

Primjena plazme u medicini i stomatologiji

Plasma applications in medicine and dentistry

Diana Mance

Odjel za fiziku, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

Sažetak. U fizici, plazma je ioniziran, kvazineutralan plin za koji se često kaže da je četvrto stanje materije. Dugo vremena se plazma u medicini koristila zbog svojih termalnih svojstava, primjerice za sterilizaciju kirurškog i medicinskog pribora te za rezanje i kauterizaciju tkiva. Generiranjem hladne plazme u atmosferskim uvjetima započelo je novo razdoblje u primjeni plazme u biomedicini. Plazma medicina novo je interdisciplinarno znanstveno područje koje kombinira spoznaje fizike plazme s biomedicinskim i kliničkim znanostima. Hladna atmosferska plazma emitira elektromagnetno zračenje te se sastoji od mnoštva nabijenih i nenabijenih čestica, među kojima su najznačajnije reaktivne kisikove i dušikove vrste. Smatra se da su upravo reaktivne kisikove vrste najvažnije za biološke učinke plazme kao što su inaktivacija mikroorganizama i biofilмова. U dermatologiji se pokazalo da hladna atmosferska plazma pozitivno utječe na zacjeljivanje kroničnih rana. Prvi instrumenti za primjenu hladne plazme na ljudima već su i komercijalno dostupni. Primjena hladne plazme ima velik potencijal za primjenu u onkologiji, ali i u stomatologiji. Mnogobrojne studije dale su vrlo obećavajuće rezultate za primjenu hladne plazme u medicini, no treba imati na umu da mehanizmi međudjelovanja plazme s biološkim tkivom još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, da nema dogovorom prihvaćene definicije doze koju plazma predaje materiji, da još uvijek nema standardiziranih instrumenata za generiranje i karakterizaciju plazme te da za pravu procjenu potencijala primjene atmosferske plazme u medicini i stomatologiji nedostaje više detaljnih *in vivo* studija.

Cljučne riječi: dermatologija; onkologija; plazma; stomatologija

Abstract. Physical plasma is an ionized, quasi-neutral gas. It is often said to be the fourth state of matter. For a long time, plasma was used in medicine exclusively because of its thermal properties for sterilization purposes of surgical equipment and medical supplies, and also to cut and cauterize tissue. The possibility to generate cold plasma in atmospheric conditions marked the beginning of a completely new era in the application of plasma in biomedicine. Plasma medicine is a new interdisciplinary field of science that combines the knowledge of plasma physics to biomedical and clinical sciences. Cold atmospheric plasma emits electromagnetic radiation and it consists out of charged and uncharged particles, among those reactive oxygen and nitrogen species are the most important ones. It is considered that reactive oxygen species cause the most important biological plasma effects, such as inactivation of microorganisms and biofilms. It has been shown in dermatology that cold atmospheric plasma has a healing effect on chronic wounds. First instruments for the application of cold plasma in humans are already commercially available. Cold plasma has a great potential for application in oncology and in dentistry. Numerous studies have yielded very promising results for the application of cold plasma in medicine, but it should be kept in mind that the mechanisms of interaction between plasma and biological tissue are still not fully understood. There is no agreement on the accepted plasma dosages and there are still no standardized instruments for the generation and characterization of plasma. And lastly, for a comprehensive assessment of the potential application of atmospheric plasma in medicine and dentistry we lack more detailed *in vivo* studies.

Key words: dentistry; dermatology; oncology; plasma

Dopisni autor:

Dr. sc. Diana Mance, prof. mat. i fiz.
Odjel za fiziku, Sveučilište u Rijeci
Ulica Radmile Matejčić 2, 51 000 Rijeka
e-mail: diana.mance@uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Za razliku od krvne plazme, koja je tekućina, fizička plazma (plazma u fizici) je kvazineutralan, djelomično ili potpuno ioniziran plin. Plazma čini gotovo 99 % vidljivog svemira, a neki od primjera plazme jesu planetarne maglice, Sunčeva jezgra, vanjski dio Zemljine magnetosfere i munje¹. Za plazmu se kaže da je, uz kruto, tekuće i plinovito stanje, jedno od osnovnih stanja materije.

Plazma medicina je novo interdisciplinarno područje u kojem se isprepleće fizika plazme s medicinskim i kliničkim znanostima. Hladna atmosferska plazma izvor je mnoštva nabijenih i neutralnih čestica, elektromagnetnog zračenja te reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Upravo se te reaktivne vrste smatraju najodgovornijima za dokazane biološke učinke plazme, poput inaktivacije mikroorganizama i biofilмова, utjecaja na proliferaciju i angiogenezu stanica, kao i na nekrozu i apoptozu stanica.

O fizičkoj plazmi prvi je izvjestio britanski fizičar Sir William Crookes 1879. godine nazvavši je „materijom koja zrači“². Sam naziv „plazma“ u fiziku je 50-ak godina kasnije uveo američki kemičar Irving Langmuir³.

Dugi niz godina primjena fizičke plazme u medicini svodila se na sterilizaciju instrumenata te rezanje i kauterizaciju tkiva⁴. Krajem 20. st. primjena plazme dovela je do velikog napretka u tehnologiji implantata, no tek je uspješno generiranje plazme čija je temperatura približno 40 °C i koja nastaje u atmosferskim uvjetima omogućilo primjenu plazme i na biološkim materijalima. Time je otvoren put široj primjeni plazme u medicini te smo danas svjedoci intenzivnog razvoja interdisciplinarnog područja plazma medicine (engl. *plasma medicine*) u kojoj se kombiniraju znanja i tehnike fizike plazme, biomedicinskih znanosti i kliničke medicine⁵.

Ideja ovog rada je u kratkim crtama prezentirati što je fizička plazma i koji uvjeti moraju biti zadovoljeni da bi se ona mogla koristiti u medicini i stomatologiji. Nakon toga će biti opisan jedan od uređaja za generiranje plazme, odobren za korištenje u kliničkim uvjetima i primjenu na ljudima.

Posljednji dio donosi pregled dosadašnje primjene hladne atmosferske plazme u medicini i stomatologiji. Plazma medicina je područje u kojem se vrlo intenzivno istražuje. Broj grupa istraživača koji rade u ovom području je velik, a posljedično i broj objavljenih rezultata. U radu će biti obuhvaćeni samo najvažniji rezultati iz dermatologije kao discipline u kojoj su uređaji za generiranje hladne atmosferske plazme odobreni za korištenje na ljudima, onkologije, za koju možemo reći da je trenutno najuzbudljivije područje moguće primjene plazme, i stomatologije.

