

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY

**VYUŽITIE PLAZMOU AKTIVOVANEJ VODY PRI
TERAPII INFEKCIÍ MOČOVÝCH CIEST**

Vedecký článok

2020

S. Pásztor, E. Tóthová, Z. Machala

Abstrakt: V tejto práci sme testovali účinky plazmou aktivovanej vody (PAV) pri terapii infekcií močových ciest. PAV je voda alebo fyziologický roztok, ktorá bola opracovaná studenou plazmou prechodového iskrového výboja v bežnom vzduchu pri atmosférickom tlaku. Účinky PAV sme porovnávali s kontrolným fyziologickým roztokom (FYZ 0,15 M NaCl, PBS – Phosphate Buffered Saline). Sledovali sme inhibičný účinok PAV na množenie baktérií pri rôznej koncentrácii baktérií (10^1 - 10^8 CFU/ml) a pri rôznom pomere medzi PAV/FYZ a roztokom živného média s baktériami. Experimenty sme vykonávali na uropatogénnom kmeni baktérií *Escherichia coli* (UTI). Testovanie prebiehalo v dvoch modeloch experimentov. Prvým modelom bolo *in vitro* testovanie, ktoré prebiehalo na 96-jamkových mikrotitračných platničkách, v ktorých sme spektrofotometricky merali absorbanciu vzoriek zodpovedajúcu počtu baktérií. Druhým modelom bolo *in vivo* testovanie, ktoré sme vykonávali na samiciach myší. Myši sme infikovali UTI a následne sme aplikovali PAV/FYZ do močového mechúra. Po určenom čase sme z myší vybrali močový mechúr a obličky, ktoré sme následne zhomogenizovali a homogenát sme vysievali na misky so živným médiom, na ktorých sme po čase inkubácie počítali vyrastené kolónie. Kvantitatívne sme tak hodnotili účinok PAV v živom organizme.

Z výsledkov *in vitro* experimentov vyplýva, že PAV má najúčinnjšie dezinfekčné účinky, ak sa nachádza vo vzorke v objemovej prevahe. Pri použitom pomere 1:9 (UTI:PAV), sme dosiahli najlepšie výsledky, čo znamená, že počet baktérií u vzoriek s PAV, oproti vzorkám s FYZ, v čase nerástol alebo rozdiel medzi oboma vzorkami po 8-hodinovej inkubácii bol výrazne nižší pre PAV.

Z výsledkov *in vivo* experimentu vyplýva, že PAV mala účinok pri inhibovaní množenia baktérií v močovom mechúre myší, o 1 log. Na základe tohto predpokladáme, že PAV zabránila rozvinutiu infekcie obličiek.

Kľúčové slová: plazmou aktivovaná voda (PAV), infekcia močových ciest, *Escherichia coli*, , spektrofotometria, *in vitro* a *in vivo* experiment

1 Úvod

Od objavenia štvrtého skupenstva uplynulo už veľa času (Irving Langmuir Researchlaboratory et al. 1928), no až v posledných rokoch začal rásť záujem o plazmu a jej využitie takmer vo všetkých sférach života človeka. Či už ide o vysokoteplotnú plazmu, s ktorou sa stretávame pri experimentoch s riadenou termonukleárnou syntézou (Ichimaru

1993; Balet et al. 1992), alebo o nízko teplotnú (netermickú) plazmu, ktorá si v súčasnosti začína získavať stále väčšiu pozornosť vedeckých tímov z celého sveta. Jej využitie je veľmi široké, najmä v oblasti medicíny a biológie, pričom hlavným dôvodom je jej nízka teplota, ktorá nepoškodzuje tkanivá v porovnaní s vysokoteplotnou plazmou a samozrejme jej antibakteriálne účinky (Shen et al. 2016; Machala et al. 2013). Tímy vedcov z celého sveta nesústredujú svoje úsilie iba na medicínske využitie plazmy. Rovnako sa testuje jej účinok pri dekontaminácii povrchov (Sakudo et al. 2019), znečistených odpadových vôd (Yehia et al. 2020), dlhodobé uchovávanie jedál a nápojov, ako náhrada tepelnej pasterizácie (Kamgang-Youbi et al. 2009).

Najväčším prínosom však ostáva pokrok v medicínskej oblasti využitia nízko teplotnej plazmy (Hensel et al. 2015). Konkrétne sa výskumy sústreďujú na liečbu rakovinu (navodzovanie apoptózy rakovinových buniek (Tanaka et al. 2012; Li et al. 2017; Tanaka et al. 2016)), dezinfekciu rán plazmou aktivovanou vodou (Xu et al. 2020; Kubinova et al. 2017) alebo liečbu zubných kazov a v neposlednom rade je liečba rôznych infekcií (Dobrynin et al. 2011) (Rupf et al. 2010).

Ďalšou oblasťou využitia plazmou aktivovanej vody je využitie v poľnohospodárstve. Testujú sa rôzne spôsoby aplikácie PAV, či už na semená alebo prípadne sa samotnou PAV polievajú rastliny (Sarinont et al. 2017; Ma et al. 2016).

Najväčším problémom pri liečbe bakteriálnych infekcií je stále sa zvyšujúca rezistencia baktérií na antibiotiká (Howden et al. 2014; Boyanova and Mitov 2013). Tento trend núti lekárov podávať pacientom stále silnejšie antibiotiká, čím sa zhoršujú aj vedľajšie účinky na pacienta, keďže antibiotikum nepôsobí iba lokálne, ale systémovo. Preto sa v posledných rokoch vyvíjajú snahy nájsť alternatívu k antibiotickej liečbe bakteriálnych infekcií. Najlepšie by bolo vyvinúť liečbu, ktorá lokálne ničí pôvodcu ochorenia a neovplyvňuje systém ako taký, zároveň by však bola účinná a nespôsobovala by poškodenie alebo deštrukciu okolitého zdravého tkaniva. Ako alternatíva sa objavila terapia plazmou aktivovanou vodou (PAV) (Ikawa et al. 2016). Mnohé predošlé experimenty ukázali, že PAV má antibakteriálne účinky a je schopná zastaviť rast alebo inaktivovať baktérie bez toho, aby patogénne pôsobila na zdravé tkanivo (Royintarat et al. 2020; Xu et al. 2020). Výhodou liečby PAV je, že pôsobí lokálne, čím neničí fyziologickú mikrobiotu tráviaceho systému, a tak nespôsobuje kolaps systému.

Cieľom našej práce je experimentálne overiť účinky PAV pri terapii infekcií močových ciest spôsobených uropatogénnym kmeňom baktérie *Escherichia coli* (Ahmed et

al. 2019). Dôležité nebude dokázať dezinfekčný účinok PAV len na samotné baktérie v *in vitro* experimente, ale oveľa dôležitejšie bude dokázať vplyv PAV na baktérie v živom systéme po rozvinutí infekcie. Tento model sme testovali na samičkách myší. Práve testovaním na myšacom modeli sme sa chceli čo najviac priblížiť klinickému testovaniu. Dôležitosť týchto experimentov rastie každým rokom so zvyšujúcim sa výskytom infekcií močových ciest najmä u žien a starších ľudí. Potvrdením účinkov PAV pri liečbe môžeme predísť epidémiám a ďalšiemu zvyšovaniu rezistencie baktérií na antibiotiká.

2 Materiál a metódy

Všetky experimenty pozostávali z dvoch krokov. Prvým bola príprava plazmou aktivovanej vody (PAV) a druhým bola samotná mikrobiologická časť. Príprava PAV prebiehala na Oddelení fyziky životného prostredia (Katedra astronómie, fyziky Zeme a meteorológie), Fakulty matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského. Mikrobiologickú časť experimentov sme vykonávali na Ústave molekulárnej biomedicíny, Lekárskej fakulty, Univerzity Komenského.

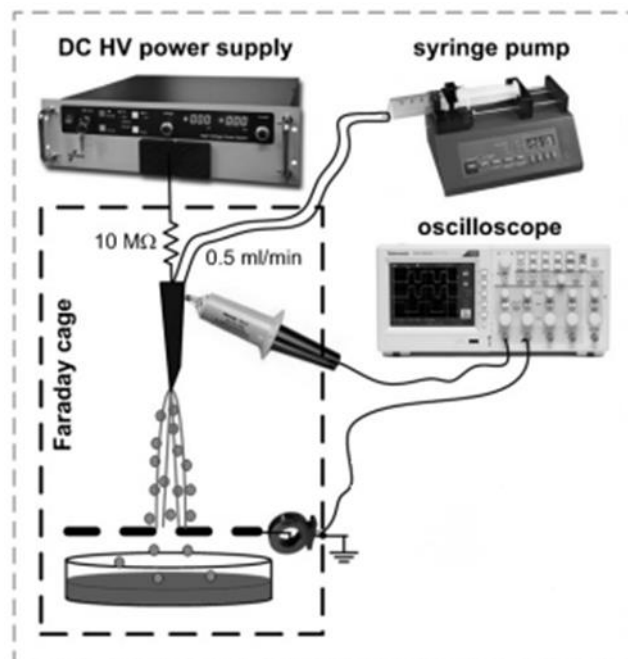
Uropatogénne baktérie *Escherichia coli*, na ktorých sme testovali účinky PAV, nám dodal Ústav molekulárnej biomedicíny.

2.1 Výroba plazmou aktivovanej vody

Výroba plazmou aktivovanej vody prebiehala na Fakulte matematiky, fyziky a informatiky, Univerzity Komenského. Použitá aparátúra je schematicky zobrazená na obrázku 1. Pomocou tejto aparatúry sme generovali prechodovú iskru vo vzduchu s elektrosprejovanou vodou. Zloženie aparatúry je nasledovné:

- vysokonapäťový zdroj jednosmerného napätia: $I_{\max} = 30\text{mA}$, $U_{\max} = 25\text{kV}$
- vysokonapäťová sonda Tektronix P6015A s parametrami: $R = 100\text{M}\Omega$, $C = 3\text{pF}$, 1000x (označuje koľkokrát je znížené merané napätie pri zobrazení na osciloskope). Sonda nám umožňuje merať napätie vo výboji aj mimo napäťového rozsahu osciloskopu.
- rezistor s odporom 1Ω a koaxiálny kábel s impedanciou 50Ω na meranie elektrického prúdu vo výboji ako spádu napätia na ňom
- digitálny osciloskop Tektronix TBS 2000 Series Digital Oscilloscope, 100 MHz, 1 GS/s; 4 kanálový; použitie na grafickú vizualizáciu prúdovej a napäťovej charakteristiky elektrického výboja

- elektrická syringe pumpa NE-300 s injekčnou striekačkou s objemom 12ml, ktorá umožňuje zachovať a kontrolovať konštantný prietok kvapaliny cez hadičku do ihly a ňou priamo do výboja
- elektródy tvoriace sústavu mriežka – ihla, pričom ihla je napojená na zdroj vysokého napätia a mriežka je cez odpor pripojená na osciloskop, voda pumpovaná cez ihlu prechádza v malých kvapkách cez výboj a padá na mriežku a je zachytávaná do Petriho misky
- celá aparátúra je uložená do Faradayovej klietky; Faradayova klietka je uzemnená, aby sa odviezol indukovaný elektrický náboj; zároveň ako ochrana pred rušivými vplyvmi elektrického poľa z okolia, ale rovnako odtieňuje a chráni všetko ostatné v okolí elektrického výboja, ktorý generuje silné elektrické pole



Obrázok 1 Schéma aparátúry použitej pri výrobe PAV metódou elektro sprejovania (Machala et al. 2013)

