

MEDZINÁRODNÁ KONFERENCIA

# *XX. Štiavnické dni 2019*

Zborník recenzovaných príspevkov



Banská Štiavnica, Slovenská republika

01.10. - 03.10.2019

MEDZINÁRODNÁ KONFERENCIA

# *XX. Štiavnické dni 2019*

Zborník recenzovaných príspevkov



Banská Štiavnica, Slovenská republika

01. ~ 03. októbra 2019

Bianka Horváthová, Veronika Silliková  
*Editori*

Univerzita Komenského v Bratislave  
2019

**Medzinárodná konferencia  
XX. Štiavnické dni 2019  
Zborník recenzovaných príspevkov**

**Autori:** Kolektív autorov

Za jazykovú korekciu zodpovedajú autori

**Editori:** RNDr. Bianka Horváthová

RNDr. Veronika Silliková

**Vydavateľstvo:** Univerzita Komenského v Bratislave

**Poradie vydania:** 1. vydanie

**Rok vydania:** 2019

**Strany:** 296

**ISBN:** 978-80-223-4795-2



MEDZINÁRODNÁ KONFERENCIA  
***XX. Štiavnické dni 2019***  
01. - 03. október 2019

**TEMATICKÉ OBLASTI**

1. Rádioenvironmentalistika a mierové využitie jadrovej energie
2. Radiačná ochrana a radónová problematika
3. Environmentálne inžinierstvo a lyzimetrický výskum  
Workshop: Praktické aplikácie monitorovania ekosystémov
4. Environmentálna fyzik, obnoviteľné zdroje energie a jadrová energia

**ORGÁNY KONFERENCIE**

*Odborný garant* prof. RNDr. Ľubomír Mátel, CSc.

*Vedecký výbor* prof. RNDr. Ľubomír Mátel, CSc. - predseda  
prof. Ing. Leonard Hobst, CSc. - podpredseda  
RNDr. Helena Cabáneková, PhD.  
doc. RNDr. Karol Holý, CSc.  
doc. RNDr. Miroslav Horník, PhD.  
doc. Dr. habil. RNDr. Juraj Lesný, PhD.  
RNDr. Ivan Matušek  
prof. RNDr. Beňadik Šmajda, CSc.

*Organizačný výbor* doc. RNDr. Jozef Kuruc, CSc. - predseda  
RNDr. Bianka Horváthová - tajomník  
Ing. Zuzana Bednáriková  
doc. RNDr. Silvia Dulanská, PhD.  
RNDr. Monika Müllerová, PhD.  
RNDr. Veronika Silliková  
Mária Šoková  
Mgr. Martin Valica, PhD.

*Recenzenti* Členovia Vedeckého výboru

*Organizátor konferencie* Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,  
Katedra jadrovej chémie

## Biomedicínske aplikácie studenej plazmy a jej účinky na biomolekuly

### Biomedical applications of cold plasma and its effects on biomolecules

Mgr. Daniel Jakubčin, Mgr. Katarína Kučerová, doc. RNDr. Karol Hensel, PhD.

*Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského*

*Mlynská dolina, 842 48 Bratislava*

*[danieljakubcin@gmail.com](mailto:danieljakubcin@gmail.com)*

#### ABSTRACT

Cold plasma generated by electric discharges in atmospheric pressure air has a great potential for many environmental and biomedical applications. This plasma proved to be useful tool for disinfection and sterilisation of surfaces, water, air, food or even living tissues. Most important biological effects are inactivation of broad spectrum of microorganisms, stimulation of cell proliferation and initialization of apoptosis in cancerous cells. Despite many observed positive effects, an interaction of cold plasma with bacteria and cells is still not very well understood and further experiments are required for better understanding of this complex interaction. This work introduces the field of electric discharges, cold plasma and their biomedical applications, and then specifically focuses on a model protein bovine serum albumin (BSA) dissolved in deionized water. Effects were analysed by UV-VIS and fluorescence spectroscopy and circular dichroism. Results showed effective protein denaturation demonstrated by decrease of absorbance and fluorescence. For lower BSA concentrations, dominant effect was a decrease of pH and subsequent interaction of amino acid tryptophan (Trp) with reactive species generated in solution, which caused blue shift in fluorescence maximum and decrease of  $\alpha$ -helical content. For higher BSA concentrations, dominant effect was denaturation itself and exposition of Trp buried in hydrophobic core of protein, which caused red shift in fluorescence maximum.

