Određivanje fizičko-kemijskih karakteristika terapijskoga polja visokofrekventnoga ozon generatora

Prebeg, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:673719

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Domagoj Prebeg

ODREĐIVANJE FIZIČKO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA TERAPIJSKOGA POLJA VISOKOFREKVENTNOGA OZON GENERATORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Domagoj Prebeg

ODREĐIVANJE FIZIČKO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA TERAPIJSKOGA POLJA VISOKOFREKVENTNOGA OZON GENERATORA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof.dr.sc. Božidar Pavelić
Prof.dr.sc. Davor Pavuna

Zagreb, 2016.



UNIVERSITY OF ZAGREB

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Domagoj Prebeg

DETERMINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES IN THE TREATMENT FIELD OF A HIGH-FREQUENCY OZONE GENERATOR

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Prof.dr.sc.Božidar Pavelić

Prof.dr.sc. Davor Pavuna

Zagreb, 2016.



UNIVERSITY OF ZAGREB

SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Domagoj Prebeg

DETERMINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES IN THE TREATMENT FIELD OF A HIGH-FREQUENCY OZONE GENERATOR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Zahvaljujem mentorima, profesorima i svim suradnicima na velikoj količini uložene energije i vremena. Vi ste svojim načinom rada, strpljivim podukama i mudrim savjetima uvelike oplemenili ovaj rad i moja znanja.

Hvala mojim roditeljima i sestri na podršci i inspiraciji. Mojim anđelima hvala na razumijevanju za svaki propušteni trenutak i ne odlazak u park zbog pisanja ovog rada. Sada tata može s vama na kraj svijeta! Posebno veliko hvala mojoj dragoj supruzi na podršci, strpljenju, energiji i ljubavi kojima je na ovom, za našu obitelj dugom, putu ispunjavala i svakoga dana iznova ispunjava naš dom.

Bogu hvala na inspiraciji i prisutnosti.

Ovaj rad posvećujem svom velikom učitelju

Raulu Prebeg (1952-1999)

SAŽETAK

Svrha je istraživanja bila odrediti fizičke i kemijske karakteristike terapijskog polja visokofrekvencijskog generatora ozona.

U terapijskom polju je izmjeren spektar plazma elektrode u području 540-940 nm (atomske linije Ne I i O I) dok se kod izboja kroz zrak bilježi i spektar mikro-izboja u području 290-440 nm (molekularne linije N_2 i N_2^+). Na uzorku tkiva su izmjerene vrijednosti efektivnog napona (22-95 mV), i efektivne struje (0,22-0,95 mA) na osnovu kojih su procijenjene vrijednosti gustoće struje (4-19 μA/mm^2) kao i snage (5-65 μW) te predane energije u ovisnosti o vremenu izlaganja (0,14-10,75 mJ kod trajanja zahvata 30-120 sekundi). Kod oba modaliteta primjene, u frekvencijskom području 33 kHz, zabilježena je jakost magnetskog polja (1-3,07 A/m) i gustoće magnetskog toka (1,25-3,86 μT). Prilikom pojave mikro-izboja u zračnom međuprostoru, u frekvencijskom području iznad 40 MHz, se bilježi magnetsko polje jakosti (5-49 mA/m) te gustoće magnetskog toka od (6,5- 62,7 nT). Jakost električnog polja na udaljenosti od 10 mm od elektrode iznosi 248-586 V/m. Tijekom provedbe zahvata zabilježene su značajne promjene u temperaturi površine tkiva te one ovisno o intenzitetu i trajanju zahvata (30-120 sek) iznose od 2.6 do 12,2°C. Statistička analiza rezultata ukazala je na značajnu razliku u vrijednostima fizičkih veličinama s obzirom na dva modalitet primjene.

Na osnovu navedenih dokaza se zaključuje da djelovanje ispitivanog uređaja ne bi trebalo pripisivati isključivo ozonu, kao što je to dosad bio slučaj, već kumulativnom učinku svih, ovim istraživanjem dokazanih, fizičkih i kemijskih čimbenika koji su tijekom zahvata prisutni u terapijskom polju.

Ključne riječi: hladna atmosferska plazma, dielektrični barijerni izboj, mikro-izboj, plazma filamenti, toplinski učinci, mjerenja elektromagnetskih polja i struja u terapijskom polju, optička emisijska spektroskopija, infracrvena termografija

SUMMARY

Determination of Physical and Chemical Properties in the Treatment Field of a High-Frequency Ozone Generator

A high-frequency ozone generator Ozonix (Biozonix GmbH, Germany) is classified as a medical ozone generator, thus its therapeutic effects have, so far, been attributed exclusively to ozone effect. The operative principle of the device and ozone production through a dielectric barrier discharge using glass electrodes filled with a noble gas requires presence of additional physical and chemical factors, besides ozone, in the treatment field during the procedure. The purpose of the study was to determine the physical and chemical properties in the treatment field of the said device. For that purpose, measuring of emission spectra, electric and magnetic values as well as changes in surface temperature on tissue samples, as functions of the selected intensity and exposure time, was conducted, and two basic application modalities (contact discharge and air gap discharge) were used.

Materials and Methods: Optical emission spectroscopy was used to record the spectrum of a plasma electrode's glow discharge, a micro discharge occurring in the aerial interspace (air gap) between the electrode and the targeted surface and the spectrum of the discharge through a liquid medium on the surface of the tissue sample. By measuring electromagnetic values present in the treatment field, physical values of electric and magnetic fields were recorded, as well as currents passing through the treatment field. Thermographic measurements were used to record temperature changes at different intensities (10-100%) and exposure durations (30, 60, 90 and 120 seconds).

Results: In the treatment field, two main emission spectra were recorded. Spectral lines of plasma electrode's glow discharge were recorded in the optical range between 540 and 940 nm, which were identified as atomic lines of neon (Ne I) and oxygen atoms (O I). This spectrum is observed in all treatment modalities. During the formation of micro-discharges in the air gap between the electrode and the treated surface, spectral lines were recorded in the optical range between 290 and 440 nm, which were identified as molecular lines of N_2 and N_2^+.

On the tissue samples (pork skin), as a function of output intensity (10-100%), electrical values were recorded by use of oscilloscope and low impedance (U_{in} = 100) probe: RMS voltage (22-95 mV), RMS current (0,22- 0.95 mA). These values were used to calculate current density (4-19 μA/mm2) as well as power (5-65 μW). Using the same duration periods

as the ones used in the examination of temperature change at the tissue surface (30-120 sec), the values of committed (delivered) energy were estimated (0,14-10,75 mJ).

Magnetic fields were recorded at two frequency ranges. In the frequency range of 33 kHz, magnetic field was recorded in both treatment modalities as a function of intensity (10-100%) for direct contact discharge H(1,93 ± 0,59 A/m), B (2,43 ± 0,75 μT), *f* (32151 ± 985Hz) and air gap discharge H (2,5 ± 0,52 A/m), B (3,14 ± 0,65 μT), *f* (34526 ± 833 Hz). Only in the case of micro-discharge formation in the air gap were additional peaks of magnetic field observed in a wide frequency range from 40 to above 400 MHz. Due to the low intensity, magnetic field values were calculated only for 41.5 MHz peak, where H field was 0,032 ± 0,014 A/m and B field was 40 ± 17,4 nT. At 10 mm distance from plasma electrode surface, electric field strength was recorded in the range from 248 to 586 V/m depending on the selected intensity (10-100%). During the treatment, a mild increase of temperature on the surface of the tissue samples was recorded (2,6-12,2°C) as a function of intensity (20-100%) and exposure time (30-120 seconds).

Conclusion: The results of the conducted research confirm the presence of mildly ionized cold atmospheric plasma in the treatment field during air gap discharge. In both treatment modalities, the presence of light in visible red and near infrared spectra, electric field, magnetic fields, the currents flowing through the tissue and mild heat generated on the surface of the tissue sample were confirmed in the treatment field. Furthermore, a significant difference was determined in the values of physical properties with respect to the application modality, where the values of temperature increase and magnetic field strengths are significantly higher in the air gap modality whilst the values of electric current (and other derived values) are lower compared to direct contact modality.

According to the results of this research, it can be concluded that treatment effects with the tested devices must be attributed not only to ozone, but to cumulative effects of all physical and chemical factors, the presence of which was recorded in the treatment field during this research.

Keywords: cold atmospheric plasma, dielectric barrier discharge, micro-discharge, plasma filaments, heating effects, measurement of electromagnetic fields and currents in treatment field, infrared thermography, optical emission spectroscopy

Popis skraćenica:

AP-1	aktivacijski protein 1
ATP	adenozin trifosfat
AWG	American Wire Gauge – Američka standardizacija ožičenja
B polje	gustoća magnetskog toka (jedinica Tesla)
CCO	citokrom C oksidaza
CFU	(eng. colony forming units) - jedinica formiranja kolonija
DBI	dielektrični barijerni izboj
E polje	električno polje
EMP	elektromagnetsko polje
eNOX	eritrocitna NADPH-oksidaza
ETL	elektronski transportni lanac
FAD/$FADH_2$	oksidirani / reducirani oblik flavin adenin dinukleotida
GSH	glutation
GSH-Ox	glutation oksidaza
GSH-Rd	glutation reduktaza
GSH-T	glutation transferaza
H polje	jakost magnetskog polja (jedinica A/m)
HAP	hladna atmosferska plazma
LOP	lipidni oksidacijski produkti
M polje	magnetsko polje
NAD+/NADH	oksidirani / reducirani oblik nikotinamid dinukleotida
$NADP^+$/NADPH	oksidirani / reducirani oblik nikotinamid dinukleotid fosfata
NFkB	nuklearni faktor kapa B
NO	dušikov oksid
NOS	NO-sintaza
NOX	NADPH-oksidaza
$ONOO^-$	peroksinitrit
p53	tumor supresorski protein
ppm(v)	eng. parts per million (in volume) - udio na milijun (u volumenu)
PUFA	eng. poly-unsaturated fatty acids – polinezasićene masne kiseline
RNS	eng. reactive nitrogen species – reaktivne vrste dušika
ROS	eng. reactive oxygen species – reaktivne vrste kisika
SAR	eng. specific absorption rate – specifična stopa apsorpcije
SOD	superoksid dismutaza
UVA	ultraljubičasta svjetlost od 315-400 nm
VFGO	visokofrekvencijski generator ozona