Pri výrobe PAV sme opracovávali fyziologický roztok, 0,9% roztok chloridu sodného (NaCl), ktorý sa využíva v zdravotníctve a po podaní nespôsobuje zmeny v organizme, vďaka zachovaniu osmotickej rovnováhy. Pre naše potreby však tento opracovaný fyziologický roztok budeme volať voda a označovať ho budeme skratkou PAV. Pri príprave PAV sme používali ako elektrický výboj prechodovú iskru. Jednou elektródou bola dutá hypodermická ihla, cez ktorú sme sprejovali vodu na druhú elektródu, ktorou bola kovová mriežka. Vzďialenosť týchto dvoch elektród bola 1 cm. Dôležité bolo nastaviť

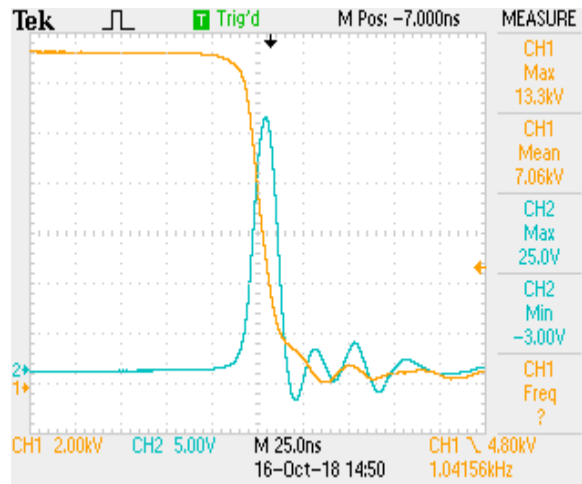
vzdialenosť elektród čo najpresnejšie, pretože čím väčšia je ich vzájomná vzdialenosť, tým väčšie napätie potrebujeme na vytvorenie výboja. Rovnako aj prechádzajúci prúdový pulz je oveľa väčší. Na druhej strane sa so zvyšujúcou vzdialenosťou a stálym napätím znižuje frekvencia. Dutá ihla bola napojená na vysokonapäťový zdroj a napäťovú sondu, ktorej výstup išiel priamo do osciloskopu. Kovová mriežka bola cez odpor pripojená na osciloskop (parametre sú popísané v použitej aparatúre), ktorým sme v čase zaznamenávali priebeh prúdu a napätia, ako aj ich hodnoty a frekvenciu, s akou sa menili. Práve frekvencia bola veličina, ktorá nás zaujímala najviac, pretože sme sa snažili udržiavať napätie zdroja tak, aby hodnoty frekvencie boli blízko 1 kHz.

Na pumpovanie fyziologického roztoku zo striekačky do ihly sme používali Syringe pumpu. Prietok fyziologického roztoku ihlou bol 0,5 ml/min. Prietok sme nastavili na pumpe a ten ostal po celú dobu experimentu konštantný. Plazmou aktivovanú vodu sme zachytávali do Petriho misky a následne, po vyprázdnení celého objemu striekačky, sme obsah misky prepipetovali do vopred vysterilizovaných skúmaviek eppendorf. Tieto boli v predstihu vložené do pohára s vodou a zmrazené, aby po naplnení PAV táto čo najskôr zmrzla, a tak sa znížila aktivita a rozpad reaktívnych častíc v nej.

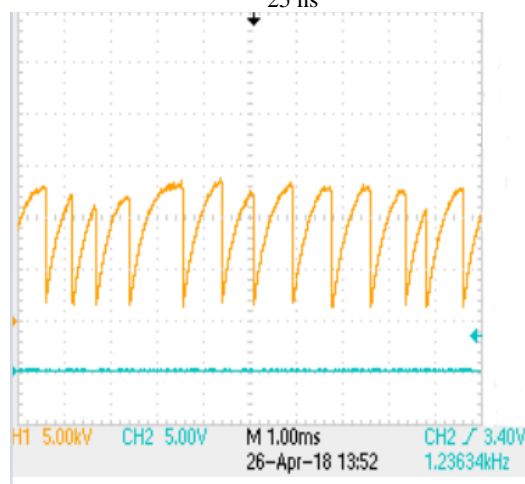
Striekačky, hadičky, Petriho miska, špičky pipety a skúmavky boli vždy deň pred experimentom vysterilizované v autokláve



Obrázok 2 Plazmový výboj použitý na prípravu PAV (prechodová iskra s elektrosprejom vody)



Obrázok 3 Prechodová iskra - Výstup z digitálneho osciloskopu, modrá - prúdový pulz, oranžová – napätie; vzorkovanie 25 ns



Obrázok 4 Prechodová iskra - Výstup z digitálneho osciloskopu, viac opakujúcich sa napät'ových pulzov počas dlhšej doby vzorkovania 1 ms

2.2 Mikrobiologická časť experimentu

2.2.1 Spektrofotometria

Spektrofotometria je metóda poskytujúca kvantitatívnu analýzu vzorky na základe intenzity prechádzajúceho elektromagnetického žiarenia analyzovaným roztokom. Pri prechode žiarenia sledovanou látkou dochádza k excitácii molekúl a absorpcii žiarenia. Z tohto dôvodu je spektrofotometria zaraďovaná do absorpčnej spektrálnej analýzy vo viditeľnej a UV oblasti, čo zodpovedá vlnovým dĺžkam 200 – 800 nm.

Vlastnosti spektrofotometrickej metódy sme využívali v našom experimente. Zamerali sme sa na využitie metódy stanovovania nízkych koncentrácií farebných látok. Z hľadiska stanovovania koncentrácie látok sa sleduje závislosť absorbancie od koncentrácie roztoku pri konštantnej vlnovej dĺžke (vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky) a konštantnej hrúbke vrstvy roztoku. $A=f(c)$. (FMED UK, 2019)

V našich podmienkach to znamenalo, že sme merali absorbanciu roztoku baktérií s PAV pri vlnovej dĺžke 600 nm (žltá až oranžová farba). Pri tejto vlnovej dĺžke dosahuje roztok baktérií *Escherichia Coli* svoje absorpčné maximum. Použitou metódou sme kvantitatívne hodnotili účinky PAV na inhibíciu rastu baktérií. Vychádzali sme z predpokladu, že hodnoty absorbancie vzoriek s PAV ostanú počas celej doby merania stabilné a naopak absorbancia kontrolných vzoriek bude v čase rásť.

Nami používaný prístroj na meranie absorbancie nočnej kultúry bol BioPhotometer (Eppendorf), výška centra svetla 8,5 mm (obrázok 5).



Obrázok 5 Spektrofotometer BioPhotometer Eppendorf

In vitro experiment: Mikrobiologická časť experimentu prebiehala na ústave molekulárnej biomedicíny Lekárskej fakulty Univerzity Komenského. Pripravenú PAV sme odložili na čas prípravy platničiek a riedení baktérií do mrazničky. Deň pred experimentom sme naočkovali uropatogénny kmeň baktérií *Escherichia Coli* (*E. Coli*) do tekutého LB média. Ďalej sme odmerali hodnotu absorbancie nočnej kultúry baktérií. Následne sme túto absorbanciu doriedili na hodnotu 0,566 kvôli zachovaniu postupu a rovnakých podmienok jednotlivých experimentov. Táto absorbancia zodpovedala $4,53 \times 10^8$ buniek/ml. Pripravu riedenia baktérií a pipetovanie vzoriek do mikrotitračných platničiek sme vykonali podľa platničkovej predlohy (obrázok 7). Pokračovali sme pipetovaním LB média a fyziologického roztoku do meracích platničiek (mikrotitračné platničky, v ktorých sa nachádzali vzorky baktérií, a ktorých absorbanciu sme merali). Ako fyziologický roztok sme používali 0,9% roztok chloridu sodného (*NaCl*). Po ukončení pipetovania LB média a fyziologického roztoku sme meracie platničky nechali vyžiarit' nad UV lampou, čím sme znížili pravdepodobnosť kontaminácie vzoriek. V čase, kedy boli meracie platničky pod UV svetlom sme pripravili desiatkové riedenia baktérií. Do prvého riadku platničky sme

napipetovali 200 μl baktérií z nočnej kultúry nariadenej na roztok s hodnotou absorbančie 0,566. Do zvyšných siedmich riadkov sme napipetovali najprv 180 μl LB média a následne sme pipetovali 20 μl z neriedenej nočnej kultúry z prvého riadku do druhého riadku. Tým sme pôvodnú koncentráciu baktérií v nočnej kultúre zriedili desaťkrát. To znamená, že ak pôvodná koncentrácia baktérií v nočnej kultúre s absorbančiou 0,566 bola $4,53 \times 10^8$, tak desaťkrát zriedená bola nižšia o jeden rád a teda 10^7 . Koncentráciu buniek *E. coli* sme vypočítali kalkulačkou na prepočet optickej hustoty roztoku na počet CFU (angl. - colonies forming units). Optickú hustotu pre monochromatický svetelný lúč s vlnovou dĺžkou 600 nm sme zmerali sprektrofotometrom. Po prepipetovaní z prvého do druhého riadku sme v druhom riadku vzorku rozsuspendovali pomocou pipety. Takto sme pokračovali aj v ostatných riadkoch. Nakoniec sme v poslednom riadku dostali koncentráciu baktérií $10^0 - 10^1$. Po skončení príprav riedení baktérií sme priniesli vyžiarené meracie platničky a napipetovali sme desiatkovo riedené baktérie podľa objemov z platničkovej predlohy. Pred pipetovaním baktérií do druhej meracej platničky sme vybrali skúmavky s PAV z mrazničky a nechali ich rozmraziť v laboratóriu pri laboratórnej teplote. Obsah skúmaviek sme vyliali na Petriho misky, z ktorých sme PAV následne pipetovali do meracích platničiek. Celkový čas od vybratia PAV z mrazničky až po napipetovanie do poslednej jamky bol v priemere 20 minút. Všetky vzorky v meracích platničkách sme následne nechali inkubovať 10 minút pri teplote 22°C. Po desaťminútovej inkubácii sme platničky vložili do platničkového spektrofotometra Synergy H1 Microplate Reader BioTek, v ktorom sme odmerali absorbančiu vzoriek. Následne sme meracie platničky vložili na jednu hodinu do platničkového inkubátora BioSan PST-100HL Thermo Shaker, v ktorom sa inkubovali pri teplote 37°C. Po jedn hodinovej inkubácii sme opäť odmerali absorbančiu vzoriek v platničkách. Tento proces sme opakovali 4 hodiny. Po štyroch hodinách sme platničky nechali inkubovať dvakrát po dve hodiny, a tak sme merali absorbančiu po šiestich a ôsmich hodinách od prvého merania. Tento model merania a inkubovania sme použili pri posledných troch opakovaných experimentoch.

V každej meracej platničke boli okrem vzoriek baktérií s PAV, respektíve s fyziologickým roztokom aj vzorky iba fyziologického roztoku, iba PAV a iba tekutého média (LB Broth). Rovnako boli v jednom, prípadne v dvoch stĺpcoch, podľa priestoru na platničke, aj baktérie s tekutým médiom v pomere 1:1, 100 μl baktérií: 100 μl LB. Tieto čisté vzorky použitých médií nám slúžili na kontrolu, či je naša práca sterilná a zároveň, či

baktérie, ktoré používame sú schopné množenia sa. Okrem vzorky s baktériami sme očakávali, že hodnoty absorbcie nebudú rásť a ostanú stále počas celého experimentu.

| 2. platňa | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|----------|----------|------------------------------|
| | BAK(10) + LB(10) + PAV(180) | BAK(10) + LB(10) + PAV(180) | BAK(10) + LB(10) + FYZ(180) | BAK(10) + LB(10) + FYZ(180) | BAK(33) + LB(33) + PAV(134) | BAK(33) + LB(33) + PAV(134) | BAK(33) + LB(33) + FYZ(134) | BAK(33) + LB(33) + FYZ(134) | LB(200) | FYZ(200) | PAV(200) | 0,5 BAK(100) + LB(100) |
| A | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| B | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| C | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| D | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| E | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| F | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| G | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| H | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-PAV | BAK-LB-PAV | BAK-LB-FYZ | BAK-LB-FYZ | | | | BAK - LB |
| objemy mikroliter | PAV 6624 | FYZ 5760 | BAK 2864 | LB 4464 | | | | | | | | |

Obrázok 5 Predloha meracej 96-jamkovej platničky s pipetovanými objemami

In vivo: Rovnako ako *in vitro*, tak aj *in vivo* experiment prebiehal na Ústave molekulárnej biomedicíny Lekárskej fakulty Univerzity Komenského.