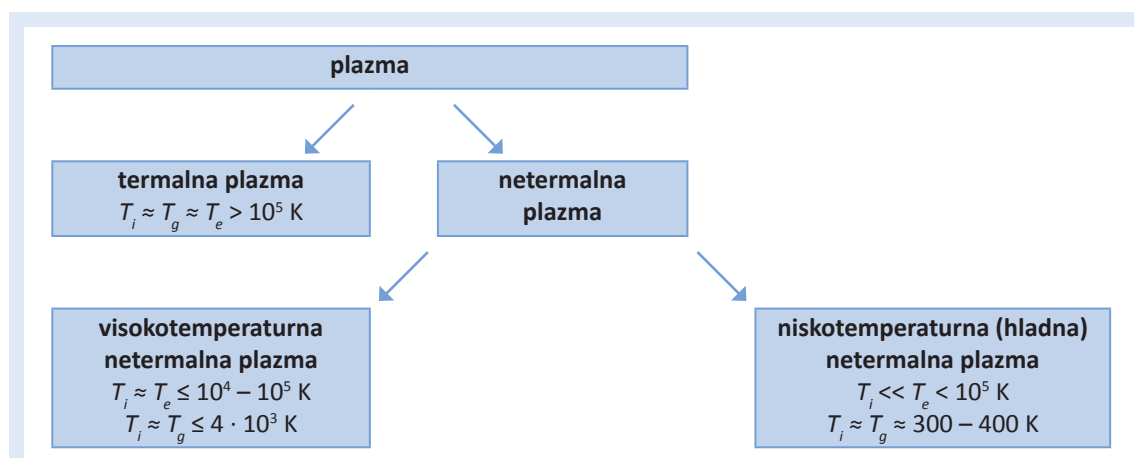
PLAZMA U FIZICI

Da bi ionizirani plin bio plazma trebaju biti zadovoljeni sljedeći uvjeti: a) dimenzije sustava su puno veće od dosega električnog polja nekog naboja u plazmi, odnosno od polumjera Debyeve sfere (λ_D) (gdje je Debyeova sfera dio prostora u kojem se osjeća djelovanje električnog polja nekog naboja u plazmi); b) broj nabijenih čestica u Debyevoj sferi je vrlo velik; i c) plazmena frekvencija je veća od sudarne frekvencije nabijenih i neutralnih čestica^{1,6}.

Osobitosti plazme jesu njena kvazineutralnost te kolektivno međudjelovanje čestica plazme. Naime, promatrana u cjelini plazma je električki neutralna, ali kako se u plazmi uz neutralne čestice nalaze i nabijene čestice, dijelovi plazme su ipak električki nabijeni. Osim toga, zbog postojanja lokalnih nakupina pozitivnog i negativnog naboja, u plazmi se stvaraju električna polja koja utječu na nabijene čestice izvan tih lokalnih koncentracija naboja. Na taj način, svaka nabijena čestica u plazmi istovremeno međudjeluje sa svim ostalim nabijenim česticama plazme uzrokujući za plazmu karakteristično kolektivno (zajedničko) međudjelovanje.

Kao što je već spomenuto i munja predstavlja jednu vrstu plazme. Očigledno da takvu vrstu plazme, između ostaloga zbog visoke temperature i jakih električnih polja, ne možemo koristiti u terapijske medicinske svrhe. Da bismo bolje razumjeli koja vrsta plazme jest pogodna za korištenje u medicini i stomatologiji, potrebno je reći nekoliko riječi o podjeli plazme.

Na slici 1 prikazana je jedna od mogućih klasifikacija plazme⁷. Termalne plazme su visoko ioni-



Slika 1. Podjela plazme

zirane i u njima su zadovoljeni uvjeti lokalne termodinamičke ravnoteže (LTE, engl. *local thermodynamic equilibrium*). Zadovoljenje LTE znači da je u plazmi elektronska temperatura (T_e) približno jednaka ionskoj temperaturi (T_i) koja je pak približno jednaka temperaturi plina (T_g) (koja odgovara translatornoj energiji molekula plina): $T_e \approx T_i \approx T_g$, pri čemu te temperature mogu biti više i od 10^6 K.

Netermalna plazma je djelomično ioniziran plin koji ne zadovoljava LTE uvjete i čije su elektronske temperature niže od 10^5 K. Kod netermalne plazme elektronska temperatura puno je viša od ionske ($T_e \gg T_i$), a ionske temperature približno su jednake temperaturi samoga plina ($T_i \approx T_g$). Kada temperatura plina odgovara sobnoj temperaturi ($\approx 300 - 400$ K) ovu plazmu nazivamo nisko-temperaturnom, odnosno hladnom plazmom.

Prve hladne plazme stvarane su ionizacijom u vakuumskim komorama. Te su niskotlačne hladne plazme svoju primjenu našle u mikroelektronici i tehnici materijala⁶. Tek kada su stvoreni uvjeti za nastanak hladne plazme pri atmosferskom tlaku, mogla je početi primjena hladne plazme u medicinske terapijske svrhe. O primjenama hladne atmosferske plazme (CAP, engl. *cold atmospheric plasma*) na stanice sisavaca prvi su izvjestili Stofels i sur. (2003) čime je započelo „moderno doba“ primjene plazme u medicini^{5,8}. Od tada su razvijeni različiti instrumenti za generiranje CAP-a prema kojima su pojedine vrste CAP-a dobile ime. Neke hladne atmosferske plazme korištene u biomedicinske svrhe jesu: atmosferski plazmeni

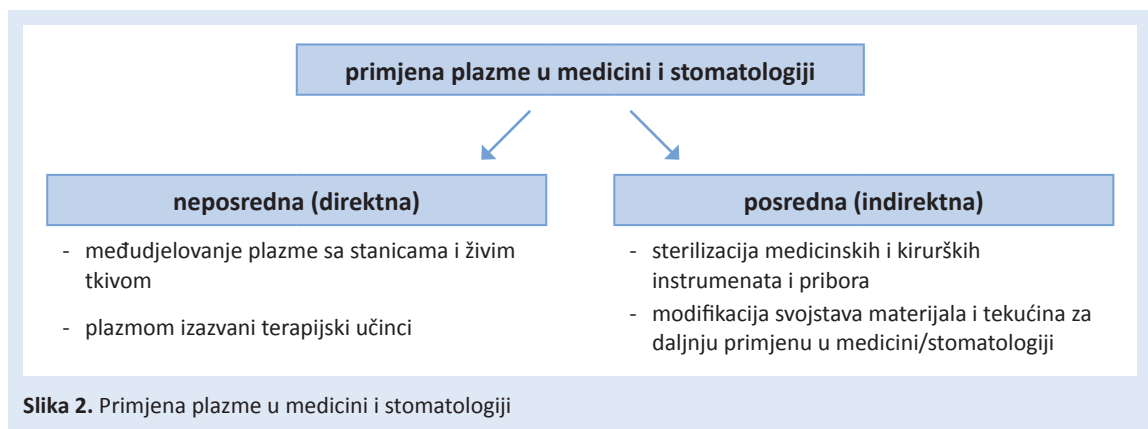
mlaz (APPJ, engl. *atmospheric pressure plasma jet*), korona izboji (engl. *corona discharge*), mikrovalni izboji (engl. *microwave discharge*) i izboji s dielektričnom barijerom (DBD, engl. *dielectric barrier discharge*).