SADRŽAJ

1 UVOD **1**

1.1 Povijesni pregled **2**

1.2 Svojstva plazme **7**

1.2.1 Definicija plazme 7

1.2.2 Kemijske reakcije plazme 9

1.2.3 Dielektrični barijerni izboj 12

1.3 Sustavi za proizvodnju ozona i hladne plazme **16**

1.3.1 Generatori ozona 16

1.3.2 Generatori hladne plazme 17

1.3.3 Visokofrekvencijski generator ozona 19

1.4 Interakcije s biološkim sustavima **22**

1.4.1 Ozon, reaktivne kisikove vrste i lipidni oksidacijski produkti 22

1.4.2 Elektromagnetska polja i struje 28

1.4.3 EM zračenje u vidljivom, bliskom UV i IC dijelu spektra 39

1.5 Biofizička svojstva bioloških sustava **43**

1.5.1 Termodinamička svojstva organizma 43

1.5.2 Energetska svojstva stanice 44

1.5.3 Endogeni izvori reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta 46

1.5.4 Elektrodinamička svojstva bioloških sustava 51

1.5.5 Fotodinamička svojstva stanice 55

2 SVRHA RADA I HIPOTEZA **57**

3 MATERIJALI I POSTUPCI **60**

3.1 Ispitivani uređaj **62**

3.2 Optička emisijska spektroskopija **67**

3.2.1 Materijali 67

3.2.2 Mjerni postupci 68

3.3 Mjerenja elektromagnetskih veličina **70**

3.3.1 Materijali 70

3.3.2 Mjerni postupci 73

3.4 Mjerenje temperaturnih promjena na površini uzroka tkiva **80**

3.4.1 Materijali 80

3.4.2 Mjerni postupak 81

4 REZULTATI **85**
4.1 Emisijski spektri zabilježeni u terapijskom polju **86**
4.1.1 Emisijski spektar elektrode 86
4.1.2 Emisijski spektar izboja kroz zrak 88
4.1.3 Emisijski spektar izboja kroz tekući medij na površini tkivnog uzorka 92
4.1.4 Spektralne linije zabilježene u terapijskom polju 94
4.2 Elektromagnetske veličine prisutne u terapijskom polju **95**
4.2.1 Električno polje 95
4.2.2 Magnetsko polje 98
4.2.3 Efektivne vrijednosti napona i struje zabilježene na uzorku tkiva 101
4.3 Promjena temperature na površini tkivnog uzorka **107**
4.4 Statistička analiza 111
4.4.1 Razlika fizičkih veličina prema vrsti izboja 111
4.4.2 Predikcija promjene temperature intenzitetom i trajanjem zahvata 112
4.4.3 Predikcija predane energije intenzitetom i trajanjem zahvata 114

5 RASPARAVA **117**
5.1 Emisijski spektar elektrode **118**
5.1.1 Poznati učinci 119
5.2 Emisijski spektar pri izboju kroz zrak **120**
5.2.1 Poznati učinci 122
5.3 Elektromagnetske veličine **126**
5.3.1 Električno polje elektrode 127
5.3.2 Magnetsko polje 130
5.3.3 Električne veličine prisutne u terapijskom polju 132
5.3.4 Poznati učinci 138
5.4 Promjena temperature na površini uzorka tkiva **140**
5.4.1 Poznati učinci 143
5.5 Opće razmatranje **143**

6 ZAKLJUČAK **147**

7 LITERATURA **149**

8 ŽIVOTOPIS **166**

1 UVOD

1.1 Povijesni pregled

Od početka čovječanstva pa sve do današnjih dana elektromagnetska energija je svojom beskrajnom snagom i intrigantnom pojavom plijenila pažnju čovjeka. Gotovo svaki biološki proces – kako mikroskopski, tako i makroskopski – popraćen je djelovanjem elektromagnetske energije. Njezin tijek, raspodjela i međudjelovanja igraju važnu ulogu u funkcioniranju živih organizama: od kretanja iona kroz staničnu membranu do promjene konformacijskih stanja molekula; od metabolizma pojedinačne stanice do ukupne funkcije čitavog tijela; od najmanje interakcije tijela s okolinom do razine složenih misaonih procesa. Moderna medicinska znanost u sve većoj mjeri proučava fenomene interakcije elektromagnetske energije u fiziološkim i patofiziološkim procesima.

Svjetlosni, zvučni i ostali energetski fenomeni električnog izboja, popraćeni karakterističnim mirisom, predstavljali su neiscrpni izvor inspiracije za brojne istraživače: od prvog susreta sa statičkom električnom iskrom, koja je stvorena trljanjem sumpornih kugli ili jantara, preko munja impozantnih veličina, koje je Nikola Tesla proizvodio u svom laboratoriju u Colorado Springsu (1). To objašnjava dugu i bogatu povijest istraživanja električnih proboja u plinovima koja u brojnim slučajevima čine osnovu velikih znanstvenih otkrića. Mihail V. Lomonosov pretpostavio je još davne 1743. godine da su munje kao i polarna svjetlost (aurora) fenomeni prouzročeni električnim izbojima u atmosferi (2). Michael Faraday, početkom 19. stoljeća, na osnovu svojih eksperimenata s iskrama i svjetlosnim izbojima korone, zaključuje kako njihova svojstva ovise i o tlaku, dok Charles-Augustin Coulomb krajem istog stoljeća, uz velika otkrića na području elektriciteta, otkriva i tamne izboje (2). Istraživanja fenomena električnih proboja u plinovima s kraja 19. i početka 20. stoljeća predstavljaju osnovu za razvoj i potvrđivanje atomske i kvantne teorije (2).

Ova i slična otkrića bila su, u velikoj mjeri, moguća zbog napretka u staklopuhačkim tehnikama kao i tehnikama evakuacije staklenih cijevi i separacije plinova. Njemački fizičar i staklopuhač Heinrich Geiβler izumio je 1857. godine plinsku cijev koja je putem visokog napona proizvodila tinjave izboje (eng. *glow discharge*) u plinovima (3). *Geiβlerova cijev*, kao i njegova vakuumska pumpa, predstavlja osnovu velikog broja eksperimenata i instrumenata tog doba, koji se i danas koriste u stvaranju proboja u plinu. Tako William Crookes, postizanjem višeg stupnja vakuuma u *Geiβlerovoj cijevi*, razvija katodnu cijev te zapaža fenomene pojave svjetlosti na staklenim stijenkama koji se nalaze nasuprot katodi (2). Johann Hittorf obavlja ispitivanja *Crooksovih cijevi* te ukazuje na to da je sjaj prouzročen

specifičnim zrakama koje 1876. godine Eugen Goldstein naziva katodnim zrakama, a Sir Joseph John Thompson 1897. godine opisuje da su sastavljene od, dotad nepoznatih, negativno nabijenih subatomskih čestica (2). Zbog navedenog se Thompsonu pripisuje otkriće elektrona. Wilhelm Conrad Röntgen, istražujući učinke raznih stupnjeva vakuuma u cijevima, 1895. godine otkriva X-zrake (2). Početak 20. stoljeća obilježen je brojnim otkrićima na području fizičkih fenomena električnih proboja u plinovima. Tako Irving Langmuir i Lewi Tonks 1928. godine opisuju ionizirani plin koji se sastoji od raspršenih elektrona, iona kao i drugih pobuđenih i nabijenih čestica te ga nazivaju plazmom. Također, otkrivaju oscilacije elektrona u plazmi koje teoretski objašnjavaju te definiraju *Langmuirovu frekvenciju* plazma-elektronskih oscilacija (4).

Dok je 19. stoljeće okarakterizirano naglim razvojem znanosti o elektromagnetizmu i električnim probojima u plinovima, njegov kraj predstavlja progresivne promjene u smislu elektroinženjerstva. Među brojnim pionirima ovog područja Nikola Tesla se zasigurno ističe kao jedan od velikana i vizionara koji je elektromagnetizam iz znanstvene znatiželje prometnuo u osnovno sredstvo modernog života i pokretačku silu druge industrijske revolucije.

Tesla je kao izumitelj i prvi istraživač koji je došao u kontakt s umjetno stvorenim izvorima izmjenične struje visokih napona i frekvencija među svojim prvim opažanjima i zapisima bilježio upravo učinke svojih uređaja i struja na ljudsko zdravlje. Njegova se istraživanja na ovom području mogu pratiti već s početka devedesetih godina 19. stoljeća. U radu koji iznosi 1898. godine, na osmom godišnjem skupu Američkog društva za elektroterapiju u Buffalu u New Yorku, pod naslovom *"High-frequency oscilators for electro-therapeutic and other purposes"*, navodi da je jedna od prvih zabilježenih i izvanrednih značajki struja visokih frekvencija, koja bi mogla imati veliki značaj za liječnike, mogućnost prolaska relativno velike količine električne energije kroz tijelo osobe bez nanošenja boli ili ozbiljne nelagode (5). Također, iznosi da su konačni učinci liječenja njegovom zavojnicom sigurno pozitivni, ali da je jednosatno izlaganje prejako da bi se provodilo učestalo te time već u samom početku definira važnost doziranja ovakve vrste terapije (5). Tesla prikazuje brojne konstrukcije uređaja proizašlih iz vlastitih istraživanja te navodi brojne mogućnosti primjene oscilirajućih struja visokih frekvencija i napona u svrhu dezinfekcije i stimulacije ljudskog organizma (5). Prvi bilježi i da toplina prouzročena strujama visokih frekvencija može utjecati na biološke sustave te time postavlja temelje dijatermije. Zanimljivo je da su i prvu praktičnu primjenu Teslinog uređaja za proizvodnju ozona prepoznali upravo liječnici (6).

Prije Röntgenova otkrića X-zraka uporaba električne struje kao terapijskog sredstva svodila se na rijetku upotrebu *Faradayevih* i galvanskih struja koje su se koristile kao dodatna terapija uz starije konvencionalne metode liječenja. Upravo razvoj rendgenskih zraka, a time i kontakt liječnika s tehnologijama koje proizvode struje znatno većeg potencijala od dotadašnjih elektroterapijskih uređaja, predstavlja svojevrsnu prekretnicu u primjeni fizičkih metoda u liječenju. Dr. Frederick Finch Strong dodao je 1897. godine Teslinom izvoru visokog napona *Geißlerovu cijev* koja sadrži razrijeđeni plin. Strong u svojoj knjizi *High Frequency Currents* iz 1908. godine detaljno opisuje uređaje, metode i rezultate liječenja strujama visokih frekvencija te navodi veliki broj indikacija u kojima se elektroterapija visokim frekvencijama pokazala učinkovitom (7).

Dr. Noble Eberhart, autor brojnih knjiga o medicinskoj primjeni visokofrekvencijskih struja i rendgenskih zraka, 1911. godine objavljuje *"A working manual of high frequency currents"* gdje, uz medicinsku primjenu struja, u devetom poglavlju detaljno opisuje primjenu ozona u liječenju tuberkuloze, anemija, pneumonije, gihta i drugih bolesti (slika 1) (8). Navodi mnogobrojne terapijske uređaje koji koriste oscilirajuće struje visokih potencijala i frekvencija spregnute s *Geißlerovom cijevi*, što ukazuje na to da je početkom 20. stoljeća primjena elektroterapijskih metoda u liječenju bila u punom zamahu. Čest prikaz modela uređaja za terapiju visokim frekvencijama i opcijom za korištenje X-zraka najbolji je primjer kako su u to doba dijagnostički i terapeutski uređaji te njihova primjena bili blisko povezani. Eberhart također opisuje i elektroterapijske postupke koji se koriste u dentalnoj medicini u liječenju infekcija usne šupljine i parodontnih bolesti te navodi različite vrste uređaja i elektroda za tu namjenu.