Testovali sme účinky PAV v živom organizme, konkrétne na myšiach, pričom išlo o akútny model vyvolaného zápalu. Na experiment sme použili 16 myšacích samičiek. Samičky sme používali kvôli jednoduchšiemu infikovaniu, ktoré sme vykonávali kaniláciou cez močovú rúru, priamo do močového mechúra. Pri samcoch by sa jednalo o zložitejší zákrok, ktorý by si vyžadoval zložitejší chirurgický zákrok.

Myši boli rozdelené do štyroch skupín. Kontrolná skupina (CTRL) obsahovala 2 myši. UTI skupina obsahovala 4 myši. Obe skupiny UTI + PAV a UTI + FYZ obsahovali zhodne po 5 myši.

UTI + PAV: myši sú nainfikované a preplachované PAV

UTI + FYZ: myši sú nainfikované a preplachované fyziologickým roztokom

UTI: myši sú nainfikované a nepreplachované

CTRL: myši nie sú nainfikované a ani preplachované

Celý experiment s prípravou a záverečným počítaním vyrastených kolónií trval 5 dní. Začali sme prípravou nočnej kultúry z baktérií *E. coli*. Zároveň sme myši odvážili, rozdelili ich do skupín (Tabuľka 1 a Tabuľka 2) podľa hmotnosti a dátumu narodenia (mladšie myši sme nemiešali so staršími a naopak) a označili sme ich na chvostoch pásikmi od 0 po 4.

Tabuľka 1 Rozdelenie a označenie skupín myší

| OZNAČENIE MYŠÍ | | | |
|----------------|----------|-----|------|
| UTI + PAV | UTI +FYZ | UTI | CTRL |
| C30 | C50 | E40 | C60 |
| C31 | C51 | E41 | C61 |
| C32 | C52 | E42 | |
| C33 | C53 | E43 | |
| C34 | C54 | | |

Tabuľka 2 Hmotnosti myší v jednotlivých skupinách

| | HMOTNOSŤ MYŠÍ [g] | | | |
|---------|-------------------|----------|------|------|
| | UTI + PAV | UTI +FYZ | UTI | CTRL |
| | 25,3 | 27 | 25 | 25,2 |
| | 28,1 | 24,9 | 24,7 | 23,4 |
| | 28,6 | 27,1 | 24 | |
| | 29,3 | 27,2 | 24,7 | |
| | 32,6 | 26,9 | | |
| Priemer | 28,78 | 26,62 | 24,6 | 24,3 |

Ďalší deň, po rozmnožení baktérií v nočnej kultúre, sme túto nariedili na OD 600 s hodnotou 1,1. Nariedené baktérie sme vysiali na misky s agarom a nechali inkubovať pri teplote 37°C. Po nariedení baktérií na príslušné OD sme ich kanilovali do myší. Kanilácia prebiehala na operačnej sále ústavu. Kanilovali sme celkovo 14 myší, keďže zvyšné dve nám slúžili iba ako kontrola, či samotné myši nie sú infekčné. Do myší sme kanilovali 50 µl roztoku baktérií. Myši boli pred kaniláciou uspané a aj počas kanilácie boli udržiavané v umelom spánku. Tento stav sme dosiahli zmesou izofluránu (prchavé anestetikum) a kyslíka, ktorý dýchali cez špeciálnu pumpu. Najprv sme myš nechali zaspáť v krabicike, do ktorej sme vháňali zmes týchto dvoch plynov a následne sme ju vybrali na operačnú podložku, na ktorej ďalej inhalovala anestetickú zmes. Myš sme v oblasti genitálií očistili 70% etanolom, nahmatali sme močový mechúr a vytlačili sme z neho moč, aby vstriednuté baktérie myš hneď nevylúčila spolu s močom von. Po vyprázdnení močového mechúra sme na oblasť vstupu do vagíny a močovej rúry aplikovali Mesocain. Jedná sa o gél, ktorý sa používa k zlepšeniu kĺzavosti zavádzaných cievok a ako prevencia bolesti pri urologickom vyšetrení. Má znecitlivujúce a antimikrobiálne účinky. Na kaniláciu sme používali kanilu, ktorú sme pre lepšiu manipuláciu pred použitím zostrihli na polovicu. Kanila bola na striekačke s objemom 1 ml. Kanilou sme opatrne našli vstup do močovej rúry a postupne sme ju zasunuli až do močového mechúra, vytlačili sme potrebný objem baktérií, počkali sme desať sekúnd a pomaly sme kanilu vytiahli z močovej rúry, aby sa vstreknutý objem

nevyliat von cez dilatovanú močovú rúru. Myš sme po kanilácii vrátili späť do kletky, v ktorej sa sama prebrala z anestézy. Takýto postup sme dodržali pri všetkých myšiach zo skupiny UTI + PAV, UTI + FYZ a UTI. Pri kontrolnej skupine sme vynechali kaniláciu, pričom sme myš iba uspali, vyčistili alkoholom a vytlačili z nej moč. Týmto sme chceli vylúčiť efekt anestézy a vyprázdnenia močového mechúra, čím by sa mohli do istej miery ovplyvniť výsledky.

Po čase inkubácie, ktorý bol takmer 24 hodín, sme myši preplachovali podľa skupín, do ktorých boli rozdelené: PAV alebo fyziologickým roztokom. Preplachovanie sme opakovali trikrát s rozstupom troch hodín. Samotné preplachovanie trvalo 1,5 hodiny, pričom sme myši preplachovali vždy v rovnakom poradí. PAV bola pripravená deň pred preplachovaním a zmrazená na teplotu -80°C . Pred použitím sme PAV vybrali z mrazničky a roztopili v rukách, pretože jedine tak sme mali kontrolu nad postupným rozmrazovaním, iným spôsobom by sme mohli dosiahnuť neprimerané zahriatie PAV, čím by sa zvýšila reaktivnosť a rozpad aktívnych častíc v nej. Najprv sme premývali skupinu myší PAV a následne skupinu, ktorá bola preplachovaná fyziologickým roztokom. UTI a CTRL skupinu sme nepreplachovali, tieto myši sme iba uspali a vyprázdniť im močový mechúr, aby sme sa vyhlí potenciálnemu efektu samotnej anestézy a vyprázdnenia močového mechúra.

Ďalší deň po preplachovaní boli všetky myši zabité. Najprv sa každá myš uspala a sklenenou kapilárou sa jej spoza oka odobrala krv do dvoch skúmaviek po 0,5 ml do každej. Následne sa myši podalo anestetikum do brušnej dutiny, čím sme ju dostali do bezvedomia. Myš v bezvedomí bola usmrtená cervikálnou dislokáciou. Z myší sme vybrali močový mechúr, ktorý sme homogenizovali, v niektorých prípadoch aj moč, väčšinou ho však po podaní anestetika vylúčili, a tak bol mechúr prázdny. Ďalej sme odobrali z myší mozog a obe obličky, pričom sa jedna dávala na homogenizovanie pre experiment na miskách a druhá na histológiu. Po príprave homogenátu v homogenizátore Qiagen TissueLyser II (obrázok 8) sme homogenát pipetovali do mikrotitračných platničiek. Zvlášť homogenát močového mechúra a zvlášť homogenát obličiek. Koncentrovaný homogenát bol pipetovaný do prvého riadku platničiek a následne sme pripravili desiatkové riedenie, pričom sme homogenát riedili PBS. Pripravené desiatkové riedenia sme pipetovali na misky s agarom, na ktorých cez noc rástli kolónie. Spočítané vyrastené kolónie sme prepočítali na počet baktérií na mililiter.



Obrázok 6 Homogenizátor Qiagen TissueLyser II

3 Výsledky

Namerané výsledky z experimentov sme spracovávali v programe MS Excel. V ňom sme vytvárali aj použité grafy a tabuľky. Na štatistickú analýzu dát sme používali štatistický program GraphPad Prism 8. Dáta sme získali z dvoch modelov experimentov. Prvým modelom bolo *in vitro* testovanie účinkov PAV (plazmou aktivovanej vody) na baktérie, pričom tieto experimenty prebiehali na 96 jamkových mikrotitračných platničkách. Merali sme absorbanciu vzoriek, a tak sme kvantitatívne hodnotili účinky PAV. Tento model experimentu sme opakovali trikrát. Z každého opakovania sme pre konkrétnu koncentráciu baktérií, konkrétny pomer PAV/FYZ : BAK+LB a konkrétny čas získali práve dve hodnoty absorbancie. Následne sme z párov hodnôt, získaných z troch experimentov, urobili aritmetický priemer a rovnako sme vypočítali strednú chybu priemeru (SEM: z anglického – standard error of the mean). Chybová úsečka na grafoch reprezentuje práve SEM. Už z jednotlivých grafov sme vedeli vyhodnotiť účinky rozdielne účinky PAV a fyziologické roztoku na baktérie.

Druhým modelom bolo *in vivo* testovanie, ktoré prebiehalo na živom organizme, na myšiach. Porovnávali sme účinky PAV a fyziologického roztoku na baktérie vo vylučovacej sústave myši, v obličkách a močovom mechúre.

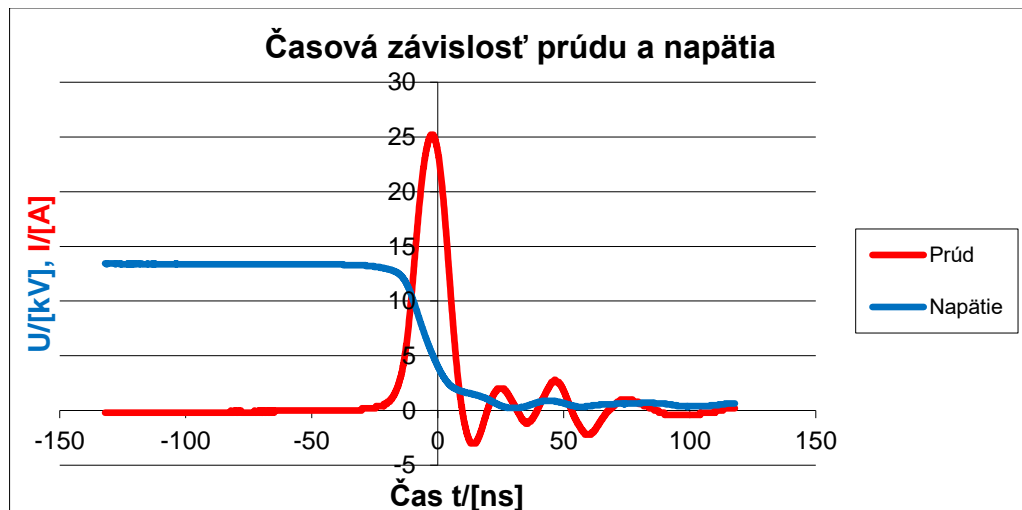
3.1 Elektrická charakteristika prechodovej iskry