**Keywords:** cold plasma, plasma medicine, transient spark, protein, bovine serum albumin, tryptophan

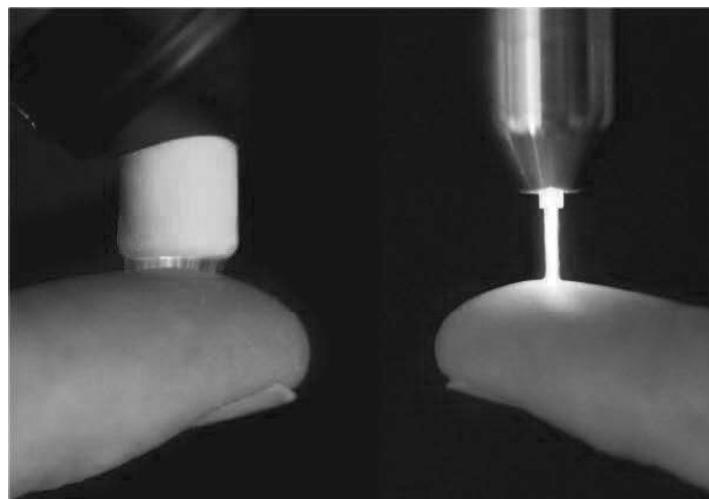
#### ÚVOD

Studená plazma generovaná elektrickými výbojmi pri atmosférickom tlaku našla v posledných desaťročiach široké uplatnenie v mnohých priemyselných, environmentálnych či biomedicínskych oblastiach. Táto plazma dokáže okrem iného účinne zabíjať vysoko odolné mikroorganizmy a odstraňovať biologicky aktívne zvyšky. Vďaka svojim jedinečným vlastnostiam v súčasnosti nahrádzá niektoré zastarané a často neefektívne metódy v oblasti chirurgie, bio-dekontaminácie či sterilizácie rôznych prostredí a povrchov [1]. Dôkazom úspešnosti použitia studenej plazmy v oblasti biológie a medicíny je vznik pomerne mladej, avšak rýchlo sa rozvíjajúcej oblasti, tzv. plazmovej medicíny. Tá skúma interakciu studenej plazmy s bunkami, mikroorganizmami a živými tkanivami prevažne za terapeutickým

účelom. Hlavným cieľom tejto oblasti je jednoduchá, priama a praktická aplikácia studenej plazmy na živé tkanivá a organizmy so selektívnym účinkom. V súčasnosti už existuje niekoľko zariadení resp. terapeutických prístrojov, ktoré využívajú studenú plazmu na liečenie chronických zranení a ľažko hojacich sa rán a napomáhajú k liečeniu rôznych kožných chorôb. V oblasti dentálnej hygiény sa studená plazma javí ako perspektívna alternatíva najmä pri čistení zubných kanálikov a implantátov či pri liečení infekcie ústnej dutiny. Najzaujímavejšou a do budúcnosti najatraktívnejšou aplikáciou studenej plazmy je však liečenie rakoviny. Ukazuje sa, že studená plazma dokáže cielene vyvolať riadenú bunkovú smrť (apoptózu) rakovinových buniek, zatial' čo zdravé bunky sa majú tendenciu regenerovať [2]. Keďže sa plazmová medicína nachádza na hranici oblastí fyziky plazmy, biochémie, biológie a medicíny, procesy, ktoré tu pozorujeme sú často veľmi komplexné a z vedeckého hľadiska náročné na pochopenie. Aby nedošlo k nežiadúcemu poškodeniu zdravých buniek a tkanív, je potrebné tieto procesy čo najlepšie pochopíť z fyzikálneho a biologického hľadiska.

Z fyzikálneho hľadiska je studená plazma ionizovaný plyn so špecifickými charakteristikami. Najčastejším spôsobom jej generácie v laboratórnych podmienkach sú elektrické výboje. Hlavná časť energie dodanej z vysokonapäťového zdroja sa spotrebúva na generáciu energetických elektrónov, ktoré sú v elektrickom poli urýchľované. V pracovnom plyne vznikajú excitované a ionizované atómy a molekuly, ktorých teplota sa však pohybuje len na úrovni izbovej teploty, a preto hovoríme o studenej (nízkoteplotnej) plazme [3]. Výsledkom fyzikálnych a chemických interakcií týchto častic v plyne alebo pri kontakte s vodným prostredím či iným povrchom je vznik neutrálnych reaktívnych častic a radikálov. Reaktívne časticie odvodene od kyslíka a dusíka (ROS a RNS) sú pritom primárne zodpovedné za biologické účinky studenej plazmy [4]. Medzi charakteristických zástupcov týchto reaktívnych častic patrí superoxid ( $O_2^{\cdot -}$ ), peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), ozón ( $O_3$ ), dusíkaté radikály ( $\cdot NO$  a  $\cdot NO_2$ ) a ďalšie. Okrem toho v plazme vzniká aj elektromagnetické žiarenie rôznych vlnových dĺžok od UV žiarenia až po žiarenie infračervené [2].