Dr. Sinclair Tousey objavio je 1916. godine veliki udžbenik o medicinskim strujama i rendgenskim zrakama s praktičnim poglavljem o fototerapiji u kojem je identificirao samo dva oblika visokofrekvencijskih uređaja koji se koriste u medicini: model Teslinog ili Oudinovog visokonaponskog rezonatora i D'Arsonvalov model visokih struja (9). Dr. Gustave Kolischer u New Yorku 1932. godine u svom seminaru, na Američkom kongresu fizikalne terapije, iznosi da Tesline električne struje visokih frekvencija daju vrlo učinkovite rezultate u liječenju karcinoma, nadilazeći rezultate koji se postižu standardnim operacijama (10). Primjer takvog liječenja karcinoma kože lica upotrebom elektroterapije prikazan je na slici 1 f (8).



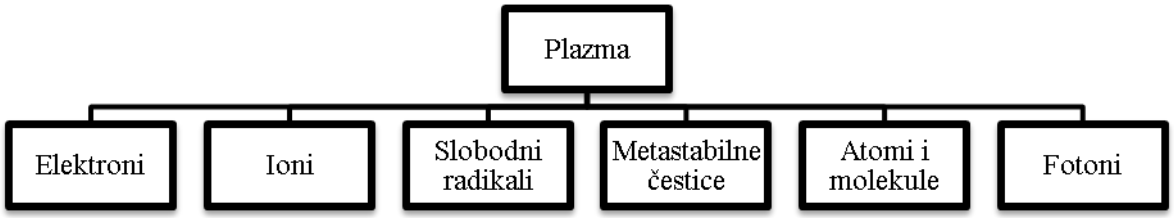
Slika 1. a) radni priručnik visokofrekvencijskih struja dr. Noblea Eberharta iz 1911. godine,
b) prikaz primjene uređaja,
c) prikaz različitih sustava *Tesline zavojnice* spregnute s različitim oblicima *Geißlerove cijevi*,
d) prikaz dijagnostičko-terapijskog sustava (X-zrake i struje visoke frekvencije),
e) oblici elektroda za primjenu u dentalnoj medicini,
f) rezultati liječenja karcinoma kože ovom vrstom terapije
(preuzeto iz 9)

Elektroterapijske metode doživljavaju procvat početkom 20. stoljeća. Autori tog doba opisuju svoja iskustva, metode i rezultate u brojnim knjigama, publikacijama te organiziraju brojna društva za elektroterapiju koja rade na proučavanju i razmjeni iskustava te razvoju metoda ove nove vrste liječenja. S razvojem prvih antibiotika, koji su postali glavni odabir u liječenju infekcija, što je i omogućilo daljnji eksplozivni razvoj farmaceutske industrije u svim drugim područjima medicine, terapije elektromagnetskom energijom padaju u drugi plan. No, razvojem istraživačkih metoda, koje su omogućile proširivanje spoznaja o važnoj ulozi elektromagnetizma u biološkim procesima, kao i sve veći broj zdravstvenih izazova povezanih s djelovanjem kemoterapijskih agensa, u 21. stoljeću interes ponovno raste te se razvijaju nove metode i tehnologije koje omogućavaju primjenu elektromagnetske energije u raznim područjima medicine.

1.2 Svojstva plazme

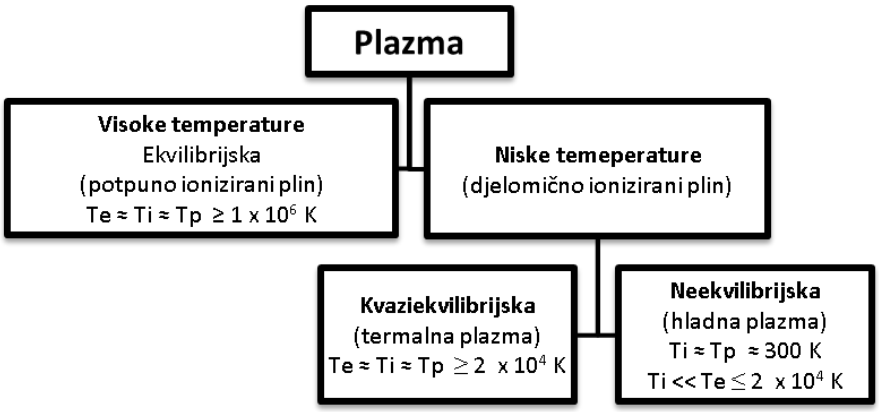
1.2.1 Definicija plazme

Plazma se kao četvrto osnovno agregatno stanje, uz plinovito, tekuće i kruto, u najužem smislu te riječi opisuje kao ionizirani plin. Plazma nastaje djelovanjem energije na molekule i atome plina. Kao rezultat njihove interakcije javljaju se brojni fizički i kemijski procesi u kojima se oslobađaju elektroni, fotoni, ioni, reaktivni spojevi i metastabilne čestice (slika 2) (11). Plazma je najzastupljeniji oblik osnovne tvari u svemiru što čini sastavni dio zvijezda i galaksija dok se na Zemlji očituje kroz pojavnost dva poznata prirodna fenomena: munja i polarne svjetlosti.



Slika 2. Sastav plazme (prilagođeno iz 12)

Plazme se, prema termodinamičkim svojstvima, mogu podijeliti na one visokih i niskih temperatura (slika 3). Plazme visokih temperatura okarakterizirane su potpunom ionizacijom plinova gdje je temperatura iona (T_i) i elektrona (T_e) približno ista, zbog čega se nazivaju ekvilibrijskim plazmama, a temperatura plina (T_p) može iznositi od 10^6 do 10^8 K (12). Plazme niskih temperatura u kojih je plin samo djelomično ioniziran dijele se na neekvilibrijske ili hladne te kvaziekvilibrijske ili termalne plazme. U kvaziekvilibrijskih plazmi temperatura elektrona i iona je također jednaka, no temperatura plina je znatno niža od ekvilibrijskih plazmi te je manja ili jednaka 2 x 10^4 K (12). U neekvilibrijskih plazmi temperatura iona je znatno niža od one elektrona pa je stoga i ukupna temperatura plina znatno niža i može iznositi od 300 K naviše (12). Prema tlaku plina, hladne plazme se dodatno mogu raščlaniti na one koje se stvaraju pri atmosferskim ($p = 10^5$ Pa) ili subatmosferskim uvjetima ($p < 10^5$ Pa).



Slika 3. Vrste plazmi prema fizičkim svojstvima (prilagođeno iz 12)

Ekvilibrijske plazme sastavni su dio zvijezda, dok se umjetno stvorene koriste u fuzijskim reaktorima. Kvaziekvilibrijske plazme se zbog svojih relativno visokih temperatura koriste uglavnom u industriji u svrhu jetkanja i varenja materijala, dok su neekvilibrijske hladne atmosferske plazme, koje se stvaraju pri sobnim temperaturama, pogodne za primjenu na biološkim tkivima (13).

Zbog velike razlike u masi, brzina elektrona u plazmi je nekoliko redova veličina veća od brzine atomskih jezgara pa se na elektronsko kretanje može gledati kao na kretanje elektrona unutar polja stacionarnih jezgara. Stupanj ionizacije plazme definiran je kvocijentom broja ioniziranih čestica i ukupnog broja čestica. S obzirom na to da je u hladnim plazmama gustoća elektrona i iona jednaka, one su, gledano izvana, električno neutralne (kvazineutralno stanje). Lokalne prostorno-vremenske devijacije kvazineutralnosti, zbog kojih se javljaju *Coulombovi potencijali* u plazmi, ograničene su u prostoru i vremenu frekvencijom plazme i *Debyeovom duljinom* koja predstavlja specifičnu udaljenost na kojoj plazma održava neutralni naboj. *Debyeova duljina* opisuje slabljenje *Coulombovog potencijala*, koji proizvodi lokalni naboj u plazmi, zbog električnog oklopljivanja (eng. *sheielding*) svake nabijene čestice s česticama suprotnog naboja koje se nalaze u njezinoj okolini (14).

Vrlo važan fizički parametar plazme je njezina gustoća (oznaka: *n)*, koja predstavlja zbroj gustoća elektrona i iona (14). Učinkovitost i brzina reakcija gotovo svih procesa koji se odvijaju u plazmi izravno su povezani s njenom gustoćom.

1.2.2 Kemijske reakcije plazme

Elektroni, u interakciji s atomima i molekulama plina, uzrokuju elastične i neelastične sudare. Elastični su sudari obilježeni sudaranjem čestica pri čemu dolazi do raspršivanja i redistribucije kinetičke energije. U neelastičnih sudara elektroni predaju gotovo svu svoju energiju neutralnim česticama te uzrokuju prvu fazu reakcije koju obilježavaju ekscitacija, ionizacija i disocijacija. U drugoj fazi reakcije dolazi do međusobnih interakcija pobuđenih i neutralnih čestica kao i njihovih interakcija s električnim i elektromagnetskim poljima što dovodi do rekombinacije, neutralizacije, fragmentacije i aglomeracije (15). Reakcije u plinovitoj fazi, koje se mogu odvijati između elektrona i težih čestica, prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Reakcije elektrona (e^-) i teških čestica (AB) u plinovitoj fazi plazme (prilagođeno iz 12 i 14)

Reakcije	**Opis**
$AB + e^- \rightarrow AB^* + e^-$	Ekscitacija
$AB + e^- \rightarrow AB^+ + 2\,e^-$	Ionizacija
$AB + e^- \rightarrow A + B + e^-$	Disocijacija
$AB + e^- \rightarrow AB + e^-$	Elastično raspršivanje
$AB^* + e^- \rightarrow AB + e^- + h\nu$	Deekscitacija
$AB + e^- \rightarrow A + B + e^-$	Fragmentacija
$AB + e^- \rightarrow A + B^+ + e^-$	Disocijativna ionizacija
$AB + e^- \rightarrow A + B^-$	Disocijativno vezanje
$A^+ + B + e^- \rightarrow A + B$	Volumna rekombinacija

U kontaktu s drugim površinama različite vrste plazme mogu pokrenuti dodatne reakcije koje su prouzročene sudaranjem elektrona, iona i slobodnih radikala u sprezi s elektromagnetskim zračenjem u UV i vidljivom spektru pospješujući time fizičko-kemijske reakcije na površini (tablica 2).

Većina elektrona koji se oslobađaju u hladnoj atmosferskoj plazmi su niske energije (0,5 – 4 eV), no postoji i mali ali značajan broj visokoenergetskih elektrona (8 – 15 eV) koji značajno pridonose razvoju određenih reakcija (14). Većina elektrona koja se stvara u hladnoj atmosferskoj plazmi ima dovoljnu energiju za postizanje disocijacije kemijskih veza organskih spojeva (tablica 3) (16).