Pri výrobe PAV sme používali ako elektrický výboj, prechodovú iskru. Pri našich experimentoch sme udržiavali približne rovnaké hodnoty prúdu, napätia a frekvencie. Tieto však záviseli od mnohých faktorov. Dôležité bolo dodržiavať rovnaké nastavenie aparatury, najmä vzdialenosť elektród, ktorá bola vždy 1 cm. Ihlu sme zostrihávali vždy rovnakým

spôsobom. Zostrihávali sme ju za účelom zvýšenia kontaktu sprejovanej vody s elektrickým výbojom. Maximálne hodnoty napätia boli približne $U_{\max} = 13 \text{ kV}$ a maximálne hodnoty prúdu boli približne $I_{\max} = 25 \text{ A}$. Stredný výkon \hat{P} sme vypočítali z hodnôt napätia a prúdu podľa vzťahu:

$$\hat{P} = \frac{1}{T} \int_0^T U(t)I(t)dt$$

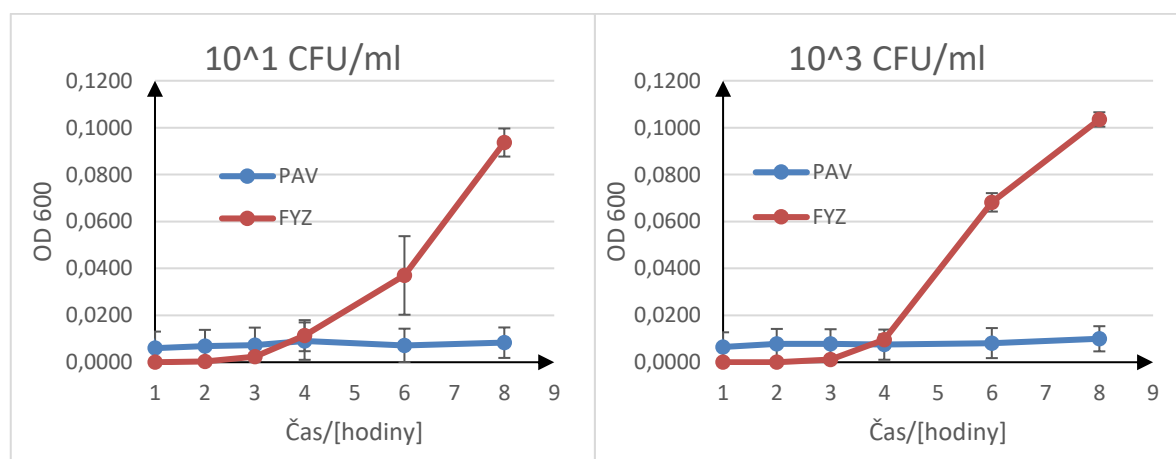
príčom T je perióda pulzov, ktorú vypočítame ako obrátenú hodnotu frekvencie $f = 1/T$.



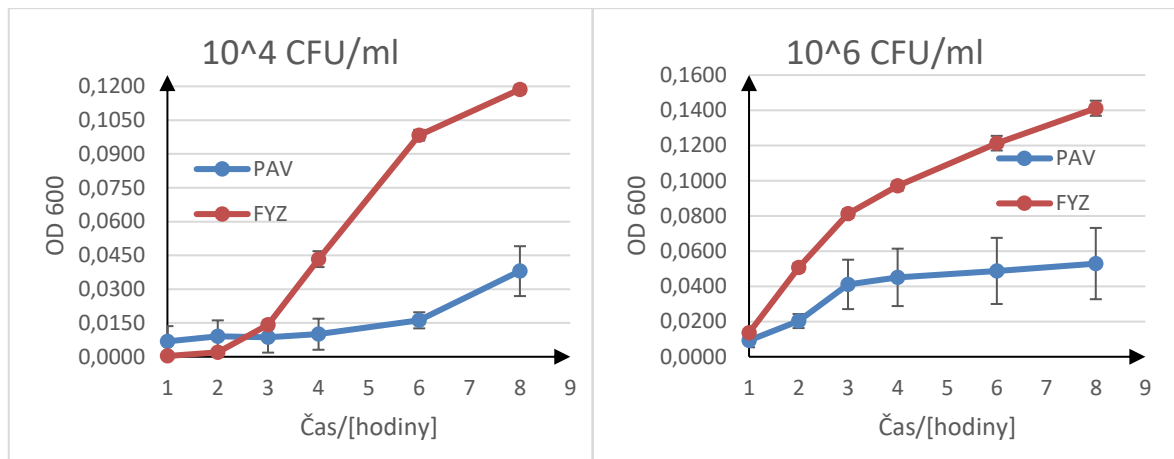
Graf 1 Prechodová iskra - Zobrazenie jedného napätového a prúdového pulzu

3.2 In vitro experiment na mikrotitračných platničkách

3.2.1 Výsledky experimentu pri použití roztoku baktérií k PAV/FYZ v pomere 1:9



Graf 2 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer roztoku baktérií:PAV/FYZ 1:9, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10^1 a 10^3 .



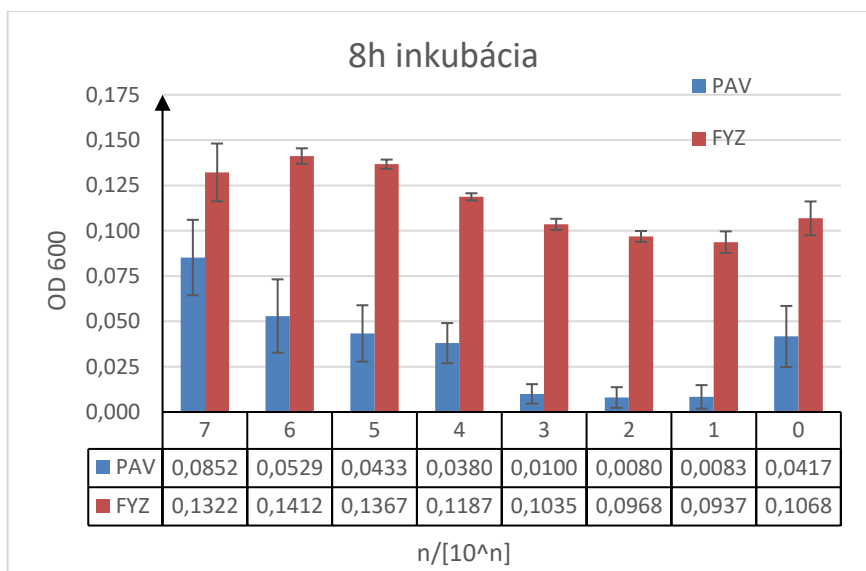
Graf 3 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer roztoku baktérií:PAV/FYZ 1:9, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10⁴ a 10⁶

Pomer roztoku baktérií k PAV/FYZ 1:9 znamená, že PAV resp. FYZ tvoria 90 % z celkového objemu testovanej vzorky. Zvyšných 10 % objemu tvoria baktérie a tekuté LB médium. V našom prípade sme objemy nastavili nasledovne: 10 µl baktérií, 10 µl LB (tekuté médium) a 180 µl PAV/FYZ. Týmto sme dostali 200 µl vzorky v každej jamke.

Najdôležitejším výsledkom, ktorý vyplýva z grafov, je výrazný rozdiel medzi hodnotami absorbancie pre PAV a pre FYZ po ôsmich hodinách od začiatku experimentu. Zároveň je dôležité všimnúť si rast absorbancie vzoriek s FYZ a málo sa meniaci priebeh absorbancie vzoriek s PAV. Tento trend možno pozorovať najmä pri nižších koncentráciách. Môžeme povedať, že PAV v tomto prípade inhibuje množenie baktérií natoľko, že ak sa aj nejaké rozmnožia, nie sú schopné ďalej prežívať a zahynú. V tomto prípade by bolo vhodné odmerať absorbanciu aj po dlhšom čase (po 24 a možno aj po 48 hodinách), čím by sme presne vedeli povedať, či je rast baktérií iba inhibovaný po určitú dobu, kedy má PAV aktivitu, alebo sú všetky baktérie zabitú, a tak absorbancia nebude vôbec rásť. Pri vyšších koncentráciách je životaschopnosť baktérií vyššia, čo nám vyplýva z grafu pre 10⁶ CFU/ml. Avšak meranie absorbancie po ôsmich hodinách naznačuje rovnaký trend, aký vidíme pri nižších koncentráciách a teda, že rast baktérií je PAV inhibovaný natoľko, že baktérie sa nemnožia a tým prestane rásť absorbancia.

Ako si môžeme všimnúť, tak na grafoch má PAV počas prvých 4 hodín vždy vyššiu hodnotu absorbancie, okrem grafu s koncentráciou baktérií 10⁶. Vzhľadom na chybové úsečky tento rozdiel nepovažujeme za signifikantný. Mierne vyššia počiatková hodnota absorbancie pre vzorky s PAV je spôsobená optickými vlastnosťami PAV, ktorá absorbuje práve v použitej vlnovej dĺžke 600 nm.

Ďalej si môžeme na grafoch všimnúť, že hodnoty absorbancie začínajú rásť neskôr pre vzorky, v ktorých bola koncentrácia baktérií na mililiter nižšia. Pri hodnotách 10^1 a 10^3 rástla absorbancia až po troch hodinách, no pri hodnotách 10^4 vidíme výrazný rast už po dvoch hodinách a dokonca pre hodnoty 10^6 rástla absorbancia výrazne už po prvej hodine.

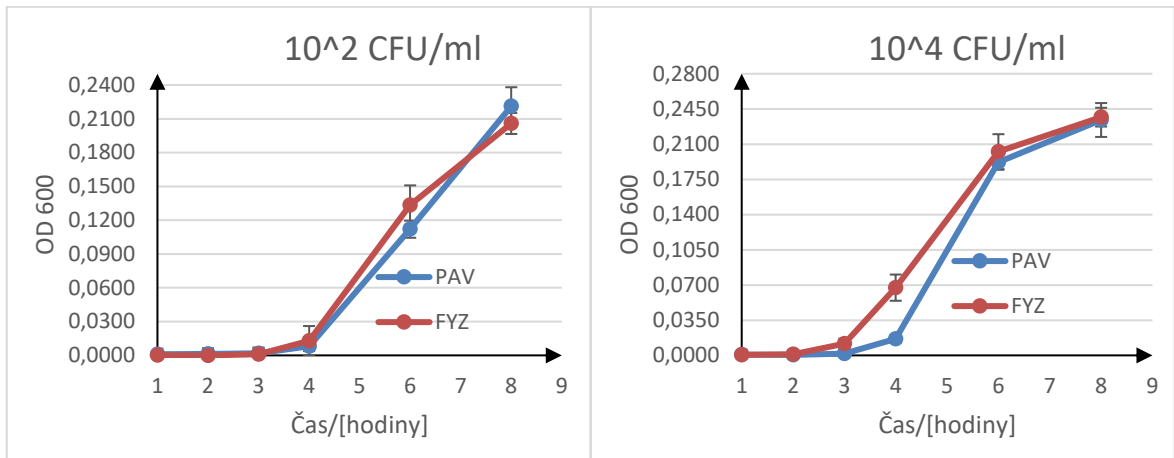


Graf 4 Hodnoty absorbancie (zodpovedajúcej počtu baktérií) po 8 hodinovej inkubácii v 90% PAV alebo FYZ (pomer riedenia 1:9) pre koncentrácie baktérií 10^7 až 10^0