CAP se generira ionizacijom plina koji nema direktan biološki učinak (Ar, He, O₂, N₂, zrak ili njihovim mješavinama)⁹. Predstavljaju izdašan izvor nabijenih čestica, pobuđenih atoma/molekula, elektromagnetnog (EM) zračenja (ultraljubičasto (UV) i infracrveno (IR) zračenje, vidljiva svjetlost), ali i reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*; RNS, engl. *reactive nitrogen species*; RONS, engl. *reactive oxygen and nitrogen species*).⁵

PREDUVJETI ZA PRIMJENU PLAZME U MEDICINI I STOMATOLOGIJI

Primjena plazme u medicini i stomatologiji dijeli se na posrednu i neposrednu primjenu (slika 2). Kod posredne primjene plazma se koristi za pripremu instrumenata i materijala kako bi bili pogodni za daljnju medicinsku primjenu. U posredne primjene plazme ubrajaju se dekontaminacija/sterilizacija kirurških i medicinskih instrumenata te modifikacija/optimizacija svojstava biomaterijala, implantata i tekućina korištenih u biomedicinske svrhe. Kod neposredne primjene plazme u medicini dolazi do direktnog kontakta plazme sa stanicama i tkivom te se za nju koristi CAP.

Da bi se CAP mogao primjenjivati u terapijske svrhe neophodno je detaljno poznavanje⁷:



- a) bioloških učinaka primijenjene plazme;
- b) nuspojava/toksičnih učinaka plazme na stanice i tkiva okruženju tretiranog područja;
- c) fizičkih procesa u plazmi i fizičkih parametara plazme;
- e) faktora rizika: temperature, UV i IR zračenja, slobodnih radikala, EM polja, stvaranja toksičnih plinova, prijenosa energije;
- f) „radno-terapijskog raspona“ primljene doze/trajanja tretmana, u kojem su patogeni i maligne stanice deaktivirani, a zdrave stanice još nisu nepovratno oštećene.

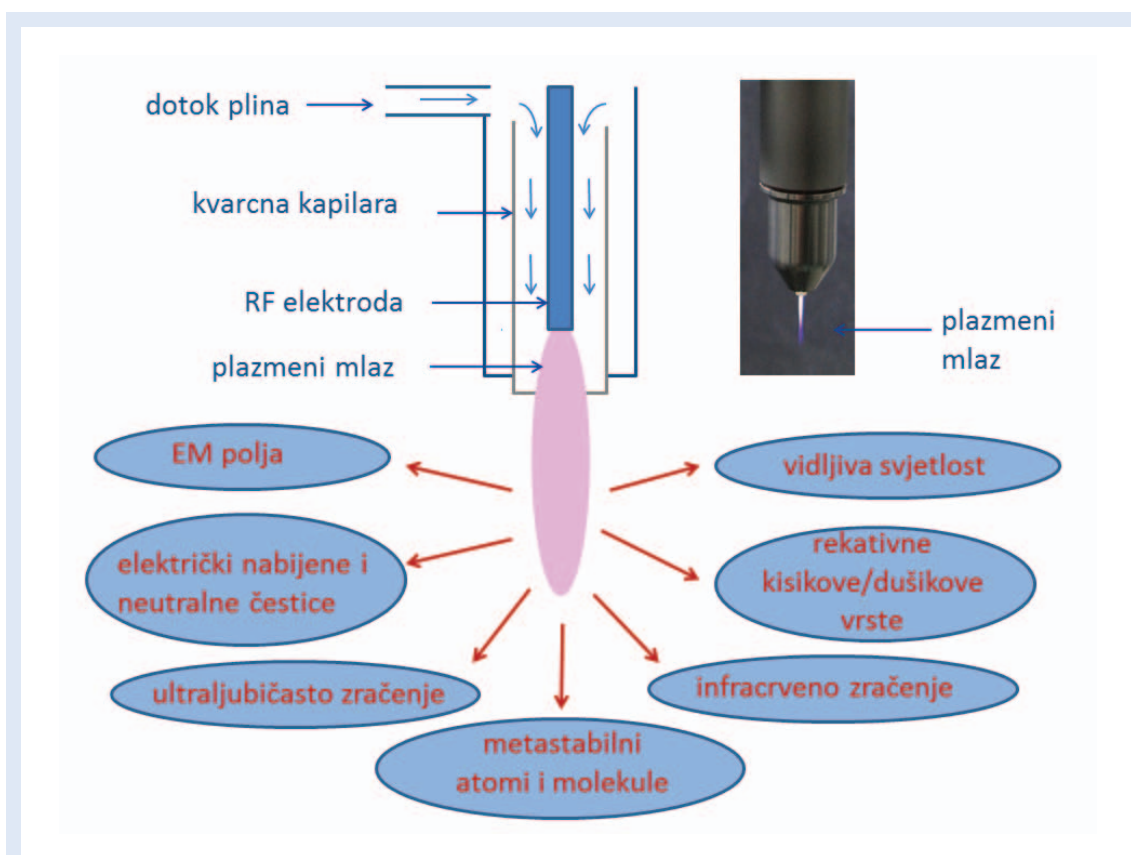
Za ispunjavanje nabrojanih uvjeta neophodno je osigurati optimalnu i pouzdanu aparaturu kako za generiranje tako i za dijagnostiku plazme u karakterističnim biomedicinskim uvjetima. Ispitivanje svojstava CAP-a izuzetno je zahtjevno i još uvijek je predmetom mnogobrojnih istraživanja. Dodatan problem je to što ne postoji dogovorom prihvaćena definicija primljene/predane doze te se o njoj najčešće govori u smislu duljine trajanja tretmana, odnosno vremenske izloženosti djelovanju plazme^{5,10}.

Primjena CAP u biomedicini podrazumijeva rad u vlažnom okruženju. CAP, okolna atmosfera i tekući medij čine složen sustav u kojem nastaju mnogobrojne reaktivne čestice. Kako bi se CAP što bolje okarakterizirao te što bolje shvatio nastanak reaktivnih čestica i promjena koje izaziva međudjelovanje plazme s biološkim tkivom, koriste se mnogobrojne eksperimentalne dijagnostičke tehnike. Neke od primjera korištenih dijagnostičkih metoda jesu: spektroskopija elektronskom paramagnetskom rezonancijom (EPR) kojom se detektiraju radikali (hidroksilni radikal 'OH, superoksidni radikal O₂⁻), optička emisijska spektroskopija (OES,

engl. *optical emission spectroscopy*) za detekciju kemijski aktivnih vrsta, deaktivacija biofilмова na Ti diskovima promatrana je fluorescencijskom mikroskopijom kao i pretražnim elektronskim mikroskopiranjem (SEM, engl. *scanning electron microscopy*), termalne sonde koriste se za mjerenje temperature plazme i određivanje prenesene toplinske energije, a spektrometrijom izotopnih omjera promatraju se izotopne promjene u plazmom tretiranim tekućinama¹¹⁻¹⁷.