Tablica 2. Reakcije plazme s površinom (prilagođeno iz 14)

Reakcije	**Opis**
$AB + C_{(s)} \rightarrow A + BC_{(g)}$	Jetkanje
$AB_{(g)} + C_{(s)} \rightarrow A_{(g)} + BC_{(s)}$	Depozicija
$e^- + A^+ \rightarrow A$	Rekombinacija
$A^* \rightarrow A$	Deekscitacija
$A^* \rightarrow A + e^-$ (s površine)	Sekundarna emisija

Tablica 3. Energija veza organskih spojeva (prilagođeno iz 18)

Vrsta veze	**Energija veze (kJ/mol)**	**Energija veze (eV)**
C-H	411	4,25
C-C	346	3,56
C-N	276	2,86
C-O	358	3,70
C-S	272	2,80
C=C	602	6,23
C=O	724	7,50
C≡C	835	8,65
N-H	385	3,99
O-H	456	4,73

Legenda: H – vodik, C – ugljik, N – dušik, O – kisik, S – sumpor

Ionske reakcije prisutne u plazmi su mnogobrojne te mogu inducirati stvaranje oscilirajućih veza koje imaju ulogu kemisorpcijskih mjesta za alkilne i druge slobodne radikale (14).

Reaktivne čestice su, zbog nesparene valentne elektronske ljuske, kemijski vrlo aktivne vrste. Većina reakcija slobodnih radikala uključuje nestabilne međuspojeve koji imaju kratki životni vijek. Oni sudjeluju u brojnim reakcijama adicije i supstitucije. Jedna od primarnih reaktivnih čestica u kemijskim reakcijama plazme je atomarni kisik koji u daljnjim reakcijama sudjeluje u stvaranju raznovrsnih reaktivnih vrsta (17).

Kemijska kinetika plazme pri dielektričnom barijernom izboju u atmosferskom plinu može uključivati 576 različitih vrsta reakcija u sebi, koje uključuju vibracijski pobuđena stanja kisika i dušika, ozona, pozitivnih i negativnih iona te dušikovih oksida (17). Sažeti pregled

prema vrsti mogućih reakcija koje se odvijaju pri dielektričnom barijernom izboju u zraku prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz dijela mogućih reakcija koje se odvijaju u dielektričnom barijernom izboju pri atmosferskim uvjetima (prilagođeno iz 17)

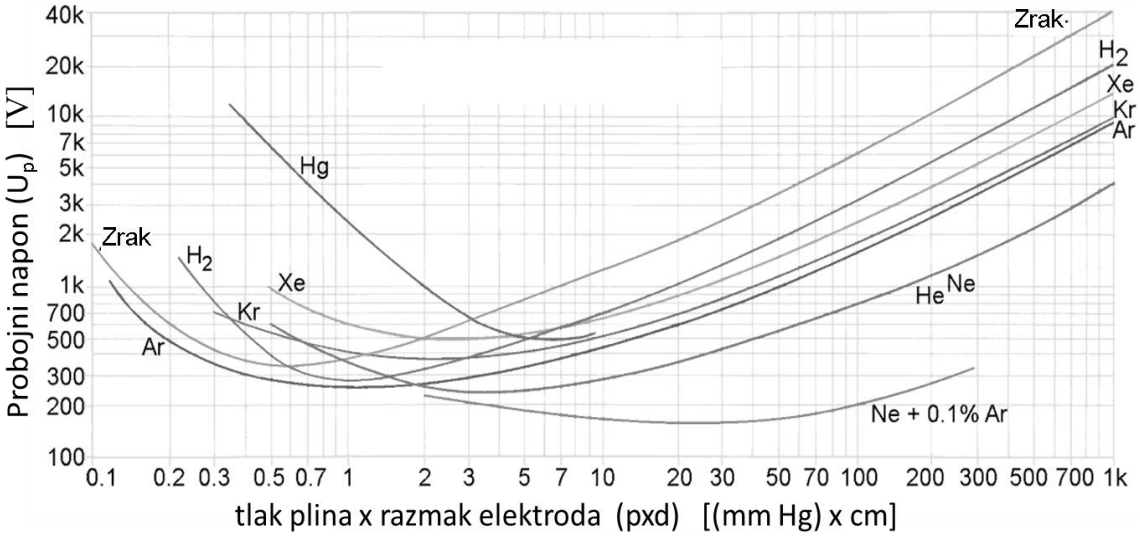
Reakcija	**Formula**
Ionizacija uslijed udara elektrona	$e + NO \rightarrow e + e + NO^+$ $e + N_2 \rightarrow e + e + N_2+$
Disocijativna ionizacija	$N + O \rightarrow e + NO^+$
Rekombinacija elektron – ion	$e + NO^+ \rightarrow N + O$
Vezanje elektrona	$e + O_2 + O_2 \rightarrow O_2^- + O_2$ $e + O_2 \rightarrow O^- + O$
Odvajanje elektrona	$O_2 + O_2 \rightarrow e + O_2- + O_2$ $O^- + O \rightarrow e + O_2$ $O_2^- + O \rightarrow e + O_2 + O_2$
Rekombinacija ion – ion	$X^- + Y^+ \rightarrow X + Y$
Disocijacija uslijed udara elektrona	$e + N_2 \rightarrow N + N$ $e + O_2 \rightarrow O + O$
Konverzija iona	$O^- + O_2 + M \rightarrow O3- + M$
Kemijske reakcije ROS-a i RNS-a	$N_2 + M \rightarrow N + N + M$ $N + N + M \rightarrow N_2 + M$ $O_2 + M \rightarrow O + O + M$ $O + O + M \rightarrow O_2 + M$ $NO + M \rightarrow N + O + M$ $N + O + M \rightarrow NO + M$ $N + NO \rightarrow O + N_2$ $O + N_2 \rightarrow N + NO$ $N + O_2 \rightarrow NO + O$ $O + NO \rightarrow N + O_2$

Zbog navedenih svojstava, hladne plazme su pronašle široku primjenu u plazma-biologiji i medicini. Većina njihovih učinaka se, uz one elektrona, drugih nabijenih čestica, fotona i UV zračenja, aktivaciju tkivnih tekućina, stvaranje površinskih i unutarstaničnih električnih polja te topline, pripisuje upravo djelovanju reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih (RNS) vrsta (13, 18).

1.2.3 Dielektrični barijerni izboj

Dielektrični barijerni izboj (DBI) prvi put je opisao Werner von Siemens 1857. godine (19). DBI je električni izboj između dviju ili više elektroda različitih potencijala koje su međusobno razdvojene dielektričnom barijerom. Dielektrični materijal ili dielektrik je izolator koji se pod utjecajem električnog polja može polarizirati. Najčešći materijali koji se rabe kao dielektrične barijere su staklo, kvarc, keramika i polimeri. Zrak također ima dielektrična svojstva, no njegova sposobnost da se odupre električnom proboju (3 MV/m) je puno slabija u usporedbi s uobičajenim dielektrikom poput stakla (10 – 13 MV/m) (20).

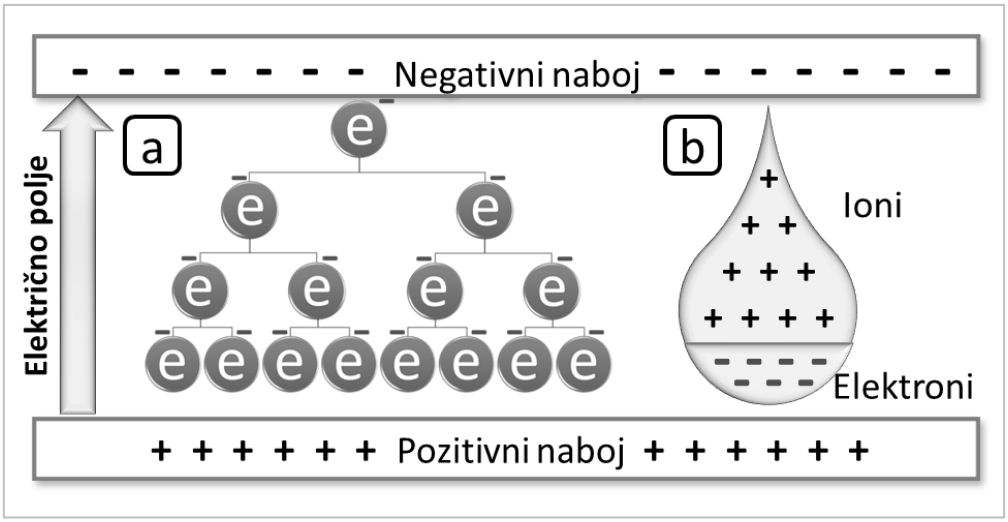
Dielektrični izboj u atmosferskom zraku nastaje uslijed naglog smanjenja otpora zraka, zbog čega on postaje električno provodljiv. To se događa u slučaju kada je napon nametnutog električnog polja veći od probojnog napona dielektrika. Probojni napon u plinovima uvelike ovisi o tlaku plina te razmaku između elektroda (2). Ovisnost probojnog napona (U_p) i umnoška tlaka plina i razmaka elektroda ($p \times d$) opisan je *Paschenovom krivuljom* (2). Njezina specifičnost je postojanje lokalnog minimuma koji definira najmanji napon neophodan za postizanje izboja pri određenom tlaku i razmaku elektroda (slika 4). Za postizanje izboja nastoji se osigurati da razmak elektroda pri stalnom tlaku, odnosno gustoći plina, bude takav da probojni napon bude jednak ili veći od navedenog minimuma (2).



Slika 4. *Paschenova krivulja* za različite plemenite plinove uključujući zrak i vodik (prilagođeno iz 21)

Pri atmosferskom tlaku dielektrični barijerni izboj sastoji se od brojnih mikroizboja koji su raspoređeni u zračnom međuprostoru (eng. *air gap*) između elektroda. U tom procesu nastaju složeni fizički fenomeni pri kojima se opaža široki spektar izbojnih uzoraka koji ovise o tlaku i sastavu plina, rasporedu elektroda kao i drugim parametrima. Uzorak izboja preko dielektrične površine ovisi o polaritetu i amplitudi primijenjenog električnog polja kao i dielektričnoj konstanti elektrode te može varirati od filamentarne do potpuno difuzne forme (22). Faze izboja mogu se podijeliti u lavinsku fazu (eng. *avalanche*), formiranje filamentarnog izboja (eng. *streamer*), tinjavi izboj (eng. *glow discharge*) i, konačno, gašenje mikroizboja na elektrodi (23).