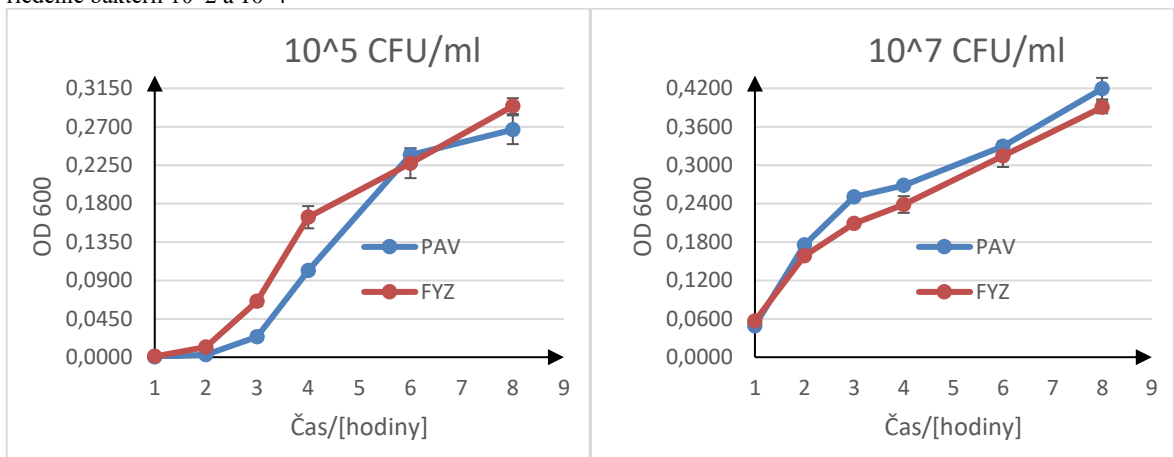
Graf 4 zobrazuje hodnoty absorbancie vzoriek po osem hodinovej inkubácii. Všetky výsledky a najmä rozdiely medzi hodnotami absorbancie pre PAV a FYZ vzorky môžeme považovať, na základe chybových úsečiek, za významné. Môžeme si tiež všimnúť ako hodnoty absorbancie pre PAV klesajú s klesajúcou koncentráciou baktérií. Výnimkou je však hodnota pre PAV s koncentráciou baktérií 10^0 CFU/ml, kde by mala byť hodnota absorbancie najnižšia, ale v tomto prípade tomu tak nie je. Koncentrácia baktérií s hodnotou 10^0 CFU/ml po prepočte zodpovedá jednej baktérii na mililiter, čo je veľmi málo. Môžeme tiež tvrdiť, že baktéria tam buď je alebo nie, čo je na hranici významnosti metódy. Preto tieto hodnoty neberieme do úvahy.

Z nameraných dát vyplýva, že zamietame nulovú hypotézu na hladine významnosti $\alpha=0,05$, pretože testovaním sme dostali p-hodnotu pod hladinou významnosti, $p=0,0006$. Na základe tohto výsledku, môžeme rozdiel v absorbanciách, medzi PAV a FYZ, považovať za významný.

3.2.2 Výsledky experimentu pri použití roztoku baktérií k PAV/FYZ v pomere 1:1



Graf 5 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer roztoku baktérií k PAV/FYZ 1:1, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10² a 10⁴

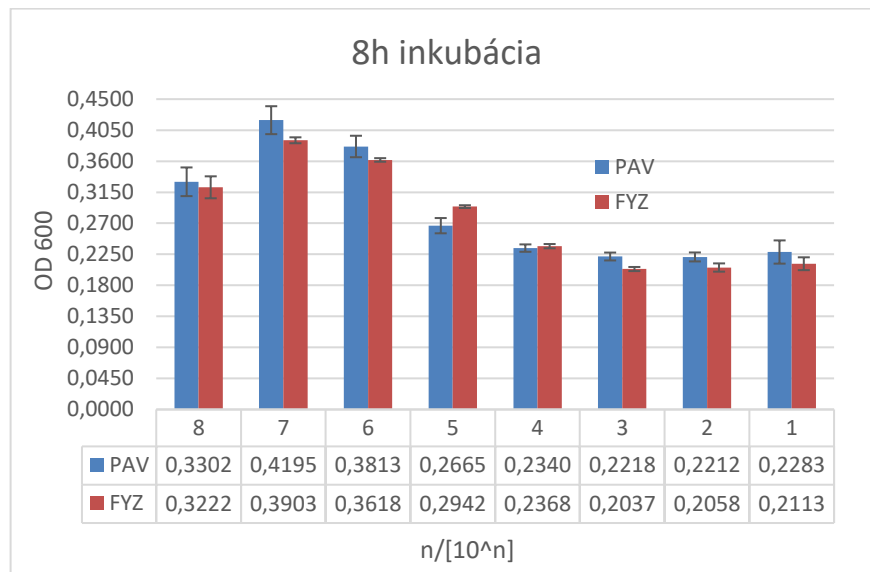


Graf 6 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer roztoku baktérií k PAV/FYZ 1:1, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10⁵ a 10⁷

Použitý pomer znamená, že PAV/FYZ tvorili 50 % objemu vzorky a zvyšných 50 % boli baktérie s tekutým LB médiom. V tomto prípade boli objemy jednotlivých zložiek vzoriek nastavené nasledovne: 50 μ l baktérií, 50 μ l LB (tekuté médium) a 100 μ l PAV/FYZ. Týmto sme zachovali objem 200 μ l vzorky v každej jamke.

Na grafoch, pre pomer 1:1, môžeme pozorovať, že absorbancia vzoriek začína rásť približne v rovnakých časoch pre obe vzorky. Pre nižšie koncentrácie je rast absorbancie pre FYZ rýchlejší, ale pre koncentráciu 10⁷ rastie rýchlejšie absorbancia vzoriek PAV, k čomu môže prispievať samotná absorbancia PAV (i bez baktérií). Chybové úsečky sa však vo všetkých grafoch pri ôsmej hodine prekrývajú, teda tieto výsledky nie sú signifikantne rozdielne. Zároveň môžeme na základe grafov tvrdiť, že absorbancia vzoriek s PAV rástla

rovnako ako absorbancie vzoriek s FYZ, preto sa zdá, že pri tomto pomere riedenia nemá PAV žiadny inhibujúci efekt na rast baktérií.

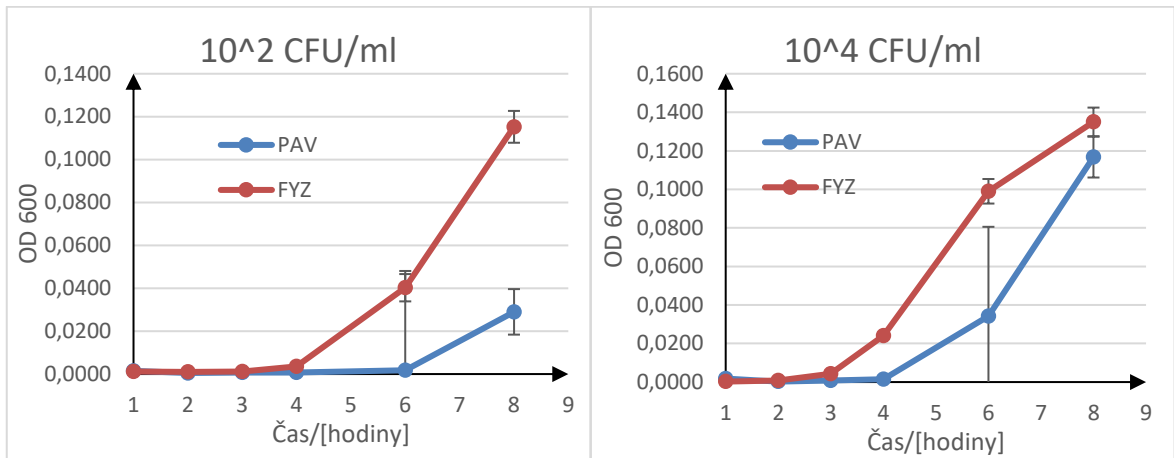


Graf 7 Hodnoty absorbancie po 8 hodinovej inkubácii v 50% PAV alebo FYZ (pomer riedenia 1:1) pre koncentrácie baktérií 10^8 až 10^1

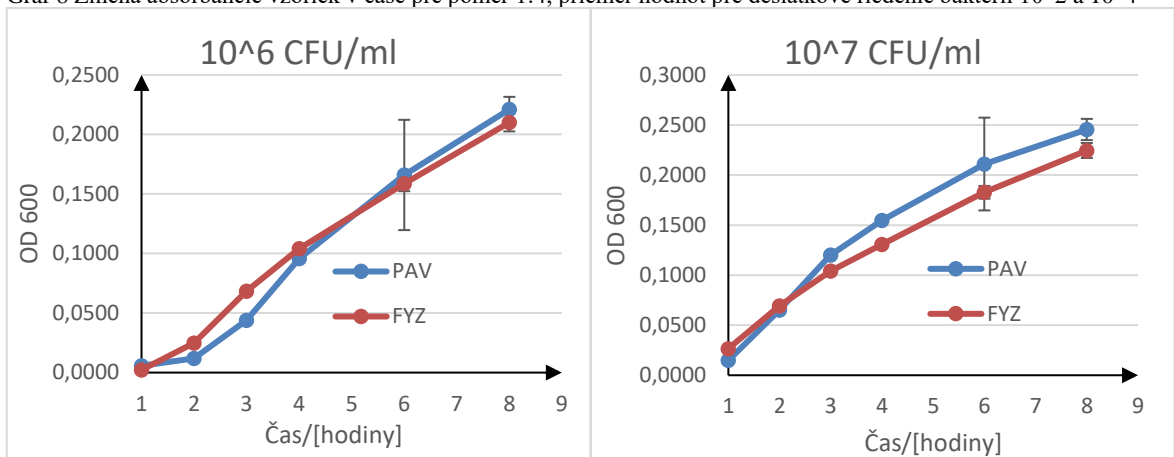
Graf 7 zobrazuje hodnoty absorbancií vzoriek pre všetky použité koncentrácie baktérií po osem hodinovej inkubácii. Ako môžeme vidieť na grafe, tak jedine pre koncentráciu baktérií 10^5 bola hodnota absorbancie pre FYZ vyššia ako pre PAV, čím vieme povedať, že existuje efekt PAV na baktérie. Hodnoty absorbancie pre vzorky s PAV, pre všetky ostatné koncentrácie, sú však vyššie, no chybové úsečky sa prekrývajú alebo sú na hranici, čím môžeme tvrdiť, že sú tieto výsledky nesignifikantné.

Z nameraných dát vyplýva, že nulovú hypotézu, na hladine významnosti $\alpha=0,05$, nemôžeme zamietnuť, pretože testovaním sme dostali p-hodnotu nad hladinou významnosti, $p=0,4317$. Na základe tohto výsledku, nemôžeme rozdiel v absorbanciách, medzi PAV a FYZ, považovať za signifikantný.

3.2.3 Výsledky experimentu pri použití roztoku baktérií k PAV/FYZ v pomere 1:4



Graf 8 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer 1:4, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10² a 10⁴



Graf 9 Zmena absorbancie vzoriek v čase pre pomer 1:4, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10⁶ a 10⁷

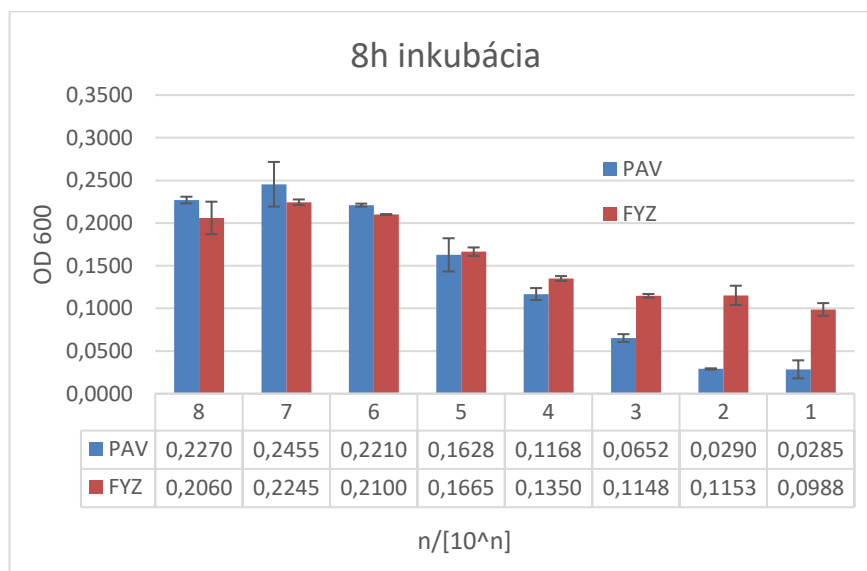
Použitý pomer znamená, že PAV/FYZ tvorili 80 % objemu vzorky a zvyšných 20 % boli baktérie s tekutým LB médiom. V tomto prípade boli objemy jednotlivých zložiek vzoriek nastavené nasledovne: 20 µl baktérií, 20 µl LB (tekuté médium) a 160 µl PAV/FYZ. Týmto sme zachovali objem 200 µl vzorky v každej jamke.

