Langezaal I, Lessigiarska I, Maas W, Mangelsdorf I, Parchment R, Prieto P, Sintes JR, Ryan M, Schmuck G, Stitzel K, Stokes W, Vericat JA, Gribaldo L. Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50. *Altern Lab Anim* 2004; 32: 437-459.
  75. Ghaffari A, Miller CC, McMullin B, Ghahary A. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric oxide* 2006; 14: 21-29.
  76. Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ, Burdick JS, Isenberg GA, Nakao NL, Peterson BT, Silverman WB, Slivka A, Kelsey PB. The argon plasma coagulator. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 807-810.
  77. Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E. Killing of *S. mutans* using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci* 2005; 34: 1317-1324.
  78. Goree J, Liu B, Drake D. Gas flow dependence for plasma-needle disinfection of *S. mutans* bacteria. *J Phys D: Appl Phys* 2006; 36: 3479-3486.
  79. Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Ag* 2008; 32(Suppl 1): S2-S9.
  80. Griffiths N. Low-temperature sterilization using gas plasmas. *Med Device Technol* 1993; 4: 37-40.
  81. Gronthos S, Mankani MH, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13625-13630.

- 
82. Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 115-181.
  83. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.
  84. Hammann A, Huebner NO, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, Kindel E, Koban I, Koch S, Kohlmann T, Lademann J, Matthes R, Müller G, Titze R, Weltmann KD, Kramer A. Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; 23: 328-332.
  85. Han G, Martinez LR, Mihi MR, Friedman AJ, Friedman JM, Nosanchuk JD. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. *PLoS ONE* 2009; 4: e7804.
  86. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 79-98.
  87. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, Shimizu T, Karrer S. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010; 8: 968-976.
  88. Henn GG, Birkinshaw C, Buggy M, Jones E. A comparison study of the effects of gamma-irradiation and ethylene oxide sterilization on the properties of compression moulded poly-D-L-lactide. *J Mat Sci Mater Med* 1996; 7: 591-595.
  89. Herrmann HW, Henins I, Park J, Selwyn GS. Decontamination of chemical and biological warfare agents using an atmospheric pressure plasma jet. *Phys Plasmas* 1999; 6: 2284-2289.
  90. Hill N, McQueen J, Morey R, Hanna L, Chandakas S, El-Toukhy T, Erian J. Over one thousand patients with early stage endometriosis treated with Helica Thermal Coagulator (HELICA): safety aspects. *J Arch Gynecol Obstet* 2006; 274: 203-205.

- 
91. Hoiby N, Ciofu O, Jahansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 55-65.
  92. Hong YF, Kang JG, Lee HY, Uhm HS, Moon E, Park YH. Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48: 33-37.
  93. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
  94. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932-8937.
  95. Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 975-986.
  96. In't Anket PS, Scherion SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-1549.
  97. Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 1088-1099.



- 
98. Jiang C, Schaudinn C, Jaramillo DE, Webster P, Costerton JW. *In vitro* antimicrobial effect of cold plasma jet against *Enterococcus faecalis* biofilms. *ISRN Dent* 2012; 2012: 295736.
  99. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120-4126.
  100. Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Mariño G. Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology* 2009; 155: 724-732.
  101. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U. Molecular pathways involved in neural *in vitro* differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 645-655.
  102. Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, Friedman G, Fridman A, Brooks AD. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Ch* 2011; 55: 1053-1062.
  103. Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD. Control of methicillin-resistant staphylococcus aureus in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control* 2010; 38: 293-301.
  104. Kalghatgi S, Friedman G, Friedman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* 2010; 38: 748-757.
  105. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLOS ONE* 2011; 6: e16270.

- 
106. Kalghatgi SU, Fridman G, Fridman A, Friedman G, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 2008: 3578-3581.
  107. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R, Trink B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Brit J Cancer* 2011; 105: 1295-1301.
  108. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009; 73: 338-344.
  109. Kieft IE, Darios D, Roks AJM, Stoffels E. Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description. *IEEE Trans Plasma Sci* 2005; 33: 771-775.
  110. Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma needle treatment of cultures cells *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34: 1331-1336.
  111. Kim ES, Ahn SY, Im GH, Sung DK, Park YR, Choi SH, Choi SJ, Chang YS, Oh W, Lee JH, Park WS. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates severe brain injury by permanent middle cerebral artery occlusion in newborn rats. *Pediatr Res* 2012; 72: 277-284.
  112. Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Welk A, Kramer A, Kocher T. Antimicrobial effects of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro-proof of principle experiment. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 956-965.
  113. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 204.

114. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 264-274.
115. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. *New Journal of Physics* 2009; 11: 115012.
116. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729.
117. Krasnov P, Michurina T, Packer MA, Stasiv Y, Nakaya N, Moore KA, Drazan KE, Enikolopov G. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the regulation of hematopoiesis. *Mol Med* 2008; 14: 141-149.
118. Krstić DA, Santibanez FJ, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G S, Milenković BP, Bugarski SD. Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol* 2010; 199: 31-41.
119. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153: 1133-1140.
120. Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 2003; 5: 41.
121. Laroussi M, Sayler B, Galscock B, McCurdy M, Pearce M, Bright N, Malott C. Images of biological samples undergoing sterilization by a glow discharge at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci* 1999; 27: 34-35.
122. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym* 2005; 2: 391-400.

- 
123. Laroussi M. Low temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans Plasma Sci* 2009; 37: 714-725.
  124. Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002; 30: 1409-1415.
  125. Lasa I. Towards the identification of common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* 2006; 9: 21-28.
  126. Lazović S, Puač N, Malović G, Đorđević A, Petrović ZLJ. Diagnostic of plasma needle properties by using mass spectrometry. *Chem Listy* 2008; 102: 1383-1387.
  127. Lazović S, Puač N, Miletić M, Pavlica D, Jovanović M, Bugarski D, Mojsilović S, Maletić D, Malović G, Milenković P, Petrović ZLJ. The effect of a plasma needle on bacteria in planktonic samples and on peripheral blood mesenchymal stem cells. *New J Phys* 2010; 12: 083037.
  128. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11-20.
  129. Lee K, Peak KH, Ju WT, Lee Y. Sterilization of bacteria, yeast and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol* 2006; 44: 269-275.
  130. Lee MH, Park BJ, Jin SC, Kim D, Han I, Kim J, Hyun SO, Chung KH, Park JC. Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *New J Phys* 2009; 11: 115022.
  131. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996; 245: 327-341.
  132. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* 1998; 278: 46-53.

133. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27: 128-142.
134. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(suppl 1): i29-i36.
135. Lockhart PB, Brennan MT, Thornhill M, Michalowicz BS, Noll J, Bahrani-Mougeot FK, Sasser HC. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc* 2009; 140: 1238-1244.
136. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-350.
137. Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Akamine A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium *Stem Cell Res Ther* 2011; 2: 33-36.
138. Malović G, Puač N, Lazović S, Petrović Z. Mass analysis of an atmospheric pressure plasma needle discharges. *Plasma Sources Sci Technol* 2010; 19: 034014.
139. McCulloch CA. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: The role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1995; 1: 271-278.
140. McCulloch CA. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 1985; 211: 258-262.
141. Mei YF, Yamaza T, Atsuta I, Danjo A, Yamashita Y, Kido M A, Goto M, Akamine A, Tanaka T. Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars *Cell Tissue Res* 2007; 328: 117-127.
142. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619-4621.

- 
143. Melcher AH. Cells of periodontium: Their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 1985; 67: 130-131.
144. Mendis DA, Rosenberg M, Azam F. A note on possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 28: 1304-1306.
145. Metcalf D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells* 2007; 25: 2390-2395.
146. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1364-1369.
147. Miletić M, Mojsilović S, Okić Đorđević I, Maletić D, Puač N, Lazović S, Malović G, Milenković P, Petrović ZLJ, Bugarski D. Effects of non-thermal atmospheric plasma on human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Phys D: Appl Phys* 2013; 46: 345401.
148. Miletić M, Mojsilović S, Okić Đorđević I, Kukulj T, Jauković A, Sanibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. *ABS* 2014; 66 (u štampi).
149. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807-5812.
150. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharmaceut* 2001; 226: 1-21.
151. Moisan M, Barbeau J, Crevier MC, Pelletier J, Philip N, Saudi B. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 2002; 74: 349-358.

- 
152. Montie C, Kelly WK, Roth R. Overview of research using the one-atmosphere uniform glow discharge plasma for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 28: 41-50.
  153. Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Lab Sci* 2011; 24: 43-46.
  154. Moreau M, Orange N, Feuilleley MGJ. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotech Adv* 2008; 26: 610-617.
  155. Morfill GE, Kong MG, Zimmermann JL. Focus on plasma medicine *New J Phys* 2009; 11: 115011-115019.
  156. Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt HU. Nosocomial infections – a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J Phys* 2009; 11: 115019.
  157. Morszeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 113-118.
  158. Morsezeck C, Peterson J, Völlner F, Driemel O, Reichert T, Beck HC. Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis* 2009; 30: 1175-1184.
  159. Mrozik K, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. A method to isolate, purify, and characterize human periodontal ligament stem cells. *Methods Mol Biol* 2010; 666: 269-284.
  160. Munita JM, Arias CA, Murray BE. Enterococcal endocarditis: can we win the war? *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14: 339-349.
  161. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3464-3474.