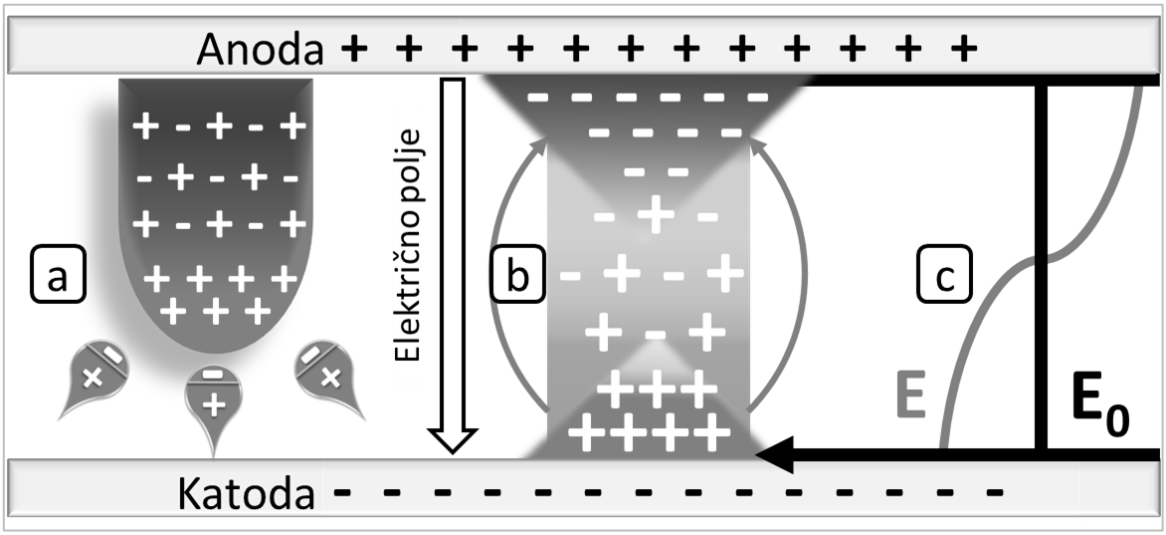
Izboj se u plinu javlja zbog kaskadnog procesa, odnosno lavine elektrona (slika 5), poznatijeg i kao *Townsendov efekt* (2)**.** Ionizacija plina događa se kada je potencijal nametnutog električnog polja veći od ionizacijskog potencijala plina. Slobodni nositelji naboja, koji su uvijek u malim količinama prisutni u neutralnom plinu, ubrzavaju se u električnom ili elektromagnetskom polju te uzrokuju sudare s česticama plina. Čestice plina također mogu, zbog međusobnih sudara, stvoriti dodatnu količinu elektrona. Novooslobođeni elektroni imaju dovoljno energije koja u neelastičnim sudarima s česticama plina stvara dodatne elektrone uzrokujući tako lavinu elektrona (23).



Slika 5. Prikaz *Townsendovog efekta*: a) stvaranje lavine u sudarima elektrona s neutralnim česticama u prisutnosti dovoljno jakog električnog polja i b) posljedična distribucija naboja u lavini u kojoj se glava lavine sastoji od brzih i zgusnutih elektrona za kojima zaostaje produženi rep sporih pozitivnih iona koji pokušavaju pratiti elektrone, no električno polje ih privlači u suprotnom smjeru (prilagođeno iz 2)

Kada dođe do izboja, elektroni se u električnom polju gibaju brže od težih pozitivno nabijenih iona te u plinu dolazi do razdvajanja naboja. Lavine imaju karakterističnu strukturu s negativnom glavom u kojoj se nalaze brzi elektroni te izduženim pozitivnim repom u kojem se nalaze spori pozitivno nabijeni ioni koji pokušavaju usporiti napredovanje elektrona, no zaostaju zbog djelovanja električnog polja koje ih ubrzava u suprotnom smjeru (slika 5b).

Kada jakost električnog polja razdvojenih naboja poprimi veličinu vrijednosti nametnutog električnog polja, dolazi do formiranja plazma-filamenata, odnosno sekundarnog izboja (23). Plazma-filamenti su vrlo brzi (10^8 cm/s) lokalni ionizacijski valovi, koji se najčešće kreću od anode prema katodi kako bi se susreli s lavinama koje se kreću u suprotnom smjeru te prolaze put između elektroda u nekoliko nanosekundi tvoreći na taj način vodljivi kanal slabo ionizirane plazme (24). Elektroni u vodljivom kanalu, koji nastaju u filamentu, raspršuju se iz procijepa unutar 40 ns, dok se teži i spori ioni zadržavaju u izbojnoj pukotini i do nekoliko mikrosekundi (24). Intenzivna struja elektrona teče kroz vodljivi kanal prema anodi sve dok ne dođe do kolapsa lokalnog električnog polja koje nastaje zbog nakupljanja naboja na površini anode te ionskog naboja u prostoru između elektroda, zbog sporog kretanja iona. Opisani procesi se nazivaju i mikroizbojem (eng. *micro-discharge*) (slika 6).



Slika 6. Stvaranje mikroizboja (a), plazma-kanala i mikroizbojnog ostatka (b) te poremećaj električnog polja (c) zbog prostornih naboja. Crna linija (E_0) prikazuje superponiranje električnih polja mikroizboja i primijenjenog električnog polja. Crvena linija (E) prikazuje električno polje. U prisutnosti pozitivnog prostornog naboja električno polje se pojačava na katodi, a smanjuje na anodi
(prilagođeno iz 24)

Nakon što struja elektrona prestane teći, u velikom dijelu mikroizbojnog kanala više nije prisutna prvotno stvorena plazma, no visoka razina vibracijske i elektronske ekscitacije te ionskih naboja u volumenu kanala, kao i nakupljanje naboja na površini elektroda, dopušta da se ovo područje odvoji od ostatka regije te se ono naziva mikroizbojnim ostatkom (eng. *remnant*) (24). Nakupljanje naboja na površini anode onemogućava nove lavine u blizini sve do trenutka promjene polariteta anode i katode (24). Nakon promjene polariteta napona nakupljeni negativni naboj uzrokuje nove mikroizboje na istome mjestu te se ovaj proces ponavlja mnogo puta tvoreći makroskopsku sliku prostorno lokaliziranog blještavog filamenta (24).

DBI proizvodi neekvilibrijsku hladnu atmosfersku plazmu u kojoj se većina spregnute električne energije prenosi na elektronsku komponentu plazme zbog čega se stvaraju energetski elektroni, dok temperatura iona i neutralnih čestica ostaje pri sobnoj temperaturi (12). Za neekvilibrijsko stanje plazme karakteristična je prisutnost elektrona, koji stvaraju vrlo reaktivne kemijske vrste, ali se pritom ne stvara prekomjerna toplina koja bi mogla oštetiti supstrat na koji djeluje (25). Temeljem navedenog terapijski i antimikrobni učinci hladne atmosferske plazme, a posebice plazmi koje se stvaraju putem dielektričnih barijernih izboja, mogu se pripisati procesima koji uključuju djelovanje reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, radikala, iona i nabijenih čestica, proizvodnju energetskih fotona, aktivaciju tkivnih tekućina te stvaranje površinskih i unutarstaničnih električnih polja (18).

1.3 Sustavi za proizvodnju ozona i hladne plazme

Otkriće ozona te njegovo stvaranje usko je povezano interakcijom elektromagnetske energije sa zrakom odnosno kisikom kao njegovom sastavnicom. Temeljem navedenog, u kontekstu starije literature, ozon se osim u zasebnim radovima vrlo često spominje i u brojnim zapisima vezanim uz terapijsku primjenu struja visokih frekvencija (8,9). Dielektrični barijerni izboj (DBI) se, zbog pojave karakterističnog mirisa i relativno jednostavnog načina dokazivanja ozona što u njemu nastaje, u prošlosti povezivao isključivo s proizvodnjom ozona. Zahvaljujući najnovijim znanstvenim spoznajama o mehanizmima nastanka, kao i fizikalnim i kemijskim procesima koji se u njemu odvijaju, DBI je prepoznat kao proces koji uključuje stvaranje niza reaktivnih spojeva (11). Stoga se u kontekstu starijih zapisa vezanih uz terapijsku primjenu ozona stvorenog pomoću DBI-ja mora na njega gledati kao na proces koji sadrži složene mehanizme stvaranja hlade atmosferske plazme.

1.3.1 Generatori ozona

Veliki potencijal u medicinskoj primjeni ozona, kao jakog dezinficijensa i vrlo potentnog bioaktivatora (prekursora reaktivnih kisikovih spojeva), iznjedrio je brojna tehnološka rješenja za njegovu proizvodnju koja se međusobno razlikuju po načinu stvaranja i otpuštanja, koncentracijama kao i načinu primjene. Generatori ozona proizvode ozon putem UV svjetlosti ili češće putem električnih izbijanja. Postoji široki spektar generatora za proizvodnju ozona koji koriste električne izboje putem istosmjerne ili izmjenične struje.

Terapijska primjena ozona može se postići na dva načina: prvim, gdje se ozon stvara unutar generatora te se sustavom cijevi dovodi do mjesta primjene, i drugim gdje se ozon stvara na samom mjestu primjene. Temeljem navedenog razvile su se tri vrste generatora ozona koji se mogu naći na tržištu medicinskih uređaja za primjenu u dentalnoj medicini:

– *zatvoreni dovodni sustav* za primjenu ozona, koji ozon putem cijevi dovodi u izolirano terapijsko polje. Izolacija se, u slučaju manjih površina, postiže putem brtvljenja posebnim nastavcima dok se u većih površina područje izolira nepropusnim barijerama (poput vreća ili šatora);

– *otvoreni dovodni sustav* za proizvodnju ozona, gdje se ozon putem cijevi, pod određenim tlakom, slobodno ispušta unutar terapijskog polja, kao što je to slučaj u nekih uređaja koji

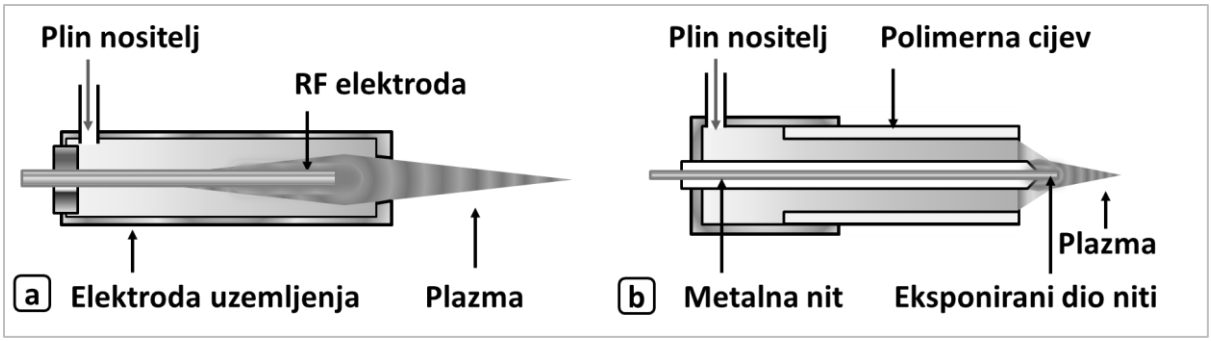
se koriste u dentalnoj medicini ili pak uređaja za rektalnu insuflaciju ozona (26). Spomenimo i specijalizirane generatore za parenteralnu primjenu koji za proizvodnju ozona koriste posebne izvore kisika, a ozonom se zatim dovodi u izravan kontakt s pacijentovom krvlju ili tkivom. Na ovaj se način provode sistemske terapije ozonom u sklopu male i velike autohemoterapije (27);

– *otvoreni sustav sa stvaranjem ozona na mjestu primjene* putem dielektričnog barijernog izboja.