Ako môžeme vidieť z grafov, tak rozdiel medzi PAV a FYZ pre 10² a 10⁴ CFU/ml po osem hodinovej inkubácii potvrdzuje účinok PAV pri inhibícii rastu baktérií. Avšak pri koncentrácii 10⁴ je pri porovnaní chybových úsečiek na hranici signifikantnosti.

Všetky grafy pre koncentrácie baktérií vyššie ako 10⁴ (vrátane) nám ukazujú to, že pri použitom pomere nie je účinok na inhibíciu rastu baktérií PAV v porovnaní s FYZ, ba dokonca je pri týchto koncentráciách hodnota absorbancie pre vzorky s PAV vyššia, čím

môžeme povedať, že baktérie lepšie rastú v PAV ako vo FYZ. Experimenty s týmto pomerom by bolo dobré zopakovať viackrát a potvrdiť alebo vyvrátiť tento efekt.

V šiestich hodinách je pri všetkých grafoch pre hodnoty absorbančie vzoriek s PAV výrazná chyba. Keďže chybovú úsečku vykresľujeme ako strednú chybu priemeru zo štyroch hodnôt, tak je možné, že v tomto čase sa hodnoty v jednom z opakovaní experimentu od seba výrazne líšili, čím bola spôsobená aj chyba.

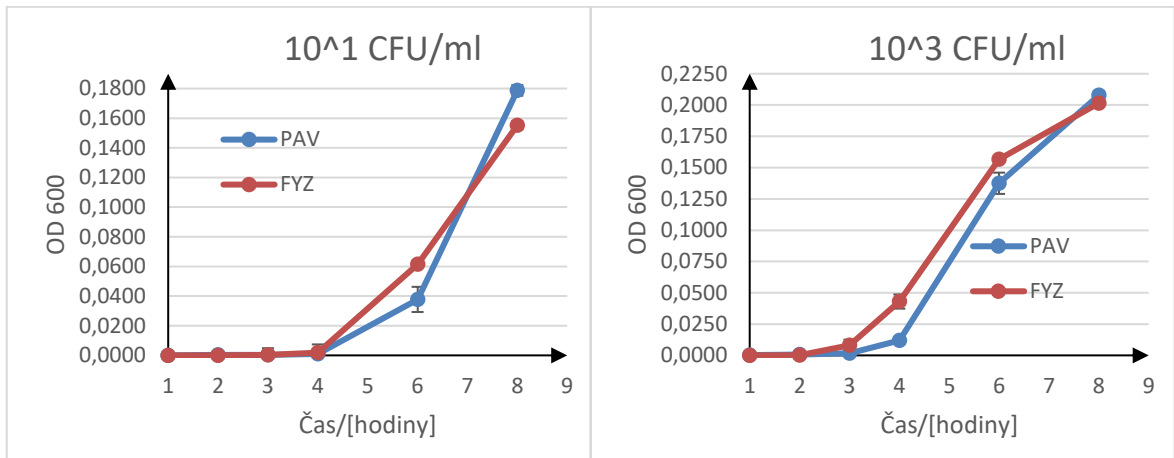


Graf 10 Hodnoty absorbančie po 8 hodinovej inkubácii v 25% PAV alebo FYZ (pomer riedenia 1:4) pre koncentrácie baktérií 10^8 až 10^1

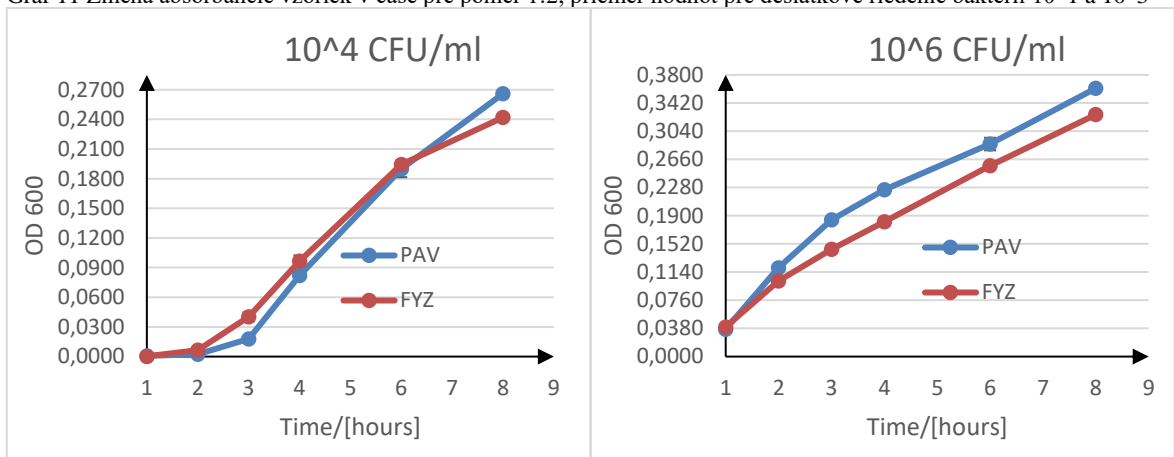
Na grafe 10 môžeme vidieť, že výrazný rozdiel medzi hodnotami absorbančie PAV a FYZ po osem hodinovej inkubácii je najmä pri nižších koncentráciách baktérií, od 10^1 - 10^4 CFU/ml. Pri týchto hodnotách vidíme, že absorbančie vzoriek s FYZ je vyššia a výsledky považujeme v rámci chybových úsečiek za signifikantné. Situácia sa však mení so zvyšujúcou sa koncentráciou baktérií vo vzorkách. Rozdiely medzi PAV a FYZ začínajú byť, podľa chybových úsečiek, nesignifikantné už od 10^5 - 10^8 CFU/ml. Jedinú výnimku tvorí koncentrácia 10^6 CFU/ml, kde je absorbančie vzoriek s PAV vyššia v porovnaní s FYZ a chybové úsečky sa neprekrývajú. Vyššia je absorbančie vzoriek s PAV aj pri koncentráciách 10^7 a 10^8 CFU/ml, tieto rozdiely však nie sú signifikantné, pretože sa chybové úsečky prekrývajú.

Z nameraných dát vyplýva, že nulovú hypotézu, na hladine významnosti $\alpha=0,05$, nemôžeme zamietnuť, pretože testovaním sme dostali p-hodnotu nad hladinou významnosti, $p=0,2351$. Na základe tohto výsledku, nemôžeme rozdiel v absorbančiaci, medzi PAV a FYZ, považovať za signifikantný.

3.2.4 Výsledky experimentu pri použití roztoku baktérií k PAV/FYZ v pomere 1:2



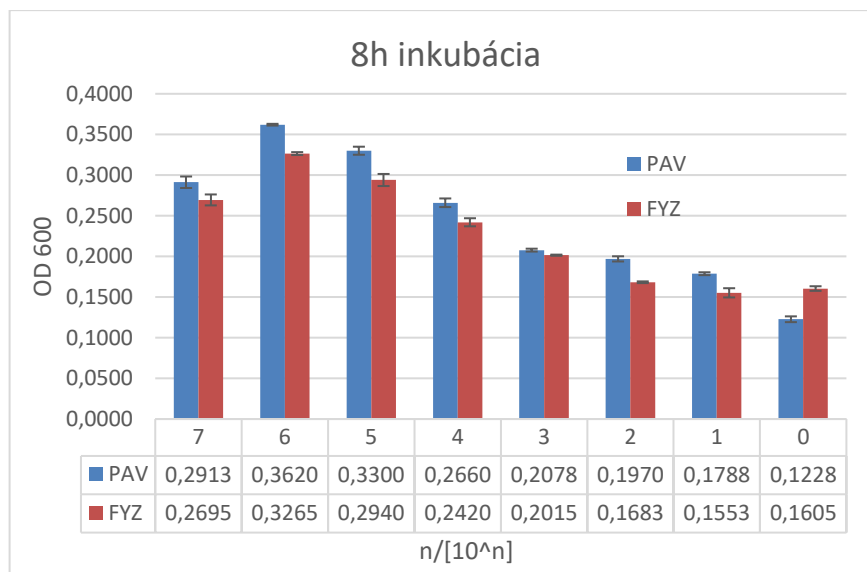
Graf 11 Zmena absorbanie vzoriek v čase pre pomer 1:2, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10¹ a 10³



Graf 12 Zmena absorbanie vzoriek v čase pre pomer 1:2, priemer hodnôt pre desiatkové riedenie baktérií 10⁴ a 10⁶

Použitý pomer znamená, že PAV/FYZ tvorili 67 % objemu vzorky a zvyšných 33 % boli baktérie s tekutým LB médiom. V tomto prípade boli objemy jednotlivých zložiek vzoriek nastavené nasledovne: 33 µl baktérií, 33 µl LB (tekuté médium) a 134 µl PAV/FYZ. Týmto sme zachovali objem 200 µl vzorky v každej jamke.

Najdôležitejším zistením z grafov je to, že ani v jednom z grafov nie je absorbania vzoriek s PAV nižšia ako je absorbania vzoriek s FYZ. Pri nižších koncentráciách je absorbania vzoriek s PAV nižšia ako FYZ, ale situácia sa zmení po šiestej hodine, kedy absorbania vzoriek s PAV výrazne narastie. Pri koncentrácii 10¹ CFU/ml je to približne o 0,14.



Graf 13 Hodnoty absorbanie po 8 hodinovej inkubácii v 33.3% PAV alebo FYZ (pomer riedenia 1:2) pre koncentrácie baktérií 10^7 až 10^0

Na grafe 13 pri všetkých koncentráciách je absorbania vzoriek PAV vyššia ako absorbania vzoriek FYZ, ba dokonca môžeme, pri porovnaní chybových úsečiek, považovať tieto rozdiely za signifikantné. Jediným rozdielom je koncentrácia 10^0 CFU/ml, pri ktorej je absorbania vzoriek s PAV vyššia ako absorbania vzoriek s FYZ. Ako sme opisovali v kapitole 6.2.1, tak táto koncentrácia je veľmi sporná, pretože sa vo vzorke môže a nemusí nachádzať baktéria. Môžeme však predpokladať, že ak rastie absorbania, tak sa vo vzorke množia baktérie, preto môžeme povedať, že rast baktérií bol v tomto prípade inhibovaný PAV. Ak však porovnáme všetky koncentrácie baktérií, tak nám z toho vyplynie, že výsledok inhibície baktérií je iba zdanlivý.

Z nameraných dát vyplýva, že nulovú hypotézu, na hladine významnosti $\alpha=0,05$, nemôžeme zamietnuť, pretože testovaním sme dostali p-hodnotu nad hladinou významnosti, $p=0,2352$. Na základe tohto výsledku, nemôžeme rozdiel v absorbanciách, medzi PAV a FYZ, považovať za signifikantný.