Nastojanja da se konstruira što bolji instrument za CAP generiranje rezultirala su mnogobrojnom aparaturom različite konfiguracije i posljedično, mnogobrojnim geometrijama plazme: plazmena igla (engl. *plasma needle*), DBD, APPJ, plazmene baklje (engl. *plasma torch*), mikroplazme, korona izboji... Na slici 3 prikazan je APPJ kINPen 09 (INP Greifswald/neoplas tools GmbH, Greifswald, SR Njemačka). Ovaj instrument je komercijalno dostupan te ima CE odobrenje kojim se potvrđuje da ispunjava zahtjeve koji osiguravaju sigurnost za primjenu na ljudima te je sukladan zahtjevima o očuvanju zdravlja i okoliša Europske unije. Osim toga, kINPen 09 je korišten u mnogobrojnim biološko-medicinskim ispitivanjima i primjenama^{18,19}. Poboljšana verzija kINPen-a 09, kINPen MED, je prvi APPJ s dozvolom za primjenu na ljudima s posebnom namjenom za dermatologiju te je jedan od prvih CAP instrumenta detaljno okarakteriziran prema specifikaciji 91315 njemačkog instituta za standardizaciju, nazvanoj „Opći zahtjevi za izvore plazme koji se primjenjuju u medicini“^{5,20}.

APPJ kINPen radi u kontinuiranom ili pulsnom modu, pri čemu se najčešće koriste He, Ar ili zrak sa standardnim protokom od 5 slm. Osnovni dijelovi kINPen-a (slika 3) su dio za dotok plina, su-



Slika 3. Shematski prikaz (lijevo) i fotografija (desno) izvora plazmenog mlaza kINPen 09 s osnovnim vrstama generiranih čestica i zračenja

stav napajanja (8 W, 220 V, 50/60 Hz) i cilindrična jedinica za generiranje plazme. Plazma se generira primjenom radiofrekventnog (RF) napona (1,1 MHz; 2 – 6 kVpp) na centralnu RF elektrodu. Plazmeni mlaz (dijametra 1 – 2 mm) se širi od vrha centralne elektrode u okolni prostor (slika 3). kINPen je prvenstveno namijenjen tretiranju malih točkastih površina, pri čemu je preporučena udaljenost od vrha centralne elektrode do tretirane površine 7 – 10 mm (na taj način se osigurava kontakt plazme i tretirane površine). Detaljnije o kINPen 09 može se naći u literaturi²¹.

NEKE PRIMJENE HLADNE ATMOSFERSKE PLAZME U MEDICINI I STOMATOLOGIJI

Upravo zbog velikog broja grupa koje rade u području plazma medicine, pri čemu koriste različite CAP izvore, kao i različite vrste stanica, teško je dati jednostavan pregled dosadašnjih rezultata. Woedtke i sur. (2014.) podijelili su CAP biološke učinke letalne i neletalne učinke⁵. Jedan od letalnih učinaka plazme je inaktivacija mikroorganiza-

ma. Kod sisavaca, ovisno o primljenoj dozi, primjena plazme može inducirati ubrzano starenje stanica, ali i dovesti do apoptoze i nekroze. Neletalni učinci plazme jesu stimulacija metabolizma mikroorganizama te selektivni učinci na stanice sisavaca koji uključuju odvajanje stanica iz klastera, utjecaj na migraciju stanica, utjecaj na proliferaciju i angiogenezu, djelovanje na DNK... Nabrojani učinci ovise o duljini trajanja CAP tretmana, plinu korištenom za generiranje plazme, vrsti CAP primjene (posredna/neposredna), vremenu koje je proteklo nakon CAP tretmana, vrsti stanica i okolini u kojoj se stanice nalaze¹⁸.

Dermatologija

Kako je problem tretiranja kroničnih rana na koži usko povezan s razvojem bakterija i biofilмова na ranama, među prvim CAP primjenama promatralo se upravo njihovu inaktivaciju¹⁸. Rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su da CAP učinkovito inaktivira biofilmove i mikroorganizme među kojima su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudo-*

monas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidi*, *Micrococcus luteus* i adenovirusi²²⁻²⁹. Posebno valja istaknuti rezultate Alkawareeka i sur. (2014.) koji su izvijestili o potpunoj inaktivaciji bakterija *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* otporne na metilicilin (MRSA), *E. coli* i *P. aeruginosa*³⁰.

Pozitivni učinci inaktivacije mikroorganizama zabilježeni su i na *in vivo* životinjskim modelima inficiranih akutnih i kroničnih rana^{31,32}. Izvješća o slučajevima procjene mogućnosti zacjeljivanja rana na koži domaćih životinja (pasa, mačaka i zamoraca) kombinacijom CAP tretmana i standardnih antiseptika pokazuju da do potpunog zacjeljivanja rana (na koje sama primjena standardnih antiseptika nije imala učinka ili nije rezultirala potpunim zacjeljivanjem) dolazi u periodu od 3 do 24 tjedna³³.

Kontrolirana klinička studija na zdravim ispitanicima, na čijoj su koži djelovanjem CO₂-lasera izazvane lezije, pokazala je da je nakon tretmana CAP-om došlo do zacjeljivanja kože³⁴. Ispitanici su praćeni 12 mjeseci nakon terapije i u tom razdoblju nije utvrđeno pojavljivanje prekanceroznih pojava na koži za koje se pretpostavljalo da bi mogle biti nuspojava tretmana CAP-om³⁵. Kako u ovim studijama oštećenja na koži nisu bila inficirana mikroorganizmima, rezultati istraživanja ukazuju na potencijal plazme da stimulira regeneraciju tkiva neovisno o antiseptičkim učincima CAP-a⁵. I noviji izvještaji o kliničkim studijama provedenim na ljudima također govore u prilog CAP-u kao novom pristupu tretiranja kroničnih rana^{36,37}.

Iako se mehanizmi djelovanja CAP-a na rane još uvijek istražuju, trenutno je prihvaćen koncept plazmom potpomognutog zacjeljivanja kožnih rana u kojem CAP djeluje u dvije nezavisne faze: 1) antiseptičko djelovanje plazme inaktivacijom bakterija bez oštećivanja okolnog zdravog tkiva; i 2) stimulacija regeneracije tkiva i procesa zacjeljivanja⁷. Nabrojani učinci su posljedica djelovanja ROS-a i RNS/RONS-a, kao i plazmom induciranih promjena u vlažnom okolišu stanica i tkiva⁵.

Uz tretiranje kroničnih rana, u novije vrijeme objavljuju se rezultati primjene CAP-a i u drugim područjima dermatologije, kao što su ublažavanje bolova i ubrzavanje liječenja herpes zostera te tretiranje ekcema i psorijaze³⁸⁻⁴⁰.