Studená plazma tak dokáže pôsobiť viacfaktorovo a veľmi komplexne. Hlavná výhoda studenej plazmy je však regulovateľnosť jej parametrov. Zmenou typu elektrického výboja, usporiadania experimentálneho zariadenia, tlaku alebo typu plynu, vzdialenosťi od cieľového objektu alebo času plazmovej expozície možno efektívne prispôsobiť účinky studenej plazmy podľa potreby. Ako vhodné typy elektrických výbojov sa ukazujú dielektrický bariérový výboj a tzv. plazmová tryska, ktoré sú znázornené na **Obr.1**. Dielektrický bariérový výboj pracuje zvyčajne pri atmosférickom vzduchu a generuje plazmu v pomerne veľkom objeme, takže je vhodný najmä na opracovanie väčších plôch. Na rozdiel od toho, plazmová tryska pracuje väčšinou vo vzácnych plynach (argón, hélium) a využíva úzky tok častic, ktoré je možné efektívne zacieliť na konkrétnu oblasť [2].



**Obr. 1** Dielektrický bariérový výboj (vľavo) a plazmová tryska (vpravo) pri kontakte s prstom [2].

Z biologického hľadiska je najdôležitejší efekt studenej plazmy jej schopnosť ničiť široké spektrum mikroorganizmov a baktérií a tiež stimulovať množenie buniek, čo prispieva k regenerácii tkanív a hojeniu rán. Oproti iným metódam, ako napr. rádioterapia alebo laserová terapia, má plazmové opracovanie výhodu v kontrolovanejšom a selektívnejšom účinku práve vďaka reaktívnym časticiam, ktoré tu zohrávajú dominantnú úlohu. V oboch procesoch je však kľúčová interakcia studenej plazmy na rozhraní plynu a kvapaliny alebo priamo v kvapalnom prostredí buniek či mikroorganizmov [2]. Presné pochopenie procesov prebiehajúcich pri interakcii studenej plazmy s biologicky aktívnymi molekulami vo vodnom prostredí je preto kľúčové pre hlbšie pochopenie samotného vplyvu studenej plazmy na komplexnejšie biologické systémy ako bunky či tkanivá.

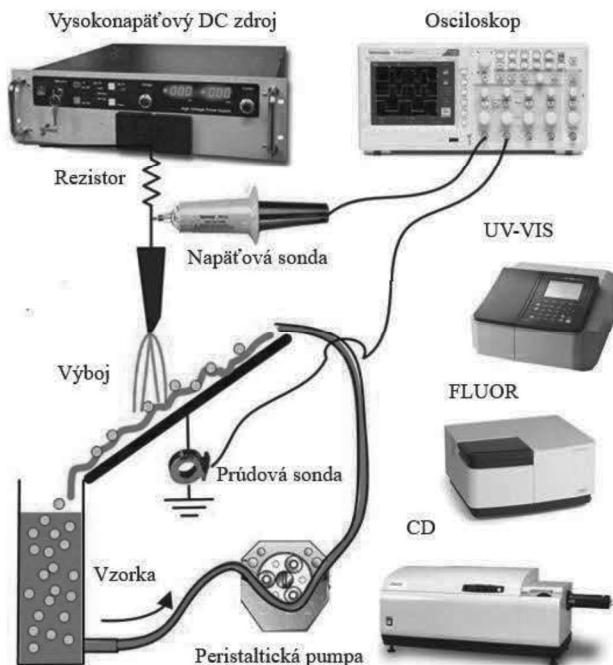
Napriek faktu, že biomolekuly majú v každej bunke nezastupiteľnú úlohu, ich interakcia so studenou plazmom je len veľmi slabo popísaná a existuje pomerne málo publikácií venujúcich sa tejto problematike. Jednou z esenciálnych biomolekúl sú proteíny, ktoré majú v každom organizme množstvo funkcií, ako napr. transportnú (albumíny), katalytickú (enzýmy) či stavebnú (kolagén) [5]. Štúdie zaobrajúce sa účinkami studenej plazmy na proteíny používajú často špeciálny typ výboja alebo je proteín opracovaný vo forme prášku. Attri a kol. [6] napríklad skúmali účinky plazmovej trysky v rôznych nosných plynoch (vzduch, dusík, argón) na hemoglobín a myoglobín, aminokyseliny a DNA. Studená plazma vyvolala zmeny v sekundárnej štruktúre proteínu (pokles  $\alpha$ -závitníc), oxidáciu DNA a zmeny v molekulovej hmotnosti aminokyselín. Tieto efekty sa najvýraznejšie prejavili v dusíku, kde bola zároveň pozorovaná najvýraznejšia koncentrácia reaktívnych častíc a radikálov. Jijie a kol. [7] opracovali hovädzí sérový albumín (BSA) héliovou plazmovou tryskou. Napriek pozorovanému poklesu  $\alpha$ -závitníc výboj nemal dostatočne vhodné parametre na vyvolanie viditeľnejších zmien v proteíne. Hensel a kol. [8] porovnávali účinky héliovej plazmovej trysky a prechodovej iskry vo vzduchu na baktérie, bunky, tDNA a BSA. Podstatne silnejší efekt bol pozorovaný pri prechodovej iskre, najmä vďaka väčšiemu množstvu vytvorených reaktívnych častíc.