1.3.2 Generatori hladne plazme

Laboratorijske plazme proizvode se djelovanjem energije na neutralne plinove, poput zraka, plemenitih plinova ili mješavinom različitih vrsta plinova. Izvor energije u tom slučaju može biti mehanički, toplinski, kemijski, električni ili elektromagnetski. U slučaju upotrebe električnih izvora električno polje mora biti dovoljno jako i kontinuirano kako bi se stalno nadoknađivali energetski gubici koji nastaju u interakciji plazme i okoline (14). Električna energija pokazala se najučinkovitijom u nadoknadi tih gubitaka stoga su električni izboji najčešće korišteni izvor energije za proizvodnju plazme. Različiti oblici plazme se mogu proizvoditi impulsno ili kontinuirano u zatvorenim ili otvorenim sustavima. S obzirom na način stvaranja i održavanja električnog ili elektromagnetskog polja, postoje brojni izvori plazme. Oni uključuju induktivno i kapacitivno spregnute sustave, sustave koji koriste istosmjernu ili izmjeničnu struju te niske, visoke, radio ili mikrovalne frekvencije (14).

Sustavi za proizvodnju hladne atmosferske plazme načelno se mogu podijeliti na indirektne i direktne. U indirektnih sustava plazma se stvara u protočnoj mješavini plinova (slika 7). Mješavine plinova najčešće sadrže plemenite plinove poput argona i helija, ali i dodatne plinove poput dušika i kisika (13). Plinovi koji se pod pritiskom ispuštaju preko elektroda pobuđuju se načelom dielektričnog barijernog izboja, putem visokih, radio ili mikrovalnih frekvencija te se u obliku mlaza prenose na ciljnu površinu. Zbog navedenog načela stvaranja plazme ovakvi se sustavi često nazivaju i mlaznim (eng. *jet*) plazmama. U literaturi se mogu pronaći brojni modaliteti u konstrukciji i nazivlju, no načelo indirektne proizvodnje hladne atmosferske plazme uvijek je očuvano (13). U ovakvim sustavima za postizanje dielektričnog barijernog izboja neophodne su najmanje dvije međusobno spregnute elektrode koje uvijek čine sastavni dio uređaja.

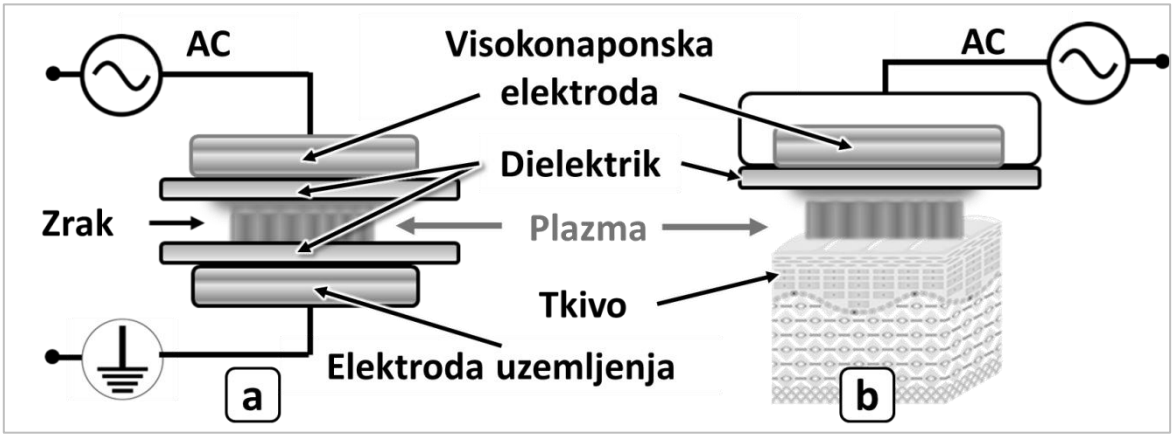


Slika 7. Primjer indirektnih sustava za proizvodnju hladne atmosferske plazme:
a) mlazna plazma (eng. *jet-plasma*) i b) plazma-igla (eng. *plasma needle*)
(prilagođeno iz 28)

U sustavu za direktnu (izravnu) proizvodnju hladne plazme dielektrični barijerni izboj se odvija u ambijentalnom zraku. DBI se stvara uz pomoć visokofrekvencijskih i visokonaponskih izmjeničnih struja koje se mogu primijeniti na dva načina (slika 8) (28):

– sustavom koji sadrži dvije međusobno spregnute elektrode prekrivene dielektrikom, gdje je jedna elektroda visokonaponska dok druga ima ulogu uzemljenja,

– sustavom koji sadrži jednu elektrodu (visokonaponsku) dok ulogu druge elektrode ima sama ciljna tj. terapijska površina. Na ovaj se način hladna atmosferska plazma stvara izravno na mjestu primjene interakcijom električne ili elektromagnetske energije i molekula zraka koji se nalazi između elektrode i ciljne površine.

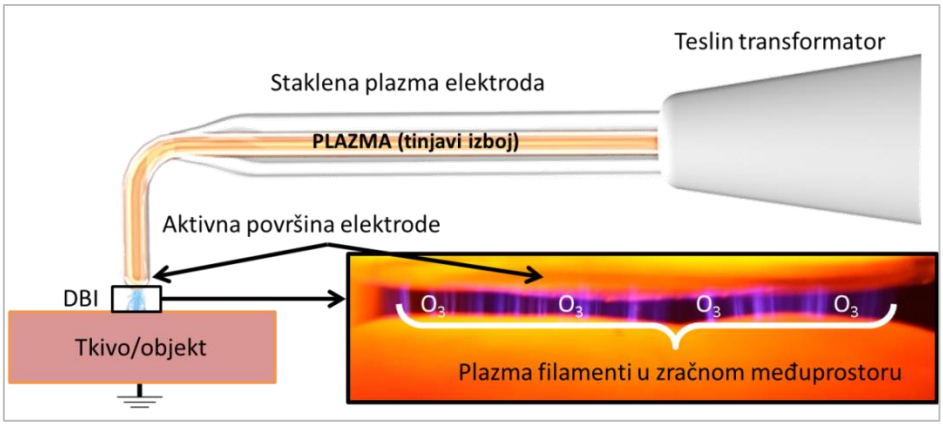


Slika 8. Primjeri izravne proizvodnje plazme:
a) dielektrični barijerni izboj (DBI) s dvije elektrode
b) lebdeći dielektrični barijerni izboj (eng. *floating dielectric barrier discharge*) u kojem ulogu druge elektrode ima ciljna površina
(prilagođeno iz 28)

1.3.3 Visokofrekvencijski generator ozona

Visokofrekvencijski generator ozona počinje se primjenjivati u dentalnoj medicini početkom 21. stoljeća, a svoje korijene nalazi u tehnološkoj platformi s kraja 19. i početka 20. stoljeća, koja se načelno sastojala od *Tesline zavojnice* (visokonaponskog transformatora) spregnute s *Geißlerovom cijevi.* Nazivlje ove vrste uređaja tijekom više od jednog stoljeća postojanja neprestano se mijenjalo s obzirom na vrstu primjene, karakteristike ili pak autore uređaja. Jedan od razloga zbog kojih ova vrsta terapije nije definirana cjelovitim i "službenim" imenom zasigurno leži i u činjenici da nikada do sada nisu definirani svi čimbenici koji su tijekom zahvata prisutni u terapijskom polju, a samim tim ni mehanizmi kojima bi se objasnili dosad postignuti pozitivni učinci na ishod terapije. Zbog toga se često u imenima i opisu uređaja rabi ili jedan od čimbenika ili pak autora zaslužnih za njihov razvoj. Tako se u literaturi za istu tehnologiju mogu pratiti brojni nazivi poput: Teslinih ili Oudinovih struja, *violet ray* uređaja (u prijevodu: ljubičastih zraka), visokih frekvencija, generatora ozona te u novije vrijeme generatora hladne atmosferske plazme. Tako i uređaj koji je korišten u ispitivanjima u sklopu ovog rada nosi ime visokofrekvencijski generator ozona te je klasificiran kao uređaj za proizvodnju ozona, no, s obzirom na načelo rada, ova se vrsta sustava može svrstati i u otvorene sustave za proizvodnju ozona kao i one za direktnu proizvodnju hladne atmosferske plazme.

Navedeni sustavi proizvode visokonaponske i visokofrekvencijske impulse koji se putem pobuđenog plemenitog plina kojim su ispunjene staklene elektrode prenose na ciljnu površinu. Staklene elektrode (zatvorene plinske cijevi) ispunjene su jednim ili mješavinom više vrsta plamenih plinova. Prilikom pobude plinova, putem elektromagnetskih impulsa, unutar elektrode dolazi do generiranja hladne atmosferske plazme i tzv. tinjavog izboja (eng. *glow discharge*), koja osim emisije svjetlosti, čije karakteristike ovise o sastavu plinova kojima je punjena staklena cijev, ima ulogu vodiča koji prenosi elektromagnetske impulse do aktivnog vrha elektrode a time i na ciljnu površinu. Zbog toga se ove vrste elektroda nazivaju i plazma-elektrodama. Kada se aktivna plazma-elektroda nalazi u neposrednoj blizini ciljne površine (1 – 3 milimetra udaljenosti) u zračnom međuprostoru između staklene stijenke elektrode i ciljne površine dolazi do pojave dielektričnog barijernog izboja. Pritom u zračnom međuprostoru nastaju mikroizboji, tj. hladna atmosferska plazma, a time i ozon (slika 9). Prilikom zahvata pacijent/objekt je uzemljen putem izravnog kontakta s referentnom elektrodom, koja čini sastavni dio uređaja.



Slika 9. Prikaz sustava u kojem se putem *Teslinog transformatora* i plazma-elektrode postiže dielektrični barijerni izboj u terapijskom polju pri čemu se generiraju mikroizboji (hladna atmosferska plazma), a time i ozon

Sve do nekoliko godina unazad, kada se u biomedicinska istraživanja uvodi pojam hladne atmosferske plazme te se pojavljuju prvi radovi o kumulativnim učincima njezinih konstituenata na biološke sustave, učinci ove vrste terapijskog zahvata objašnjavani su mehanizmima topikalnog djelovanja ozona koji se oslobađa u procesu dielektričnog barijernog izboja (noviji radovi (29–47)) ili pak mehanizmima djelovanja visokofrekvencijskih struja (stariji radovi (8,9)). Primjena opisane tehnologije u dentalnoj medicini je do sada pokazala pozitivne učinke primjenom u liječenju bolesti usne šupljine, obradi tvrdih zubnih tkiva, stimulaciji regenerativnih procesa parodonta i kosti te redukciji bolova i postoperativnih komplikacija (29 – 47).