Moguća primjena u terapiji tumora

Stanice tumora osjetljive su na egzogene ROS zbog čega se nametnula ideja tretmana CAP-om kao alternative zračenju i kemoterapiji u tretiranju tumora^{12,41}. Utjecaj tretmana CAP-om na stanice tumora intenzivno se istražuje, što je rezultiralo velikim brojem studija u kojima su korišteni različiti izvori CAP-a i mnogobrojne stanične linije izvedene iz različitih tumorskih tkiva^{42,43}. Iako mehanizmi učinka tretmana CAP-om na stanice tumora još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, treba istaknuti nekoliko osnovnih zaključaka/rezultata dosadašnjih studija:

1. tretman CAP-om rezultira povećanom koncentracijom intracelularnih ROS^{44,45};
2. CAP generirane ROS (u manjem udjelu i RNS) induciraju apoptozu stanica raka oštećivanjem njihovog DNK i izazivanjem mitohondrijalne disfunkcije^{12,44,46,47};
3. pretpostavlja se da u djelovanju CAP-a na stanice tumora ključnu ulogu imaju H₂O₂ i NO^{43,48};
4. CAP ima selektivni učinak: normalne (zdrave) stanice pokazuju veću otpornost na negativne učinke CAP-a^{10,12,49};
5. učinci CAP-a ovise o vremenskom trajanju tretmana, odnosno o predanoj dozi⁵⁰⁻⁵³.

U tablici 1 prikazani su osnovni rezultati odabranih *in vitro* studija na humanim tumorima. *In vivo* studije na mišjim modelima također su dale vrlo obećavajuće rezultate^{45,50,54}.

Dosadašnje studije opravdavaju optimizam vezan uz moguću terapiju tumora CAP-om, no ne treba smetnuti s uma da ROS imaju negativan utjecaj i na zdrave stanice te da mehanizam plazmom inducirane apoptoze još uvijek nije razjašnjen^{10,44}. Da bi se tretman CAP-om razvio kao moguća terapija za tumore mora se, uz dokazanu selektivnost tj. izraženije negativno djelovanje CAP-a na stanice tumora u odnosu na zdrave stanice, osigurati i „radno-terapijski“ raspon kako bi doza koju je tkivo primilo istovremeno osigurala letalne posljedice za stanice tumora i što brži oporavak zdravih stanica nakon tretmana^{10,55}.

Dosad se za tretiranje tumorskih stanica najviše koristila neposredna primjena CAP-a, no u posljednjih nekoliko godina sve se više pažnje posvećuje posrednoj primjeni CAP-a, odnosno utjecaju koji na stanice tumora imaju plazmom tretirani (aktivirani) mediji⁴³.

Tablica 1. Osnovni rezultati primjene hladne atmosferske plazme na tumorskim stanicama

Vrsta stanica/tumora	Stanične linije	Plazma	Učinak plazme	Referenca
karcinom dojke	MCF-7	APPJ (He+O ₂)	apoptoza	Kim i sur. (2010) ⁴⁶
karcinom grlića maternice	HeLa	APPJ (zrak, N ₂)	apoptoza, mitohondrijalna disfunkcija	Ahn i sur. (2011) ⁴⁴
karcinom jajnika, fibroblasti	SKOV3, HRA, WI-38, MRC-5	APPJ (Ar)	antiproliferacijski učinak i apoptoza stanica tumora, selektivni učinak: negativni učinci plazme izraženiji za stanice tumora	Iseki i sur. (2012) ⁴⁹
adenokarcinom gušterače	Colo-357, PaTu8988T	APPJ (Ar)	ovisnost učinka o trajanju tretmana (apoptoza za tretmane < 20 s)	Partecke i sur. (2012) ⁵⁰
karcinom pluća, fibroblasti	H460, HCC1588, MRC5, L132	DBD	apoptoza, veća osjetljivost stanica tumora na tretman CAP-om	Panngom i sur. (2013) ¹²
tumor mozga	T98G	APPJ (zrak)	toksični učinci na stanice tumora ovise o primljenoj dozi	Kaushik i sur. (2013) ⁵¹
adenokarcinom grlića maternice, fibroblasti, matične stanice iz adipoznog tkiva, oralni planocelularni karcinom, maligni melanom, kolorektalni karcinom, kolorektalni adenokarcinom, karcinom pluća, sarkom maternice, hepatocelularni karcinom	HeLa, IMR90, ASC, YD-9, G-361, HCT 116 (p53+/+), HCT 116-E6 (p532/2), RKO, HT29, LoVo, DLD-1, HCT15 5, HCT15/CL02, H1299, MES-SA, MES-SA/Dx5, HepG2	DBD (He)	antiproliferacijski učinak, apoptoza, selektivni učinak: negativni učinci plazme posebno izraženi za stanice tumora s mutiranim proteinom p53	Ma i sur. (2014) ⁵⁵
karcinom pločastih stanica vrata, normalne epitelne stanice usne šupljine	JHU-022, JHU-028, JHU-029, SCC25, OKF6, NOKsi	APPJ (He)	selektivni učinak: smanjeno preživljavanje stanica tumora u odnosu na normalne stanice, ovisnost učinka o trajanju tretmana	Guerrero-Preston i sur. (2014) ⁵²
gliomi, normalne endotelne stanice pupčane vene, astrociti	U87, U373, A172, HUVEC, E6/E7	APPJ (He)	apoptoza gliomskih stanica, negativni učinci CAP tretmana izraženiji za gliomske stanice, ovisnost učinka o primljenoj dozi	Siu i sur. (2015) ⁵³
karcinom prostate, normalne stanice prostate	DU145, PrEC	DBD	negativni utjecaji plazme izraženiji za tumorske stanice, normalne stanice imaju mogućnost oporavka	Zhunosova i sur. (2016) ¹⁰

APPJ – atmosferski plazmeni mlaz, DBD – izboji s dielektričnom barijerom

Osim daljnjeg proučavanja utjecaja plazme na stanice tumora, studije ukazuju i na potrebu za unaprjeđenjem/modifikacijom konfiguracija izvora plazme koji bi se koristili u terapiji CAP-om^{50,56}.

Stomatologija

Zubni karijes je kronična infekcijska bolest tvrdog zubnog tkiva uzrokovana bakterijskim djelovanjem. Karijesom zahvaćeno područje zuba prekri-

va mikrobnim biofilm (zubni plak). Metabolički procesi u mikrobnom biofilmu dovode do stvaranja kiselina odgovornih za ireverzibilno razaranje zubnog tkiva⁵⁷. Klasičan pristup tretiranju karijesa uključuje odstranjivanje nekrotičnog/demineraliziranog/inficiranog tkiva mehaničkim bušenjem. Nedostatak ove metode, među ostalim, je destruktivnost: kako bi se osiguralo da šupljina u zubu bude potpuno očišćena od bakterija, od-

stranjuje se i dio zdravog zubnog tkiva. Parodontitis je također bolest povezana sa zubnim plakom, koja može dovesti do odvajanja zubnog mesa od zuba te u konačnici rezultirati gubitkom zuba. Kao što je već spomenuto, CAP se pokazao pogodnim za inaktivaciju mikrobnih biofilмова, stoga ne čudi da ima velik potencijal za primjenu u stomatologiji⁵⁸. CAP zbog svoje konfiguracije (posebice tzv. plazma igla) pruža mogućnost tretiranja malih, nepravilnih i dubokih šupljina i napuklina na zubu kao i zubnih korijenskih kanala⁹.