Množstvo zo spomínaných výskumov prinieslo zaujímavé a perspektívne výsledky, avšak túto problematiku je potrebné nadalej skúmať a získavať tak ďalšie cenné informácie. Najdôležitejšie faktory, ktoré treba pri experimente zohľadniť, sú vlastnosti experimentálneho

zariadenia, charakter použitého elektrického výboja, vhodný výber vzoriek a analytické metódy použité na ich analýzu. V našej práci bolo hlavným cieľom podrobne preskúmať účinky studenej plazmy generovanej výbojom prechodovej iskry na vodný roztok modelového proteínu BSA. Prechodová iskra sa ukázala ako vhodný typ výboja na generáciu pomerne veľkého množstva reaktívnych častíc, ktoré dominantne vyvolávajú biologické reakcie. Opracovanie proteínu rozpusteného vo vodnom roztoku a opracovaného v prietokovom dynamickom režime taktiež simuluje reálne podmienky biomolekúl v organiznoch. Na analýzu sme použili UV-VIS absorpčnú spektroskopiu ako základnú metódu analyzovania vodných roztokov, fluorescenčnú spektroskopiu ako jednu z najbežnejšie používaných metód pre analýzu proteínov obsahujúcich aromatické aminokyseliny a kruhový dichroizmus na analýzu zmien v sekundárnej štruktúre chirálnych biomolekúl. Taktiež sme sledovali vplyv ďalších faktorov ako teplota a pH roztoku či tvorba zrazenín.

## METODIKA PRÁCE

Naše experimentálne zariadenie pozostávalo z vysokonapäťového zdroja jednosmerného napäťia, ktoré bolo cez rezistor privádzané na prvú elektródu - medicínsku ihlu. Druhá elektróda bola uzemnená a umiestnená v naklonenom teflónovom žľabe, ktorým pretekala vzorka (vodný roztok proteínu BSA). Pri aplikácii napäťia vznikal iskrový výboj, ktorý mal prierazné napätie 12-13 kV a jeho prúdové pulzy amplitúdu 5-15 A. Trvanie pulzu bolo približne 50 ns a tieto pulzy sa opakovali s frekvenciou 1-2 kHz. Schéma použitej aparátury je znázornená na **Obr.2**. Modelový proteín BSA (*Sigma Aldrich A2153*, čistota > 96%, 66,4 kDa) bol rozpustený v roztoku deionizovanej vody (rozsah koncentrácií 15-480 µM) a cyklicky opracovaný plazmom rôzne dlhé expozičné časy. Po dokončení opracovania sme zmerali teplotu a pH roztoku a následne ho odniesli na analýzu pomocou spektrofotometra *Shimadzu UV-1800*, spektrofluorometra *Shimadzu RF-6000* a spektropolarimetra *Jasco J-815*.