Cieľom *in vitro* experimentov bolo kvantitatívne vyhodnotiť účinky plazmou aktivovanej vody (PAV) na inhibovanie rastu uropatogénneho kmeňa baktérii *E.coli* (UTI) v porovnaní s fyziologickým roztokom (FYZ). V experimente sme neporovnávali iba účinky PAV na vzorku, ale snažili sme sa zistiť optimálny pomer roztoku UTI baktérií voči PAV, teda v akej objemovej prevahe sa musí PAV vo vzorke nachádzať, aby sme dosiahli požadovaný dezinfekčný efekt. Zároveň sme testovali PAV pri rôznych koncentráciách baktérií. Očakávali sme, vychádzajúc z dosiaľ známych výsledkov (Shen et al. 2016; Xu et

al. 2020; Kamgang-Youbi et al. 2009), že PAV bude inhibovať rast a množenie baktérií vo vzorke a FYZ ich rastu a množeniu brániť nebude. Ideálnym výsledkom bolo to, keď absorbancia vzoriek s PAV nerástla, bola konštantná počas celej doby experimentu a naopak absorbancia vzoriek s FYZ rástla podľa rastovej krivky baktérií. Dobrým výsledkom bolo aj to, keď bol po ôsmich hodinách rozdiel absorbancií vzoriek s PAV a s FYZ výrazný.

Najlepší výsledok sme získali, keď bola PAV vo výraznej objemovej prevahe voči UTI. Išlo o pomer 1:9 (UTI:PAV), kedy 90 % objemu tvorila PAV. V tomto prípade sme pozorovali v čase konštantnú absorbanciu vzoriek s PAV a rastúcu absorbanciu vzoriek s FYZ. Pri tomto pomere sme dosiahli ideálny výsledok pre celý rozsah testovaných koncentrácií baktérií 10^0 - 10^8 , najvýraznejšie pre 10^1 - 10^3 CFU/ml. Tieto výsledky, ktoré sme vyčítali z grafov sme potvrdili aj štatistickým testom dvojfaktorová ANOVA s opakovaním, ktorý preukázal signifikantnosť výsledkov a teda, že existuje rozdiel medzi skupinou vzoriek s PAV a s FYZ.

Ďalšími experimentami sme otestovali zvyšné tri pomery UTI:PAV (1:1, 1:2, 1:4). Výsledky pre pomer 1:1 a 1:2 neukazujú signifikantne rozdielne pôsobenie PAV a FYZ to znamená, že PAV bola príliš zriedená roztokom baktérií v LB, ktorý eliminoval jej účinky. Pri pomere 1:4 sa inhibičné pôsobenie PAV na rast baktérií preukázalo len pre nižšie koncentrácie baktérií 10^0 - 10^4 CFU/ml. Pre vyššie koncentrácie baktérií zrejme daný objem PAV nemá dostatok aktívnych častíc, aby inhibovali rast všetkých baktérií.

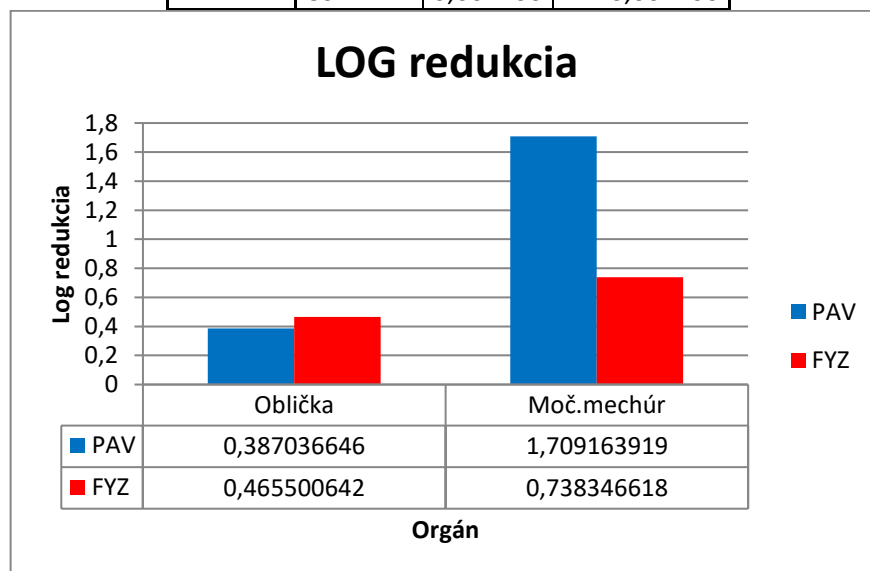
3.3 *In vivo* experiment

Vyhodnotením výsledkov *in vivo* experimentu bolo spočítanie vyrastených kolónií uropatogénnej *E. coli* na miskách po vysiatí vzoriek homogenizovaného močového mechúra a obličiek. Tieto kolónie sme následne prepočítali na počet baktérií na mililiter [CFU/ml]. V tabuľke 3 sú prepočítané vyrastené kolónie na počty baktérií CFU/ml. Z každej myši sme vybrali obličky a močový mechúr. Oba tieto orgány sme homogenizovali a homogenát sme desiatkovo zriedili a vysievali na misky so živným médiom. Účinnosť a logaritmickú redukciu sme počítali pre skupiny myši preplachované PAV a FYZ voči skupine UTI (tabuľka 3). Logaritmická redukcia sa ráta ako dekadický logaritmus pomeru počtu vyrastených baktérií zo skupiny UTI a počet baktérií vyrastených na miskách zo skupiny PAV alebo FYZ. Vypočítané hodnoty sme následne vyniesli do grafov. Štatistickú analýzu

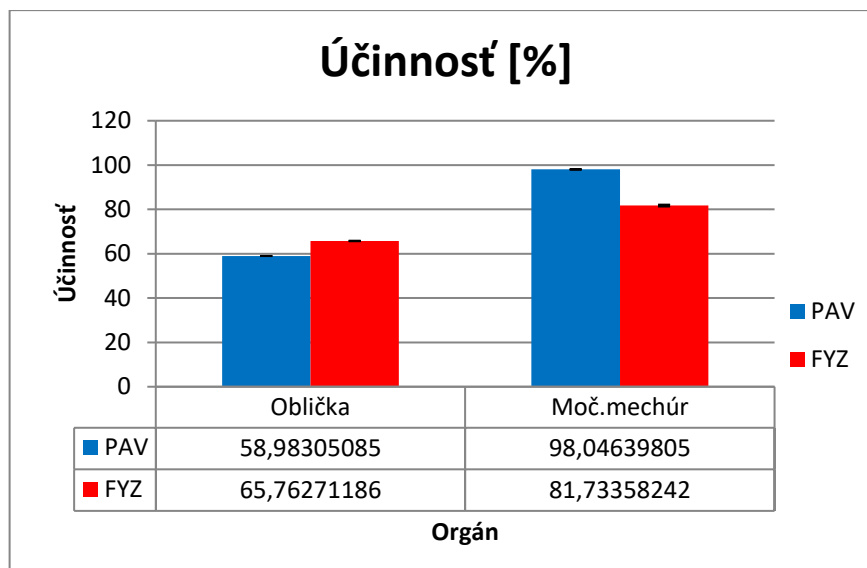
sme v tomto prípade nerobili, pretože sme pri jednom opakovaní experimentu dostali iba malú štatistickú vzorku.

Tabuľka 3 Počet baktérií vypočítaný z vyrastených kolónií E. coli na miskách po in vivo experimente

| | MYS | Počet baktérií [CFU/ml] | |
|-------------|-----|-------------------------|-------------|
| | | Oblička | Moč. mechúr |
| FYZ | C50 | 0,00E+00 | 6,80E+05 |
| | C51 | 2,16E+03 | 9,80E+01 |
| | C52 | 6,00E+05 | 1,06E+06 |
| | C53 | 1,40E+04 | 5,20E+06 |
| | C54 | 0,00E+00 | 5,40E+05 |
| PAV | C30 | 0,00E+00 | 0,00E+00 |
| | C31 | 2,42E+04 | 5,40E+05 |
| | C32 | 0,00E+00 | 0,00E+00 |
| | C33 | 0,00E+00 | 1,00E+05 |
| | C34 | 0,00E+00 | 1,60E+05 |
| UTI | E40 | 0,00E+00 | 1,60E+05 |
| | E41 | 2,00E+04 | 2,90E+07 |
| | E42 | 2,72E+04 | 3,14E+03 |
| | E43 | 0,00E+00 | 3,60E+06 |
| CTRL | C60 | 0,00E+00 | 0,00E+00 |
| | C61 | 0,00E+00 | 0,00E+00 |



Graf 14 Logaritmickej redukcia baktérií E.coli po pôsobení PAV a FYZ v obličkách a močovom mechúre



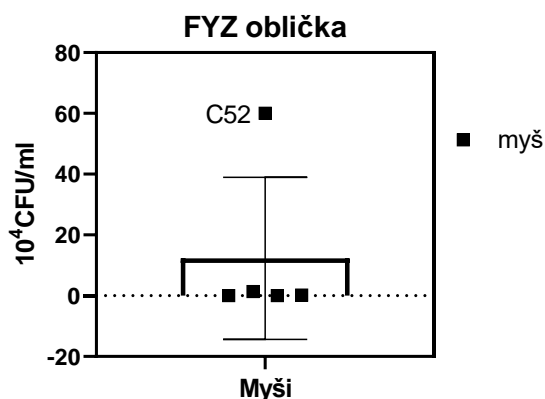
Graf 15 Účinnosť PAV a FYZ na inaktiváciu baktérie E.coli v obličkách a močovom mechúre

Logaritmickejšiu redukciu a účinnosť pre PAV a FYZ sme počítali vzhľadom k vyrasteným baktériám na miskách s agarom z orgánov myší zo skupiny UTI. Počty vyrastených kolónií sme spriemerovali, zvlášť pre močový mechúr a zvlášť pre obličku. Priemerná hodnota koncentrácie baktérií v močovom mechúre bola $8,19 \cdot 10^6$ CFU/ml a v obličke mala hodnotu $1,18 \cdot 10^4$ CFU/ml. Z grafu pre logaritmickejšiu redukciu môžeme vidieť, že najväčšia redukcia, 1,71 log, bola v močovom mechúre v PAV skupine. Túto redukciu sme dosiahli pri 98,04 % účinnosti PAV na baktérie v močovom mechúre. V obličke bola redukcia pre PAV 0,39 log a účinnosť bola 58,98 %. FYZ dosiahol najväčšiu redukciu v močovom mechúre 0,74 log pri účinnosti 81,73 % a v obličke to bola hodnota 0,47 log pri účinnosti 65,76 %.

Najväčší rozdiel medzi PAV a FYZ, v účinnosti, môžeme pozorovať v močovom mechúre, kde je rozdiel 16,3 %, čím sa potvrdzuje inhibičný účinok pre PAV. Účinnosti pri obličke sú rozdielne o 6,8 %, ale s inhibičným účinkom pre FYZ. V rámci chyby považujeme tieto rozdiely za významné.

V močovom mechúre sme dosiahli najväčší rozdiel v logaritmickej redukcii medzi PAV a FYZ, s hodnotou približne 1 log v prospech inhibičného účinku PAV. Tento výsledok je potvrdením rozdielov medzi koncentraciami vyrastených baktérií (tabuľka 3). Rozdiel v logaritmickej redukcii pre PAV a FYZ v obličke bol 0,08 log s inhibičným účinkom pre FYZ.

Vychádzali sme z predpokladu, že u myší, ktoré budú preplachované PAV sa infekcia nerozšíri na obličku a nerozvinie sa infekcia a zároveň bude PAV inhibovať množenie baktérií už v močovom mechúre. Podľa získaných výsledkov PAV naozaj inhibovala rast baktérií v močovom mechúre v porovnaní s FYZ. Hodnoty pre obličku sme nezískali z piatich, ale iba zo štyroch myší, pretože hodnota koncentrácie pre myš C52 (tabuľka 3) bola oveľa väčšia ako priemer zvyšných hodnôt, preto skresľovala výsledky (graf 16).