Mnogobrojne studije polučile su vrlo obećavajuće rezultate o mogućim primjenama hladne atmosferske plazme u medicini i stomatologiji, no mehanizmi međudjelovanja hladne atmosferske plazme i bioloških materijala još nisu u potpunosti razjašnjeni. Za pravu procjenu mogućnosti primjene plazme u medicini nedostaju detaljnije *in vivo* studije, kao i standardizirani uređaji za generiranje i karakterizaciju plazme.

Glavni uzročnik karijesa (primarnog i sekundarnog) je bakterija *Streptococcus mutans*. Djelovanje CAP-a na *S. mutans* na agar podlozi i/ili uzorcima dentina promatrali su, između ostalih, Goree i sur. (2006.), Yang i sur. (2011.) te Liu i sur. (2014.) koji su u izvijestili o potpunoj inaktivaciji bakterija izloženih djelovanju CAP-a u vremenskom periodu od 10 – 15 s⁵⁹⁻⁶¹. Liu i sur. posebno ističu mogućnost korištenja CAP-a za dezinfekciju korijenskih kanala⁶¹. Rupf i sur. (2010) koristili su atmosferski plazmeni mlaz za inaktivaciju više mikrobioloških vrsta za koje je poznato da su uzročnici karijesa: uz *S. mutans*, atmosferskim plazmenim mlazom tretirani su i *Escherichia Coli*, *Lactobacillus casei* i *Candida albicans* koje su bile uzgojene na agarovim podlogama i uzorcima dentina¹³. Iako je studija imala svoja ograničenja te je *S. mutans* pokazala najveću otpornost na tretiranje plazmenim mlazom, a antimikrobna učinkovitost bila je veća na agarovim podlogama nego na uzorcima dentina, rezultati su ocijenjeni kao vrlo obećavajući za stomatološku primjenu. Barbieri i sur. (2007.) upozorili su na visoku prevalenciju *S. mutans* u biofilmovima u kojima se nalazi gljivica *C. albicans*⁶². Time su ukazali na moguću povezanost međudjelovanja ovih bakte-

rija i gljivica s nastankom karijesa⁵⁷. Osim toga, uzročnici protetskog stomatitisa (upale sluznice nepca kod nositelja zubnog protetskog nadomjeska) u 10 – 75 % slučajeva su biofilmovi u kojima je prisutna *C. albicans*⁶³. Koban i sur. (2010) pokazali su da je DBD učinkovitiji u uklanjanju *C. albicans* biofilмова s titanovih pločica u odnosu na klasične antiseptičke tretmane 0,1 % otopinom klorheksidin diglukonata i 0,6 % otopinom natrijeva hipoklorita⁶⁴.

Bakterija *Porphyromonas gingivalis* jedan je od glavnih uzročnika parodontitisa. Mahasneh i sur. (2011) pokazali su značajnu inaktivaciju ovog periodonalnog patogena uzgojenog na agar podlogama i tretiranog CAP-om u odnosu na kontrolnu skupinu⁶⁵. Xiong i sur. (2011.) pokazali su da plazmeni mlaz može prodrijeti 15 μm duboko u biofilm i inaktivirati *P. gingivalis*⁶⁶.

Enterococcus faecalis, jedna od najznačajnijih bakterija koje uzrokuju neuspjeh tretmana zubnog korijenskog kanala, učinkovito je inaktivirana primjenom CAP-a na ekstrahiranim zubima⁶⁷. Pei i sur. (2012) koristili su prijenosni generator APPJ kojim su uspjeli inaktivirati 25,5 μm *E. faecalis* biofilma, što je ukazalo na to da reaktivne vrste ne djeluju inaktivirajuće samo na površinski sloj, već prodiru do dna biofilмова⁶⁸.

Sterilizacija Ti diskova, odnosno odstranjivanje *S. mutans* i biofilмова te sterilizacija stomatoloških instrumenata odstranjivanjem *Bacillus subtilis* i *E. coli*, pokazala se uspješnijom od klasične UV sterilizacije^{64,69}. Iako nije u potpunosti eliminirao biofilmove s Ti pločica, CAP se ipak pokazao kao metoda superiorna tretiranju laserom i klorheksidinom te zračnom abrazijom⁷⁰.

Primjena CAP-a na Ti implantatima rezultira inaktivacijom biofilмова, ali i promjenom hrapavosti i sposobnosti močenja tretirane površine. Pokazalo se da to pozitivno utječe na rast osteoblasta čime se tretman CAP-om nametnuo kao moguća pomoć u uspješnijoj oseointegraciji implantata⁷¹. Duske i sur. (2015.) uspoređivali su ponašanje osteoblasta na Ti diskovima koji su bili tretirani mehaničkim putem, CAP-om ili kombinacijom mehaničkog četkanja i CAP-a, u svrhu uklanjanja bakterijskih biofilмова⁷². Utvrđeno je da je kombinirani tretman, koji je započeo mehaničkim četkanjem, nakon kojeg je uslijedilo tretiranje

CAP-om, rezultirao čistom Ti površinom, što je omogućilo stanicama osteoblasta rast usporediv s rastom stanica na sterilnim kontrolama.

Lee i sur. (2010.) su, na ekstrahiranim ljudskim zubima, pokazali da kombinacija CAP-a i vodikova peroksida povećava učinkovitost izbjeljivanja kod zubi s mrljama od crnog vina i kave, u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj su zubi tretirani samo vodikovim peroksidom⁷³. Šantak i sur. (2014.) pokazali su da CAP u kombinaciji s gelovima za izbjeljivanje ubrzava proces izbjeljivanja zubi⁷⁴.

Uspješnost izbjeljivanja zuba temelji se na koncentraciji gela i vremenskom trajanju samog postupka izbjeljivanja. No, produljeno vrijeme primjene gela na zubima može dovesti do oštećenja cakline, kao i do demineralizacije i smanjene tvrdoće zubi. CAP se u ovom slučaju koristi kao kemijski aktivator jer ubrzava degradaciju vodikova peroksida. Konvencionalni „ubrzivači“ izbjeljivanja jesu razni izvori svjetlosti kao što su halogene i IR lampe, svjetleća dioda (LED, engl. *light emission diode*) i laser. Za CAP metodu utvrđen je manji porast temperature u odnosu na konvencionalne metode, što znači da se uporabom CAP-a u svrhu izbjeljivanja zubi smanjuje mogućnost oštećenja potpornog aparata zubi i/ili zubne pulpe⁷⁴.