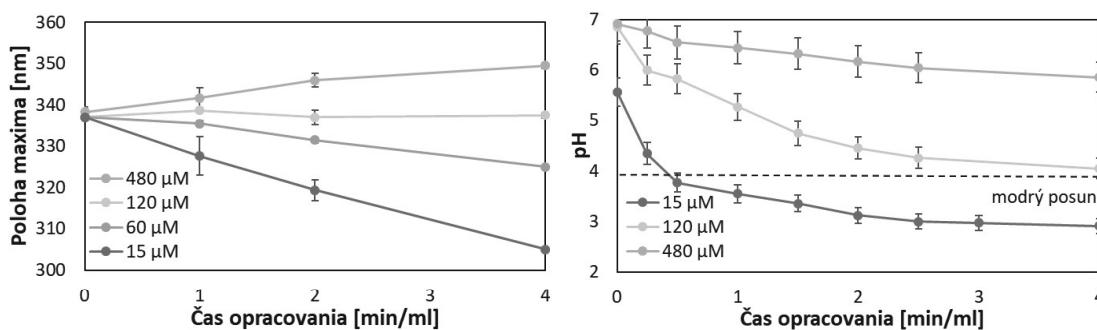


**Obr. 2** Schéma použitého experimentálneho zariadenia.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou UV-VIS absorpcnej a fluorescenčnej analýzy sme pozorovali pokles absorbancie a fluorescence roztoku s rastúcim časom opracovania, čo je prejav efektívnej denaturácie (narušenia štruktúry) proteínu pôsobením studenej plazmy. Táto denaturácia nie je spôsobená teplom, keďže teplota roztoku po opracovaní nepresiahla 30°C a tepelná denaturácia BSA začína od teploty približne 40°C [9].

Pri skúmaní polohy maxima fluorescencie sme pozorovali modrý posun maxima pri opracovaní nižších koncentrácií BSA (15 µM) a červený posun pri opracovaní vyšších koncentrácií BSA (480 µM). Za posun maxima je zodpovedná aminokyselina tryptofán (Trp), ktorá je citlivá na polaritu prostredia, v ktorom sa nachádza [10]. Modrý posun pozorujeme, ak sa Trp zakryje vzhladom na polárne prostredie roztoku (napr. reakciou s inou časticou) a naopak červený posun pozorujeme, ak sa Trp odkryje (napr. denaturáciou proteínu) [11,12]. Tento efekt preto úzko súvisí s pH roztoku [13], ktoré pri nízkych koncentráciách výrazne kleslo vďaka tvorbe nitrátov a nitritov ( $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ ) [14], zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách sa pH zmenilo len mierne. Zmena polohy maxima a pH s časom opracovania pre rôzne koncentrácie BSA je znázornená v **Grafe 1**.



**Graf 1.** Závislosť polohy maxima fluorescencie (vľavo) a pH (vpravo) od času opracovania pre rôzne koncentrácie BSA.

Pri analýze pomocou kruhového dichroizmu sme na základe strednej reziduálnej elipticity v oblasti 208 nm [15] určili relatívne zastúpenie  $\alpha$ -závitníc v BSA. Pre koncentráciu 15 µM bol tento pokles značný (z hodnoty 67% na 40%), pričom pre vyššie koncentrácie sme tento pokles nepozorovali. Tieto merania potvrdili náš predpoklad interakcie Trp s časticami v roztoku pre nižšie koncentrácie BSA, keďže pokles  $\alpha$ -závitníc je častý sprievodný jav ich naviazania na Trp uložený v proteíne BSA [16,17,18].

## ZÁVER

Oblast' plazmovej medicíny, ktorá sa venuje interakcii studenej plazmy s baktériami, bunkami či živými tkanivami, pocituje v posledných rokoch veľký záujem zo strany vedcov najmä vďaka mnohým perspektívny výsledkom. Najvýznamnejšie z nich sú dekontaminácia a sterilizácia rôznych povrchov, napomáhanie hojeniu rán, zubná hygiena či liečba rakoviny. Samotná interakcia studenej plazmy s komplexnými biologickými štruktúrami je ale veľmi komplexná a náročná pre úplné pochopenie. Jednou z metód, ktoré môžu prispieť k lepšiemu pochopeniu týchto účinkov je zameranie sa na jednotlivé časti buniek, akými sú DNA, lipidy alebo proteíny.