Graf 16 Box-plot zobrazujúci hodnotu koncentrácie baktérií pre FYZ v obličke myši C52 (dôkaz, že je táto hodnota outlierom), GraphPad Prism 8

Testovaním účinkov plazmou aktivovanej vody (PAV) na zvieracom modeli sme sa o krok priblížili klinickému testovaniu. Cieľom týchto *in vivo* experimentov bolo otestovať účinky PAV v živom organizme a zistiť, či PAV má efekt pri množení uropatogénnych baktérií v močovom mechúre alebo nie.

Z výsledkov vyplýva, že v skupine myší, ktoré boli preplachované PAV bol inhibičný účinok na UTI už v močovom mechúre, čo potvrdzuje účinnosť a aj redukcia PAV v močovom mechúre myší. Účinnosť bola výrazne vyššia pre skupinu PAV, rovnako tak aj logaritmickej redukcia.

Získané výsledky však nemôžeme považovať za smerodajné a štatisticky silné. Experiment sme opakovali iba raz, a tak sme dostali malú štatistickú vzorku.

Je dôležité opakovať tento experiment viackrát, aby bolo možné zistiť za akých podmienok má PAV efekt na množenie UTI v myšacom modeli a pri akom nastavení PAV napomáha imunitnému systému myší. Pri *in vivo* experimente netreba zabúdať na funkciu vlastného imunitného systému, ktorý sám bojuje proti patogénnej mikrobiote. Dôležité je si uvedomiť, že hoci budeme opakovať experiment na viacerých myšiach, tak každý výsledok, ktorý dostaneme bude špecifický pre konkrétnu myš. Hoci sa môžeme snažiť vybrať, čo

najviac podobné myši, nikdy nedosiahneme sto percentnú fyziologickú zhodu. Toto predstavuje jeden z dôvodov, prečo je dobré ďalej pokračovať v týchto experimentoch a vykonať viacero opakovaní. Zväčšením štatistického súboru by sme mohli dosiahnuť zníženie efektu špecifickosti jedinca. Napriek štatisticky nedostatočne silným výsledkom, môžeme ich považovať za indikatívne, ktoré preukazujú potenciálny význam PAV pri liečbe UTI.

4 Záver

Cieľom našich experimentov bolo testovať terapeutické účinky plazmou aktivovanej vody (PAV), resp. fyziologického roztoku pri liečbe UTI, *in vitro* na platničkách a *in vivo* na myšacom modeli. Naším cieľom bolo potvrdiť účinok PAV na inhibíciu množenia uropatogénneho kmeňa baktérií *Escherichia coli* (UTI). Účinok PAV sme porovnávali s neaktivovaným fyziologickým roztokom. Skôr ako sme pristúpili k testovaniu účinkov PAV na myšacom modeli, vykonali sme sériu experimentov *in vitro*, konkrétne na mikrotitračných platničkách.

Z *in vitro* experimentov vyplýva, že PAV má výrazný účinok na inhibíciu množenia baktérií, ak sa vo vzorke nachádza v objemovej prevahe. Konkrétne to potvrdzujú opakované experimenty, kedy bol pomer medzi roztokom UTI baktérií k PAV 1:9. Tento výsledok sme overili aj štatistickým testom, ktorý potvrdil vplyv PAV na testované vzorky baktérií. Taktiež sme overovali aj účinky PAV pri iných pomeroch. Získané výsledky však ukazujú, že ak PAV nie je vo výraznej objemovej prevahe voči baktériám, tak jej efekt na inhibíciu množenia baktérií nie je v porovnaní s FYZ významný. Pri slabšej objemovej prevahe, napr. pomere 1:4, PAV inhibuje množenie baktérií len pre ich malé počiatkové koncentrácie.

Z *in vivo* experimentu vyplýva, že PAV by mohla mať efekt pri inhibícii množenia baktérií v močovom mechúre a obličkách. Nevieme, to však s určitosťou potvrdiť alebo vyvrátiť, pretože sme vykonali iba jeden experiment, a tak máme slabú štatistickú vzorku. Výsledky, ktoré sme získali, však naznačujú terapeutický efekt PAV.

Referencie

AHMED, Syed Suhail, Ali SHARIQ, Abdulaziz Ajlan ALSALLOOM, Ibrahim H BABIKIR and Badr N ALHOMOUD, 2019. Uropathogens and their antimicrobial resistance patterns: Relationship with urinary tract infections. *International journal of health sciences* [online]. 2019, vol. 13, no. 2, pp. 48–55. ISSN 1658-3639. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30983946>

BALET, B, PM STUBBERFIELD, D BORBA, al -, M KEILHACKER, A GIBSON, C GORMEZANO, Malcolm JOYCE - and Jet TEAM, 1992. *To cite this article: JET Team.*

BOYANOVA, Lyudmila and Ivan MITOV, 2013. *Antibiotic resistance rates in causative agents of infections in diabetic patients: Rising concerns* [online]. April 2013. Dostupné na: [doi:10.1586/eri.13.19](https://doi.org/10.1586/eri.13.19)

DOBRYNIN, Danil, Gary FRIEDMAN, Alexander FRIDMAN and Andrey STARIKOVSKIY, 2011. Inactivation of bacteria using dc corona discharge: Role of ions and humidity. *New Journal of Physics* [online]. 2011, vol. 13. ISSN 13672630. Dostupné na: [doi:10.1088/1367-2630/13/10/103033](https://doi.org/10.1088/1367-2630/13/10/103033)

HENSEL, Karol, Katarína KUČEROVÁ, Barbora TARABOVÁ, Mário JANDA, Zdenko MACHALA, Kaori SANO, Cosmin Teodor MIHAI, Mitiță CIORPAC, Lucian Dragos GORGAN, Roxana JIJIE, Valentin POHOATA and Ionut TOPALA, 2015. Effects of air transient spark discharge and helium plasma jet on water, bacteria, cells, and biomolecules. *Biointerphases* [online]. 2015, vol. 10, no. 2, p. 029515. ISSN 1934-8630. Dostupné na: [doi:10.1116/1.4919559](https://doi.org/10.1116/1.4919559)

HOWDEN, Colin W, Professor OF MEDICINE and Discussants D WILLIAM CHEY, 2014. *Clinical Rationale for Confirmation Testing After Treatment of Helicobacter pylori Infection: Implications of Rising Antibiotic Resistance.*

ICHIMARU, Setsuo, 1993. *Nuclear fusion in dense plasmas.*

IKAWA, Satoshi, Atsushi TANI, Yoichi NAKASHIMA and Katsuhisa KITANO, 2016. Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2016, vol. 49, no. 42. ISSN 13616463. Dostupné na: [doi:10.1088/0022-3727/49/42/425401](https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/42/425401)

IRVING LANGMUIR RESEARCH LABORATORY, By, GENERAL ELECTRIC CO and SCHENCK, 1928. *2 Davison and Germer*. B.m.: Davies and Horton.

KAMGANG-YOUBI, G., J. M. HERRY, T. MEYLHEUC, J. L. BRISSET, M. N. BELLON-FONTAINE, A. DOUBLA and M. NAÏTALI, 2009. Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2009, vol. 48, no. 1, pp. 13–18. ISSN 02668254. Dostupné na: doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02476.x

KUBINOVA, S., K. ZAVISKOVA, L. UHERKOVA, V. ZABLITSKII, O. CHURPITA, O. LUNOV and A. DEJNEKA, 2017. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. *Scientific Reports* [online]. 2017, vol. 7. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/srep45183

LI, Ying, Min Ho KANG, Han Sup UHM, Geon Joon LEE, Eun Ha CHOI and Ihn HAN, 2017. Effects of atmospheric-pressure non-thermal bio-compatible plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells. *Scientific Reports* [online]. 2017, vol. 7. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/srep45781

MA, Ruonan, Shuang YU, Ying TIAN, Kaile WANG, Chongde SUN, Xian LI, Jue ZHANG, Kunsong CHEN and Jing FANG, 2016. Effect of Non-Thermal Plasma-Activated Water on Fruit Decay and Quality in Postharvest Chinese Bayberries. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2016, vol. 9, no. 11, pp. 1825–1834. ISSN 19355149. Dostupné na: doi:10.1007/s11947-016-1761-7

MACHALA, Zdenko, Barbora TARABOVA, Karol HENSEL, Eva SPETLIKOVA, Libusa SIKUROVA and Petr LUKES, 2013. Formation of ROS and RNS in water electro-sprayed through transient spark discharge in air and their bactericidal effects. *Plasma Processes and Polymers* [online]. 2013, vol. 10, no. 7, pp. 649–659. ISSN 16128850. Dostupné na: doi:10.1002/ppap.201200113

ROYINTARAT, Tanitta, Eun Ha CHOI, Dheerawan BOONYAWAN, Phisit SEESURIYACHAN and Wassanai WATTANUTCHARIYA, 2020. Chemical-free and synergistic interaction of ultrasound combined with plasma-activated water (PAW) to enhance microbial inactivation in chicken meat and skin. *Scientific Reports* [online]. 2020, vol. 10, no. 1. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/s41598-020-58199-w

RUPF, Stefan, Antje LEHMANN, Matthias HANNIG, Barbara SCHÄFER, Andreas SCHUBERT, Uwe FELDMANN and Axel SCHINDLER, 2010. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, vol. 59, no. 2, pp. 206–212. ISSN 00222615. Dostupné na: doi:10.1099/jmm.0.013714-0

SAKUDO, Akikazu, Yoshihito YAGYU and Takashi ONODERA, 2019. *Disinfection and sterilization using plasma technology: Fundamentals and future perspectives for biological applications* [online]. 1. October 2019. B.m.: MDPI AG. Dostupné na: doi:10.3390/ijms20205216

SARINONT, Thapanut, Ryu KATAYAMA, Yosuke WADA, Kazunori KOGA and Masaharu SHIRATANI, 2017. Plant Growth Enhancement of Seeds Immersed in Plasma Activated Water. In: *MRS Advances* [online]. B.m.: Materials Research Society, p. 995–1000. Dostupné na: doi:10.1557/adv.2017.178

SHEN, Jin, Ying TIAN, Yinglong LI, Ruonan MA, Qian ZHANG, Jue ZHANG and Jing FANG, 2016. Bactericidal Effects against *S. aureus* and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. *Scientific Reports* [online]. 2016, vol. 6. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/srep28505

TANAKA, Hiromasa, Masaaki MIZUNO, Kenji ISHIKAWA, Kae NAKAMURA, Fumi UTSUMI, Hiroaki KAJIYAMA, Hiroyuki KANO, Shoichi MARUYAMA, Fumitaka KIKKAWA and Masaru HORI, 2012. *Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells.*

TANAKA, Hiromasa, Kae NAKAMURA, Masaaki MIZUNO, Kenji ISHIKAWA, Keigo TAKEDA, Hiroaki KAJIYAMA, Fumi UTSUMI, Fumitaka KIKKAWA and Masaru HORI, 2016. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Scientific Reports* [online]. 2016, vol. 6. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/srep36282

XU, Dehui, Shuai WANG, Bing LI, Miao QI, Rui FENG, Qiaosong LI, Hao ZHANG, Hailan CHEN and Michael G. KONG, 2020. Effects of plasma-activated water on skin wound healing in mice. *Microorganisms* [online]. 2020, vol. 8, no. 7, pp. 1–14. ISSN 20762607. Dostupné na: doi:10.3390/microorganisms8071091

YEHIA, S. A., M. E. ZARIF, B. I. BITA, M. TEODORESCU, L. G. CARPEN, S. VIZIREANU, N. PETREA and G. DINESCU, 2020. Development and Optimization of Single Filament Plasma Jets for Wastewater Decontamination. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online]. 2020. ISSN 15728986. Dostupné na: doi:10.1007/s11090-020-10111-0

FMED UK. 2019. Fyzikálno - chemické analytické metódy. [Online] 8. apríl 2019. https://zona.fmed.uniba.sk/uploads/media/Fyzikalno-chemicke_metody_BMF_2018-19.pdf.