Dugogodišnja klinička primjena ove vrste terapije na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu, kao i zapaženi terapijski učinci, posebice u području neuroloških bolnih sindroma i temporomandibularnih disfunkcija, ali i klinički slučajevi zabilježeni u drugim medicinskim područjima (poput liječenja kroničnih dijabetičkih rana, opeklina, artropatija, sportskih ozljeda i malignih oboljenja kože), otvorili su brojna pitanja o mehanizmu djelovanja ove vrste terapije. Određeni terapijski učinci, koji se ne mogu objasniti mehanizmom topikalnog djelovanja ozona, posebno su naglašeni u terapijskim zahvatima u kojima se elektroda nalazi u izravnom kontaktu s tkivom, a posebice tkivnim tekućinama, pri čemu ne dolazi do pojave mikroizboja ili su svedeni na minimum. Primjerice, pri primjeni elektrode u krvarećoj alveoli ili na način da elektroda prisno prilježe uz površinu tkiva te pri terapijskim zahvatima gdje se elektroda primjenjuje u izravnom kontaktu s kožom u projekciji određene ciljne strukture kao što je to temporomandibularni zglob ili pak trigeminalni živac. U ovakvom načinu primjene hladna atmosferska plazma i ozon se s jedne strane gotovo uopće ne proizvode ili se

proizvode u vrlo malim količinama, a s druge strane postoje brojne barijere (koža, vezivno i masno tkivo, tetive, mišići i/ili kost) koje priječe izravno djelovanje ozona na ciljno područje. Iz navedenih se razloga smatra da, u svrhu potpunijeg objašnjavanja mehanizma djelovanja ove vrste terapijskog zahvata, valja ispitati te u obzir uzeti sve čimbenike i njihove moguće učinke koji su, zbog samog načela rada uređaja, prisutni u terapijskom polju tijekom zahvata, a koji se načelno mogu svesti na učinke elektromagnetske energije (struje, elektromagnetskih polja i svjetlosti), kemijskih čimbenika, hladne atmosferske plazme te topline koja se oslobađa njihovim interakcijama s medijem na koji se primjenjuju.

1.4 Interakcije s biološkim sustavima

1.4.1 Ozon, reaktivne kisikove vrste i lipidni oksidacijski produkti

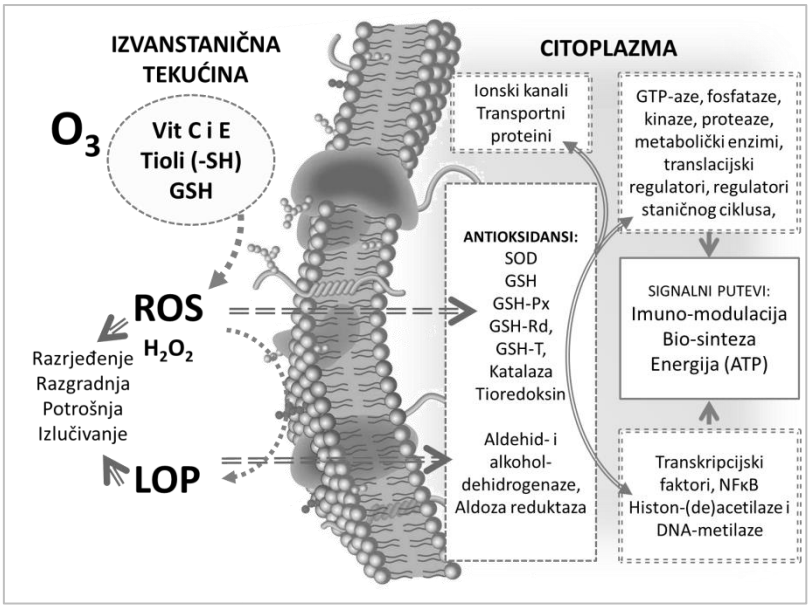
U kontaktu s tjelesnim tekućinama ozon se otapa u vodi koja je prisutna u njima te reagira unutar nekoliko sekundi (48). Hidrofilni i lipofilni antioksidansi koji su prisutni u tkivnim tekućinama reagiraju s većim dijelom prispjelog ozona, no ako su koncentracije primijenjenog ozona tijekom terapijskog postupka dovoljno visoke, moguće je stvaranje dostatnih količina reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i lipidnih oksidacijskih produkata (LOP) (49).

Inicijalna reakcija ozona i tkivnih tekućina se može podijeliti u dvije faze. Prva faza je oksidacija askorbinske kiseline, mokraćne kiseline, tiolnih skupina proteina (SH-), glikoproteina i drugih molekula koje imaju važnu ulogu u antioksidativnom odgovoru tijela (49). Iako sve te molekule sprječavaju jaku reaktivnost ozona, u ovoj fazi dolazi do stvaranja ROS-a, prvenstveno vodikovog peroksida (H_2O_2), te se pokreće nekoliko biokemijskih reakcija koje u vrlo kratkom vremenu neutralizira antioksidativni sustav. Druga faza inicijalne reakcije je peroksidacija lipida. U hidrofilnom okruženju, u reakciji između polinezasićenih masnih kiselina (eng. *PUFA – poly-unsaturated fatty acids*) i ROS-a, stvaraju se lipidni oksidacijski produkti.

Osnovna reakcija polinezasićenih masnih kiselina i ozona prikazana je formulom:

$$\boldsymbol{R-CH=CH-R' + O_3 + H_2O \rightarrow R-CH=O + R-CH=O + H_2O_2} \quad (49)$$

Ovakvim reakcijama veže se sav prispjeli ozon i od tog su trenutka isključivo reaktivne kisikove vrste (uglavnom H_2O_2) i lipidni oksidacijski produkti odgovorni za brojne biokemijske reakcije koje se odvijaju u stanicama (49). Ozon u interakciji s lipidima i fosfolipidima stvara četiri osnove vrste spojeva: ozonide, aldehide, perokside i vodikov peroksid (H_2O_2). Oni imaju ulogu sekundarnih glasnika koji mogu aktivirati brojne enzime poput kemijskih i imunomedijatora (50). Dio složenih metaboličkih puteva ozona, ROS-a i LOP-a prikazan je na slici 10. Oksidacija lipida i fosfolipida u staničnoj membrani uzrokuje promjene u njihovim kemijskim svojstvima, što posljedično ima učinak na njihovu biokemijsku funkciju (50). Brojni fosfolipidi, kao i kolesterol, čine osnovu staničnih membrana te su odgovorni za biofizička svojstva membrane uključujući njezinu barijernu funkciju. Oksidirani lanci masnih kiselina nisu termodinamički stabilni unutar fosfolipidnog dvosloja te dolazi do njihove protruzije koja može dovesti do promjena u staničnoj signalizaciji putem promjena u konformaciji i aktivnosti membranskih proteina (50).



Slika 10. Shematski prikaz složenih metaboličkih reakcija ozona, ROS-a i LOP-a u izvanstaničnoj tekućini i u stanici

Lipidni oksidacijski produkti pokazuju široki spektar bioloških učinaka na stanične procese koji uključuju modulaciju metabolizma, staničnu proliferaciju, migraciju i apoptozu te su povezani s brojnim fiziološkim procesima (tablica 5), a poremećaji u njihovom metabolizmu mogu se pratiti u patološkim upalnim procesima kao i drugim poremećajima (50).

Tablica 5. Fiziološki učinci LOP-a mogu varirati s obzirom na stanje u kojem se stanica nalazi (prilagođeno iz 50)

Proinflamatroni učinci	Antiinflamatorni učinci
Proizvodnja ROS-a	Zaštita pri sepsi ili akutnom oštećenju
Aktivacija NADPH oksidaze	Smirivanje upale
Aktivacija eritrocitne NO sintetaze (eNOS)	Pojačavanje antioksidativnog odgovora
Pojačana trombogeneza	Nakupljanje ili otpuštanje NO
Adhezija leukocit – enedotel	Zaštita endotelnih stanica pluća
Migracija, proliferacija i dediferencijacija stanica	
Povišene razine proinflamatornih citokina	
Pojačana ekspresija faktora rasta	

LOP mogu aktivirati specifične lipaze kao što su fosfolipaze A2 i C koje oslobađaju arahidonsku kiselinu koja se putem ciklooksigenaza i lipoksigenaza pretvara u druge kemijske medijatore, poput raznih podvrsta prostaglandina i trombocitnih aktivacijskih faktora, koji mogu inducirati upalne procese (51). Time mogu potaknuti migraciju i proliferaciju glatkih

mišićnih stanica, adheziju i ekstravazaciju monocita te trombogenezu (50). Pri patofiziološkim poremećajima u metabolizmu veća količina endogenog LOP-a se stvara zbog prekomjerne proizvodnje ROS-a u stanici što može dovesti do apoptoze i nekroze stanice. Nasuprot navedenim proinflamatornim učincima nalazi se i niz onih u kojima LOP pokazuje antiinflamatorni učinak (50). Ovi su učinci objašnjeni njihovom sposobnošću da se vežu i djeluju na bakterijske lipopolisaharide, lipopeptide, aktiviraju antioksidativni sustav, oslobađaju NO (koji ima protuupalni i vazorelaksacijski učinak) te da djeluju na stanične receptore (50). U *in vitro* uvjetima LOP se eliminira putem glutation (GSH) transferaze i aldehid dehidrogenaze te može izazvati pojačanu regulaciju antioksidansa, povećati količinu GSH-a u stanici te inducirati proteine oksidativnog stresa poput hem-oksigenaze I i proteina toplinskog stresa (eng. *heat shoch proteins*) koji imaju važnu ulogu u reparaciji stanice nakon stresa (52). Bocci i suradnici (49) također navode kako bi ozon zbog svojih oksidativnih svojstava mogao pojačati antioksidativni odgovor organizma i putem LOP-a pokrenuti adaptaciju na oksidativni stres te nazivaju ovaj proces ozonom potaknuto oksidativno prekondicioniranje.

Otapanje ozona u vodnim otopinama u okolini bakterija može uzrokovati izmjene naboja s organskim anionima na površini mikroorganizama i dovesti do neutralizacije naboja staničnog zida (53). Brojne bakterije, posebice anaerobi, pokazuju osjetljivost na reaktivne kisikove vrste koje na njih mogu imati toksične učinke. Antimikrobni učinci pripisuju se kemijskoj eroziji staničnog zida ili ovojnica spora mikroorganizama pri čemu dolazi do karakterističnih promjena na staničnom zidu, u vidu njegovog „nagrizanja“ koje je nešto jače izraženo u gram-negativnih bakterija (54). Visoki oksidacijski potencijal ozona potiče uništavanje staničnog zida citoplazmatskih membrana bakterija (55,56). On djeluje na bakterijske stanice putem oksidacije njihovih lipoproteinskih komponenti. Također, postoje dokazi interakcije ozona s proteinima (57,58). Ozon vjerojatno uzrokuje promjene na sporama uzrokujući oštećenja njihove unutarnje membrane (59). Svi virusi, naročito oni s lipidnom ovojnicom, pokazuju osjetljivost na ozon. Analiza virusnih komponenti dokazala je i oštećenja na virusnom RNK-u, polipeptidnim lancima i proteinima ovojnice, čime se onemogućava njihova sposobnost adherencije (60). Ozon također inhibira određene stadije staničnog rasta gljivica i protozoa (61). Uspješno se koristi kao antibaktericidno sredstvo u liječenju oralnih infekcija uzrokovanih *Actinomyces naeslundii, Lactobacilli casei* i *Streptococcus mutans* (62).