Iz navedenih primjera vidimo da je primjena CAP-a u stomatološkim *in vitro* studijama do sada dala vrlo obećavajuće rezultate, no za stvarnu procjenu uspješnosti tretmana CAP-om nedostaju detaljna *in vivo* istraživanja⁷⁵.

ZAKLJUČAK

Plazma je ionizirani plin koji se često naziva i četvrtim agregatnim stanjem materije. Uspješnim generiranjem tzv. hladne atmosfere plazme (CAP) započelo je intenzivno razdoblje istraživanja mogućih primjena plazme na biološkim materijalima. CAP se sastoji od nabijenih i neutralnih čestica, emitira EM zračenje te reaktivne kisikove i dušikove vrste za koje se vjeruje da su najviše odgovorne za prepoznate biološke učinke plazme.

Do sada se CAP najviše koristio u dermatološkim istraživanjima, posebno u području inaktivacije mikroorganizama i zacjeljivanja kroničnih rana, pa su tako i prvi instrumenti s dozvolom za pri-

mjenu na ljudima upravo iz ovog područja. Trenutno je najviše pažnje istraživača usmjereno na moguću primjenu CAP-a u onkologiji. No, kao i u stomatologiji, i ovdje su istraživanja najvećim dijelom *in vitro* te za stvarnu procjenu uspjeha tretiranja CAP-om moramo pričekati na više *in vivo* studija.

Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja vrlo obećavajući, pred znanstvenicima je mnogo posla: još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi međudjelovanja CAP-a i materije, nije definirana doza koju CAP predaje materiji na koju djeluje te nema standardiziranih instrumenata za generiranje, ali niti za karakterizaciju plazme namijenjenoj za primjenu u medicini.

Izjava o sukobu interesa: autorica izjavljuje da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Vršnak B. Temelji fizike plazme. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga, 1996;3–7.
2. Crookes W. On radiant matter. J Franklin Inst 1879;108: 305–16.
3. Langmuir I. Oscillations in ionized gases. Proc Natl Acad Sci U S A 1928;14:627–37.
4. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. J Dtsch Dermatol Ges 2010;8: 968–76.
5. Von Woedtke T, Metelmann HR, Weltmann KD. Clinical plasma medicine: state and perspectives of *in vivo* application of cold atmospheric plasma. Contrib Plasma Phys 2014;54:104–17.
6. Grill A. Cold plasma in materials fabrication: from fundamentals to applications. 1st Edition. New York: Wiley-IEEE Press, 1994:13–7.
7. Weltmann KD, Von Woedtke T. Basic requirements for plasma sources in medicine. Eur Phys J-Appl Phys 2011;55:13807.
8. Stoffels E, Kieft IE, Sladek RE. Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle. J Phys D Appl Phys 2003;36:2908–13.
9. Arora V, Nikhil V, Suri NK, Arora, P. Cold atmospheric plasma (CAP) in dentistry. Dentistry [Internet]. 2014;4. [cited 2017 March 20]. Available from: <https://www.omicsonline.org/cold-atmospheric-plasma-cap-in-dentistry-2161-1122.1000189.pdf>
10. Zhunussova A, Vitol EA, Polyak B, Tuleukhanov S, Brooks AD, Sensenig R et al. Mitochondria-Mediated Anti-cancer Effects of Non-Thermal Atmospheric Plasma. PloS one [Internet]. 2016;1. [cited 2017 February 18]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0156818&type=printable>.
11. Tresp H, Hammer MU, Winter J, Weltmann KD, Reuter S. Quantitative detection of plasma-generated radicals

- in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Phys D Appl Phys* [Internet]. 2013;46. [cited 2017 February 18]. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/46/43/435401/pdf>.
12. Panngom K, Baik KY, Nam MK, Han JH, Rhim H, Choi EH. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2013;4. [cited 2017 February 18]. Available from: <http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n5/pdf/cddis2013168a.pdf>.
 13. Rupf S, Idlibi AN, Umanskaya N, Hannig M, Nothdurft F, Lehmann A et al. Disinfection and removal of biofilms on microstructured titanium by cold atmospheric plasma. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 2012; 28:126–37.
 14. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B et al. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New J Phys* [Internet]. 2010;12. [cited 2017 February 18]. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1367-2630/12/7/073039/pdf>.
 15. Kewitz T, Fröhlich M, von Frieling J, Kersten H. Investigation of a Commercial Atmospheric Pressure Plasma Jet by a Newly Designed Calorimetric Probe. *IEEE Trans Plasma Sci* 2015;43:1769–73.
 16. Mance D, Wiese R, Kewitz T, Kersten H. Calorimetric probes for the characterization of an atmospheric pressure plasma jet used in plasma medicine: the ongoing search. *Verhandlungen der Deutsche Physikalische Gesellschaft* 2016;1:184.
 17. Mance D, Geilmann H, Brand WA, Kewitz T, Kersten H. Changes of 2H and 18O abundances in water treated with non-thermal atmospheric plasma jet. *Plasma Process Polym* 2017; Forthcoming.
 18. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther* 2014;22:477–90.
 19. Schoenbach KH, Becker K. 20 years of microplasma research: a status report. *Eur Phys J D* 2016;70:1–22.
 20. Mann MS, Tiede R, Gavenis K, Daeschlein G, Bussiahn R, Weltmann KD et al. Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED. *Clin Plasma Med* 2016;4:35–45.
 21. Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C et al. Atmospheric pressure plasma jet for medical therapy: plasma parameters and risk estimation. *Contrib Plasma Phys* 2009;49:631–40.
 22. Matthes R, Bekeschus S, Bender C, Koban I, Hübner NO, Kramer A. Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* [Internet]. 2012;7. [cited 2017 Feb 20]. Available from: http://www.online-jdi.com/media/article/2012/02/EB4F5944-E9C7-4504-95E9-F3D2B39D3D42/EB-4F5944E9C7450495E9F3D2B39D3D42_oa_rupf_eng_1_original.pdf.
 23. 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;48:33–7.
 24. Hähnel M, von Woedtke T, Weltmann KD. Influence of the air humidity on the reduction of *Bacillus* spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge. *Plasma Process Polym* 2010;7:244–9.
 25. Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, Morfill GE, Wolf A, Boxhammer V et al. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *J Phys D Appl Phys* [Internet]. 2011;44. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/44/50/505201/pdf>.
 26. Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M et al. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *J Hosp Infect* 2012;81:177–83.
 27. Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *J Antimicrob Agents* 2014;43:154–60.
 28. Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schröder K, Kramer A et al. Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS one* [Internet]. 2012;7. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042539>.
 29. Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S et al. Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms. *PLoS one* [Internet]. 2013;8. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0070462>.
 30. Alkawareek MY, Algwari QT, Laverty G, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS one* [Internet]. 2012;7. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0044289>.
 31. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol* 2011;60:75–83.
 32. Nakajima Y, Mukai K, Rahayu HS, Nur M, Ishijima T, Enomoto H et al. Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clin Plasma Med* 2014;2:28–35.
 33. Kramer A, Lademann J, Bender C, Sckell A, Hartmann B, Münch S et al. Suitability of tissue tolerable plasmas (TTP) for the management of chronic wounds. *Clin Plasma Med* 2013;1:11–8.
 34. Metelmann HR, von Woedtke T, Bussiahn R, Weltmann KD, Rieck M, Khalili R et al. Experimental recovery of CO₂-laser skin lesions by plasma stimulation. *The American Journal of Cosmetic Surgery* 2012;29:52–6.
 35. Metelmann HR, Vu TT, Do HT, Le TN, Hoang TH, Phi TT et al. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clin Plasma Med* 2013;1:30–5.
 36. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Görlitz A et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge pla-