- 
162. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Naguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2006; 41: 303-310.
163. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; 18: 263-272.
164. Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide* 2008; 19: 320-325.
165. Orciani M, Trubiani O, Vignini A, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Salvolini E. Nitric oxide production during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Acta Histochem* 2009; 111: 15-24.
166. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988; 10: 63-76.
167. Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010; 90: 67-74.
168. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 159-166.
169. Pittenger MF, Bradley JM. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutic. *Circ Res* 2004; 95: 9-20.
170. Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.



171. Preshaw PM, Hefti AF, Novak MJ, Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Schoor R, Trummel CL, Dean J, Van Dyke TE, Walker CB, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline enhances the efficacy of scaling and root planing in chronic periodontitis: a multicenter trial. *J Periodontol* 2004; 75: 1068-1076.
172. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
173. Psaltis PJ, Zannettino ACW, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: Mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 2008; 26: 2201-2210.
174. Puač N, Petrović ZLj, Malović G, Đorđević A, Živković S, Giba Z, Grubišić D. Measurements of voltage-current characteristics of a plasma needle and its effects on plant cells. *J Phys D: Appl Phys* 2006; 39: 3514-3519.
175. Radetić M, Petrović Z. Mogućnost primene plazma tehnologije u modifikovanju polimernih i tekstilnih materijala. *Hem Ind* 2004; 58: 55-63.
176. Ritts AC, Li H, Yu Q, Xu C, Yao X, Hong L, Wang Y. Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 510-516.
177. Roberts AP, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 1441-1450.
178. Rossi F, Kylian O, Rauscher H, Hasiwa M, Giliand D. Low pressure plasma discharges for the sterilization and decontamination of surfaces. *New J Phys* 2009; 11: 115017.
179. Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schafer B, Schubert A, Feldmann U, Schindler A. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol* 2010; 59: 206-212.

180. Salamitou S, Kirkpatrick MJ, Ly HM, Leblon G, Odic E, DuBow MS. Augmented survival of bacteria within biofilms to exposure to an atmospheric pressure non-thermal plasma source. *Biotechnology* 2009; 8: 228-234.
181. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010; 28: 585-596.
182. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109: 228-234.
183. Scanu M, Mancuso L, Cao G. Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity test. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 1989-1995.
184. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* 2012; 3: 271-279.
185. Scholtz V, Julak J, Kriha V, Mosinger J, Kopecka S. Decontamination effects of low-temperature plasma generated by corona discharge. Part II: new insights. *Prague Med Rep* 2007; 108: 128-146.
186. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
187. Šešlak B. “Određivanje sastava vazduha pri ambijentalnim uslovima pomoću kvadrupolnog masenog spektrometra HPR60”, Diplomski rad, Univerzitet u Beogradu, 2009.
188. Shashurin A, Keidar M, Bronnikov S, Jurjus RA, Stepp MA. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Appl Phys Lett* 2008; 93: 181501.
189. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-199.

- 
190. Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, Georgi M, Stolz W, Schmidt HU, Urayama T, Fujii S, Morfill GE. Characterization of microwave plasma torch for decontamination. *Plasma Process Polym* 2008; 5: 577-582.
  191. Shintani H, Sakudo A, Burke P, McDonnell G. Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action (Review). *Exp Ther Med* 2010; 1: 731-738.
  192. Simpson TC, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Mills EJ. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 5: CD004714.
  193. Sitherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework *Microbiology* 2001; 147: 3-9.
  194. Sladek RE, Filoche SK, Sisson CH, Stoffels E. Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with non-thermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45: 318-323.
  195. Sladek REJ, Stoffels E, Walraven R, Tielbeek PJA, Koolhoven RA. Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Trans Plasma Sci* 2004; 32: 1540-1543.
  196. Smith A, Dickson M, Aitken J, Bagg J. Contaminated dental instruments. *J Hosp Infect* 2002; 51: 233–235.
  197. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55.
  198. Sohbatzadeh F, Hosseinzadeh CA, Mirzanejhad S, Mahmodi S. *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus* bacteria sterilization using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160: 1978-1984.

- 
199. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34: 166-171.
200. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24: 74-85.
201. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
202. Steelman VMG. Ethylene oxide: the importance of aeration. *AORN J* 1992; 55: 773-787.
203. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Đukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115: 891-899.
204. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
205. Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW, Kroesen GMW. Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio) materials. *Plasma Sources Sci Technol* 2002; 11: 383-388.
206. Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sources Sci Technol* 2006; 15: S169-180.
207. Stoffels E, Roks AJM, Deelman LE. Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells. *Plasma Process Polym* 2008; 5: 599-605.