V tejto práci sme sa venovali skúmaniu účinkov studenej plazmy generovanej výbojom prechodovej iskry na modelový proteín BSA. Pomocou UV-VIS absorpcnej a fluorescenčnej spektroskopie sme ukázali účinnú denaturáciu BSA vplyvom pôsobenia studenej plazmy. Pri nižších koncentráciách BSA bol dominantným efektom pokles pH, ktorý je spojený s tvorbou reaktívnych častíc v roztoku. Tieto reaktívne častice sa efektívne naviazali na aminokyselinu tryptofán, čo sa prejavilo modrým posunom maxima fluorescencie a poklesom relatívneho zastúpenia  $\alpha$ -závitníc v BSA. Pre vyššie koncentrácie bola dominantným efektom samotná denaturácia proteínu a odkrytie Trp uloženého v jadre proteínu, čo sa prejavilo červeným posunom maxima fluorescencie. Napriek sľubným a zaujímavým výsledkom existuje v tejto oblasti množstvo nezodpovedaných otázok a je preto potrebné vykonať ďalšie merania.

## ZOZNAM LITERATÚRY

- [1] Adamovich, I et al. (2017). *The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology*. J. Phys. D: Appl. Phys. **50**, 323001 (46pp)
- [2] Weltmann K.-D., von Woedtke Th. (2017). *Plasma medicine- current state of research and medical application*, Plasma Phys. Control. Fusion **59**, 014031 (11pp)
- [3] Martišovitš, V. (2006). *Základy fyziky plazmy*. Bratislava: Univerzita Komenského, ISBN 80-223-1983-X
- [4] Machala, Z., Tarabová, B., Hensel, K., Spetlikova, E., Sikurova, L., Lukes, P. (2013). *Formation of ROS and RNS in water electro-sprayed through transient spark discharge in air and their bactericidal effects*, Plasma Process. Polym. **10**, 649–659
- [5] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell, 5th edition*. Garland Science, ISBN 978-0-8153-4105-5
- [6] Attri, P., Kuman, N., Park, JH., Yadav, DK., Choi, S., Uhm, HS., Kim, IT., Choi, EH., Lee W. (2015). *Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma*. Sci. Rep. **5**, 8221
- [7] Jijie R., Pohoata V., Topala I. (2012). *Thermal behavior of bovine serum albumin after exposure to barrier discharge helium plasma jet*, Appl. Phys. Lett. **101**, 144103
- [8] Hensel, K., Kučerová, K., Tarabová, B., Janda, M., Machala, Z., Sano, K., Mihai, CT., Ciorpac, M., Gorgan, LD., Jijie, R., Pohoata, V., Topala, I. (2015). *Effects of air transient spark discharge and helium plasma jet on water, bacteria, cells and biomolecules*, Biointerphases **10**(2), 029515
- [9] Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M., Fujio, Y. (1992). *Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals*, J. Food Sci. **57** (2), 288-292
- [10] Lakowicz, R. J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*. Springer Science+Business Media. New York. ISBN 978-0387-31278-1
- [11] Vivian T. J., Callis R. P. (2001) *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*, Biophys. J. **80**, 2093-2109
- [12] Steinhardt, J., Krijn, J., Leidy, J. G. (1971). *Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects*. Biochemistry, **10**(22), 4005–4015

- [13] White, A. (1959). *Effect of pH on Fluorescence of Tyrosine, Tryptophan and Related Compounds*. Biochemical Journal **71**, 217-220
- [14] Kučerová, K., Henselová, M., Slováková, L., Hensel, K. (2019). *Effects of plasma activated water on wheat: Germination, growth parameters, photosynthetic pigments, soluble protein content, and antioxidant enzymes activity*. Plasma Process Polym. **16**(3), e1800131
- [15] Pelton, T. J., McLean, R. L. (2000). *Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure*. Analytical Biochemistry **277**, 167-176
- [16] Li, D., Wang, Y., Chen, J., Ji, B. (2011). *Characterization of the interaction between farrerol and bovine serum albumin by fluorescence and circular dichroism*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **79**(3), 680–686
- [17] Tian, J., Jiaqin, L., Zhide, H., Xingguo, Ch. (2005). *Binding of the scutellarin to albumin using tryptophan fluorescence quenching, CD and FT-IR spectra*. American Journal of Immunology **1**(1), 21- 23
- [18] Bardhan, M. Mandal, G., Ganguly, T. (2009). *Steady state, time resolved, and circular dichroism spectroscopic studies to reveal the nature of interactions of zinc oxide nanoparticles with transport protein bovine serum albumin and to monitor the possible protein conformational changes*. J. Appl. Phys. **106**, 034701