- sma generator (PlasmaDerm® VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:148–55.
37. Hartwig S, Doll C, Voss JO, Hertel M, Preissner S, Raguse JD. Treatment of Wound Healing Disorders of Radial Forearm Free Flap Donor Sites Using Cold Atmospheric Plasma: A Proof of Concept. *J Maxillofac Oral Surg* 2016;75:429–35.
 38. Isbary G, Shimizu T, Zimmermann JL, Heinlin J, Al-Zaabi S, Rechfeld M et al. Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. *Clin Plasma Med* 2014;2:50–5.
 39. Emmert S, Brehmer F, Hänßle H, Helmke A, Mertens N, Ahmed R et al. Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clin Plasma Med* 2013;1:24–9.
 40. Klebes M, Lademann J, Philipp S, Ulrich C, Patzelt A, Ulmer M et al. Effects of tissue-tolerable plasma on psoriasis vulgaris treatment compared to conventional local treatment: A pilot study. *Clin Plasma Med* 2014;2:22–7.
 41. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004;7:97–110.
 42. Schlegel J, Körtzer J, Boxhammer V. Plasma in cancer treatment. *Clin Plasma Med* 2013;1:2–7.
 43. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J et al. Principles of using cold atmospheric plasma stimulated media for cancer treatment. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep18339>.
 44. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS, Lee JS. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PLoS one* [Internet]. 2011;6. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028154>.
 45. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer* 2012;130:2185–94.
 46. Kim SJ, Chung TH, Bae SH, Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Appl Phys Lett* 2010;97:023702.
 47. Hirst AM, Simms MS, Mann VM, Maitland NJ, O'Connell D, Frame FM. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br J Cancer* 2015;112:1536–45.
 48. Bekeschus S, Kolata J, Winterbourn C, Kramer A, Turner R, Weltmann KD et al. Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free Radical Res* 2014;48:542–49.
 49. Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H et al. Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *App Phys Lett* 2012;100:113702.
 50. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Die-drich S et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* [Internet]. 2012;12. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-473>.
 51. Kaushik NK, Kim YH, Han YG, Choi EH. Effect of jet plasma on T98G human brain cancer cells. *Curr Appl Phys* 2013;13:176–80.
 52. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2014;34:941–6.
 53. Siu A, Volotskova O, Cheng X, Khalsa SS, Bian K, Murad F et al. Differential effects of cold atmospheric plasma in the treatment of malignant glioma. *PLoS one* [Internet]. 2015;10. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126313>.
 54. Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A et al. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma Med* 2011;1:27–43.
 55. Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee KW, Song K. Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. *PLoS one* [Internet]. 2014;9. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.009194756>. Kumar N, Attri P, Yadav DK, Choi J, Choi EH, Uhm HS. Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet. *Sci Rep* [Internet]. 2014;4. [cited 2017 Feb 20]. Available from: http://www.nature.com/articles/srep07589?message-global=remove&WT.ec_id=SREP-20150113&spMailingID=47800240&spUseRID=MzcwNDE0MDA2MjcS1&spJobID=601886815&spRreportId=NjAxODg2ODE150.
 57. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013;17. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003616>.
 58. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res* [Internet]. 2013;3. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://medicalgasresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-9912-3-21>.
 59. Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E. Killing of S. mutans bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006;34:1317–24.
 60. Yang B, Chen J, Yu Q, Li H, Lin M, Mustapha A et al. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *J Dent* 2011;39:48–56.
 61. Liu CT, Wu CJ, Yang YW, Lin ZH, Wu JS, Hsiao SC et al. Atomic oxygen and hydroxyl radical generation in round helium-based atmospheric-pressure plasma jets by various electrode arrangements and its application in sterilizing streptococcus mutans. *IEEE Trans Plasma Sci* 2014;42:3830–6.
 62. Barbieri DD, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TI, Pinheiro RL. Analysis of the in vitro adherence of Streptococcus mutans and Candida albicans. *Braz J Microbiol* 2007;38:624–31.

63. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:51–9.
64. Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E et al. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro—proof of principle experiment. *J Clin Periodontol* 2011;38:956–65.
65. Mahasneh A, Darby M, Tolle SL, Hynes W, Laroussi M, Karakas E. Inactivation of *Porphyromonas gingivalis* by low-temperature atmospheric pressure plasma. *Plas Med* 2011;1:191–204.
66. Xiong Z, Du T, Lu X, Cao Y, Pan Y. How deep can plasma penetrate into a biofilm? *Appl Phys Lett* 2011;98:221503.
67. Lu X, Cao Y, Yang P, Xiong Q, Xiong Z, Xian Y et al. An RC plasma device for sterilization of root canal of teeth. *IEEE Trans Plasma Sci* 2009;37:668–73.
68. Pei X, Lu X, Liu J, Liu D, Yang Y, Ostrikov K et al. Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. *J Phys D Appl Phys* 2012;45:165205.
69. Sung SJ, Huh JB, Yun MJ, Chang BM, Jeong CM, Jeon YC. Sterilization effect of atmospheric pressure non-thermal air plasma on dental instruments. *J Adv Prosthodont* 2013;5:2–8.
70. Idlibi AN, Al-Marrawi F, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A et al. Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. *Biofouling* 2013;29:369–79.
71. Duske K, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe B, Holtfreter B et al. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol* 2012;39:400–7.
72. Duske K, Jablonowski L, Koban I, Matthes R, Holtfreter B, Sckell A et al. Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials* 2015;52:327–34.
73. Lee HW, Nam SH, Mohamed AA, Kim GC, Lee JK. Atmospheric pressure plasma jet composed of three electrodes: application to tooth bleaching. *Plasma Process Polym* 2010;7:274–80.
74. Šantak V, Zaplotnik R, Milošević S, Klarić E, Tarle Z. Atmospheric pressure plasma jet as an accelerator of tooth bleaching. *Acta Stomatol Croat* 2014;48:268–78.
75. Lee JH, Jeong WS, Seo SJ, Kim HW, Kim KN, Choi EH et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma functionalized dental implant for enhancement of bacterial resistance and osseointegration. *Dent Mater* 2017;33:257–70.