- 
208. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *OOOOE* 1998; 85: 86-93.
209. Tan F, O'Neill F, Naciri M, Dowling D, Al-Rubeai M. Cellular and transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cell response to plasma-activated hydroxyapatite coating. *Acta Biomater* 2012; 8: 1627-1638.
210. Till J, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-222.
211. Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Djordjević IO, Santibanez JF, Jovčić G, Terzić M, Bugarski D. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek* 2013; 141: 178-186.
212. Trompeter FJ, Neff WJ, Franken O, Heise M, Neiger M, Liu SH, Pietsch GJ, Saveljew AB. Reduction of *Bacillus Subtilis* and *Aspergillus Niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2002; 30: 1416-1423.
213. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, Sobilo J, Gosset D, Kieda C, Legrain B, Pouvesle JM, Pape AL. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer* 2012; 130: 2185-2194.
214. Wang R, Zhou H, Sun P, Wu H, Pan J, Zhu W, Zhang J, Fang J. The Effect of an atmospheric pressure, DC nonthermal plasma microjet on tooth root canal, dentinal tubules infection and reinfection prevention. *Plasma Medicine* 2011; 1: 143-155.
215. Watson JP, Bennett MK, Griffin SM, Mattewson K. The tissue effect of argon plasma coagulation on esophageal and gastric mucosa. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 342-345.

- 
216. Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C. Staphylococcus aureus determinants for nasal colonization. *Trends Microbiol* 2012; 20: 243-250.
217. Weltz C, Becker S, Li YF, Shimizu T, jeon J, Schwenk-Zieger S, Thomas HM, Isbary G, Morfill GE, Harreus U, Zimmermann JL. Effects of cold atmospheric plasma on mucosal tissue culture. *J Phys D: Appl Phys* 2013; 46: 045401.
218. Wende K, Landsberg K, Lindequist U, Weltmann KD, von Woedtke T. Distinctive activity of a nonthermal atmospheric-pressure plasma jet on eukaryotic and prokaryotic cells in a cocultivation approach of keratinocytes and microorganisms. *Plasma Science, IEEE Transactions on* 2010; 38(9): 2479-2485.
219. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; 65: 22-26.
220. Yonson S, Coulombe S, Leveille V, Leask RL. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *J Phys D: Appl Phys* 2006; 39: 3508-3513.
221. Yu H, Perni S, Shi JJ, Wang DZ, Kong MG, Shama G. Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric plasma inactivation of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 1323-1330.
222. Zhang TC, Bishop PL. Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm. *Wat Environ Res* 1996; 68: 1107-1115.
223. Zimmermann JL, Shimizu T, Schmidt HU, Li YF, Morfill GE, Isbary G. Test for bactericidal resistance build-up against plasma treatment. *New J Phys* 2012; 14: 073037.
224. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2002; 7: 211-228.

## BIOGRAFIJA

Maja Miletić rođena je 04. 08. 1970. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 1996. godine sa prosečnom ocenom 8, 86. Obavezni staž je obavila na Stomatološkom fakultetu i položila stručni ispit (1997. god.).

Magistarsku tezu pod nazivom „Značaj ispitivanja anti alfa-fodričkih antitela i IL-17 u serumu bolesnika sa primarnim Sjögrenovim sindromom“ pod mentorstvom Prof. dr Pavla Milenkovića odbranila je 2005. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Na Stomatološkom fakultetu na predmetu Patološka fiziologija zaposlena je od 1997.godine, a u zvanje asistenta izabrana 2008.godine. Kao saradnik je bila angažovana na projektu TR23016: „Primena plazma igle u medicinskim i biološkim istraživanjima i brza i pouzdana detekcija volatilnih supstanci humanog i biljnog porekla“ (2008-2010), a od 2010. godine uključena na projekat III 41011: „ Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini, zaštite čovekove okoline i nanotehnologijama“ Ministarstva za prosvetu i nauku (2010-2013).

Do sada je objavila 5 radova u celini u časopisima indeksiranim na SCI i CC listi (3 M21 i 2 M23) i 17 radova radova saopštenih na međunarodnim skupovima i štampanih u izvodu.

U Beogradu,  
25. 11. 2013. godine

mr sci. stom dr Maja P. Miletić

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Maја Miletić \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

**„Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26. 11. 2013. god.

 \_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Maја Miletić

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада „Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije“

Ментор Prof. dr Dragana Vuković \_\_\_\_\_

Потписани Maја Miletić

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26. 11. 2013. god.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26. 11. 2013. god.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.