Ozon utječe na metabolizam kisika djelovanjem na reološka svojstva krvi putem povećanja transmembranskog potencijala i povećanjem proizvodnje ATP-a, povećanjem fleksibilnosti i

plastičnosti eritrocita te njihovim pojačanim otpuštanjem kisika (48). Pretpostavlja se da su za to odgovorni pojačana glikoliza u eritrocitima te blago sniženje pH i povećano stvaranje 2,3-difosfoglicerata (2,3 DPG) (HbO_2 + 2,3 DPG → Hb + O_2) čime se objašnjava povišeni parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi i smanjeni parcijalni tlak kisika u venskoj krvi. Također je dokazano da ozon može potaknuti obnovu unutarnjeg zida malih krvnih žila kao i djelovati na koncentracije dušikovog oksida koji je važan regulator vazodilatacije (48).

Rezultati studija ukazuju na to da ozon putem stimulacije ili supresije citokina ima imuno-modulirajući učinak. Imunološki učinak pripisuje se aktivaciji monocita, neutrofila i T limfocita. On potiče oslobađanje male samoregulirajuće količine citokina putem aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NF-κ B) koji potiču transkripciju i transdukciju DNK-a koji, ovisno o stanju u kojem se stanica nalazi, može dovesti do povećane ili smanjene sinteze specifičnih citokina koji djeluju upalno ili protuupalno (48). Ozon može inhibirati oslobađanje neuroloških medijatora, a taj je učinak najvjerojatnije povezan s modulacijom unutrastanične koncentracije kalcija na presinaptičkoj razini. Zbog sposobnosti aktivacije endogenih antioksidativnih obrambenih mehanizama ozon se koristi u brojnim patološkim stanjima povezanim s oksidativnim stresom upalnog ili degenerativnog podrijetla poput autoimunih bolesti, reumatoidnog artritisa, trauma i apoptoze neurona (48). Činjenica da ozon u kontroliranim dozama ima sposobnost inducirati kompenzatorni antioksidativni odgovor putem superksid dismutaze, tkivne katalaze i glutation peroksidaze objašnjava terapijske učinke u bolesti koje se dovode u vezu s oslabljenim antioksidativnim odgovorom.

Costanzo i suradnici (63) dokazali su da niske koncentracije ozona od (10 μg/ml) povećavaju adherenciju stanica što se može povezati s poticanjem polimerizacije i remodeliranja citoskeletnih proteina. Male koncentracije ROS-a aktiviraju ekspresiju intra- i ekstramitohondrijskih proteina koji mogu potaknuti transkripciju DNK-a. Također bilježe da su pri primjeni ozona od 1 do 20 μg/ml morfološke promjene na mitohondrijima povezane s normalnim funkcionalnim promjenama, dok u svih ostalih ultrastrukturnih formi staničnih organela nisu primijećene nikakve degenerativne promjene. Stoga zaključuju da je primjena koncentracija ozona od 10 μg/ml na kulturama stanica uzrokovala pozitivne dugotrajne stanične odgovore u pogledu organizacije citoskeleta i aktivacije mitohondrija.

Ozonizacija krvi *ex vivo* može značajno povećati oslobađanje trombocitnog faktora rasta (PDGF *platelet-derived growth factor*), transformirajućeg faktora rasta beta 1 (TGF-β1) i inerleukina (IL-8) (64). Oni se oslobađaju u ovisnosti o dozi primijenjenog ozona nakon ozonizacije uzoraka heparinizirane krvne plazme bogate trombocitima. Ove spoznaje mogu

objasniti poboljšano cijeljenje ulkusa u pacijenata s kroničnom ishemijom udova gdje je provedena autohemoterapija primjenom ozona (65).

Ozon inhibira infekciju i promovira drugu fazu cijeljenja rana, koja uključuje sintezu ekstracelularnog matriksa (fibronektin, kolagen III i dr.), te treću fazu u kojoj dolazi do proliferacije fibroblasta i keratinocita, što također može biti potpomognuto ozonom (66).

Osnovni metabolički učinci ozona su povećana potrošnja glukoze i posljedično stvaranje ATP-a, pojačani metabolizam proteina i izravno djelovanje na nezasićene lipide što potiče regenerativne mehanizme (48). Analgetički učinci ozona pripisuju se smanjenju proizvodnje medijatora upale, oksidacijskoj inaktivaciji metaboličkih medijatora za bol, poboljšanju lokalne cirkulacije i oksigenacije tkiva i eliminacijom toksina i općenitim rješavanjem fizioloških smetnji koje uzrokuju bol (48). Protuupalni se učinak pripisuje oksidaciji arahidonske kiseline i prostaglandina koji u velikim koncentracijama sudjeluju u razvoju i održavanju upalnih procesa (67).

Dosad se u stomatologiji primjena ozona uglavnom svodila na dezinfekciju kaviteta i korijenskih kanala, no novije znanstvene spoznaje ukazuju na mogućnost njegove primjene u liječenju alveolitisa, avaskularne nekroze čeljusti kao i herpesa (68). Ozon smanjuje stvaranje plaka te se može koristiti kao dodatna terapija nakon parodontoloških i kirurških zahvata (69). Novija *in vitro* i *in vivo* istraživanja dokazuju učinke ozona na eritrocite i cirkulaciju, trombocite, imuni odgovor kao i njegovu potencijalnu primjenu u liječenju kroničnih rana, teških virusnih oboljenja kao i malignih i benignih tumorskih bolesti (49). S obzirom na vrlo široki spektar biomodulacijskih i biostimulacijskih svojstava ozon je dosad indiciran u liječenju 260 različitih patoloških stanja (70).

Glavnina citotoksičnih učinaka ozona pripisuje se inhalaciji njegovih visokih koncentracija u duljem razdoblju prilikom čega dolazi do hiperaktivacije i indukcije upalnih procesa u plućnom tkivu te oštećenja respiratorne sluznice (71). Ove su reakcije po svojoj prirodi vrlo slične onima na dim cigarete te se u najvećoj mjeri pripisuju djelovanju ROS-a i LOP-a koji nastaju u vrlo tankom sloju (2 μm) surfaktanta te putem aktivacije nuklearnog faktora kapa B (NFκB) i pojačane proizvodnje citokina uzrokuju upalne reakcije epitelnih i endotelnih stanica i makrofaga (71).

Svjetska zdravstvena organizacija smatra fiziološki tolerantnim boravak na radnome mjestu (8 sati dnevno) pri koncentracijama ozona koje nisu veće od 0,06 ppmv (120 $\mu g/m^3$) (72). Iako koncentracije ozona u gradovima u prosjeku iznose 0,1 ppm, prilikom većih zagađenja u

urbanim područjima mogu dosegnuti i do 0,8 ppm (71). S obzirom na ovaj podatak može se izračunati da u takvim uvjetima, pri minimalnoj ljudskoj aktivnosti, primljena doza ozona iznosi oko 0,7 mg u jednom danu, odnosno oko 21 mg u mjesecu (71). Također se procjenjuje da se u organizmu čovjeka, koji teži 70 kg, dnevno stvori najmanje 0,145 mola ili 5 g superoksida, dok se terapijske doze mjere do maksimalno 20 mg ozona (i to u sistemskoj terapiji), što je ekvivalent 0,4% maksimalne dnevne fiziološke proizvodnje superoksida (71).

Toksičnost lipidnih oksidacijskih proizvoda (LOP) ovisi o njihovoj konačnoj koncentraciji i lokalizaciji u tkivu, tako da mogu djelovati kao negativni ili pozitivni signali za određene procese (73). Postoji jasna naznaka da je toksičnost LOP-a u *in vivo* uvjetima, i to u sistemskoj primjeni ozona, najvjerojatnije zanemariva zbog velikog stupnja razrjeđenja u tkivima, procesa neutralizacije od detoksifikacijskih enzimskih sustava poput aldehid i alkohol dehidrogenaze, aldoza reduktaza i glutation transferaze (GSH-T), izlučivanja kao i biološke aktivnosti LOP-a koji mogu imati ulogu fizioloških glasnika (71).

Isključivo prekomjerno povećanje koncentracije endogenih ROS-a u mitohondrijima je povezano s oštećenjima mitohondrijskog DNK-a, koji je gotovo 10 puta jače izložen oksidaciji u usporedbi s nuklearnim DNK-om (74). Suprotno tome, u terapijskoj primjeni ozon djeluje izvana na izvanstaničnu tekućinu i membranu koje predstavljaju veliki spremnik antioksidansa (71). Često kontroverzni rezultati ispitivanja na kulturama stanica mogu se pripisati nedostatku prirodnih antioksidansa, što predstavlja kritičan faktor za nastanak citotoksičnih i mutagenih promjena u stanicama koje su u *in vitro* uvjetima određeno vrijeme izložene ozonu. Naime, eritrociti i druge stanice, nakon uklanjanja krvne plazme, ispiranja i resuspenzije otopinama koje ne sadrže ili pak sadrže vrlo malu količinu antioksidansa, postaju osjetljivi na vrlo niske koncentracije ozona, što se demonstrira kroz intenzivnu hemolizu i apoptozu (75). Novija istraživanja dokazuju da se oštećenja stanice ili genotoksičnost izazvana vodikovim peroksidom, suviškom željeza ili produženim skladištenjem mogu kontrolirati ako krvna plazma i kulture stanica sadrže adekvatne količine antioksidansa (75). Primjene terapijskih doza ozona nisu ukazale na postojanje negativnih popratnih pojava te je zabilježen mali broj kontraindikacija za njegovu primjenu (48). Toksičnost ozona mogla bi se u potpunosti izbjeći kontroliranim dozama koje samo djelomično i privremeno reduciraju raznoliki i potentni antioksidativni kapacitet (71).

1.4.2 Elektromagnetska polja i struje

Elektromagnetsko polje sastavljeno je od električnog i magnetskog polja koja su definirana kao sile, stoga su njihove osnovne interakcije s biološkim sustavima prouzročene djelovanjem sila na nabijene čestice što se u njima nalaze (76). Električno polje (*E*) je komponenta elektromagnetskog polja koje stvaraju električni naboji ili vremenski promjenjivo magnetsko polje te je definirano vektorom sile (*F*) po jedinici naboja (*q*) i izražava se jedinicom N/C ili V/m (76). Mjerna jedinica magnetskog polja je Tesla (T) i ono se označava s B, a u literaturi se naziva i gustoćom magnetskog toka. U starijim udžbenicima fizike magnetsko polje B se naziva magnetska indukcija ili gustoća magnetskog toka, a magnetskim poljem ili jakošću magnetskog polja se naziva polje H, koje se izražava jedinicom A/m. U novijim udžbenicima fizike polje H se naziva magnetizirajuće polje ili jednostavno H-polje dok se polje B naziva magnetskim poljem (76). Interakcija električnog i magnetskog polja je, zbog brojnih pojava i interakcija u samom mediju, vrlo složena te je gotovo nemoguće govoriti o izoliranoj pojavi električnog ili magnetskog polja, već su definirani kao jedinstveno elektromagnetsko polje (76).

Interakcije elektromagnetskih polja (EMP) s biološkim sustavima povezuju se s induciranim nabojima i polarizacijom dipola koji ovise o samom mediju na koji djeluju te ih makroskopski opisuju tri parametra nekog medija: dielektrična konstanta, električna vodljivost i magnetska propusnost (77). Dielektrična konstanta ili permitivnost (eng. *permittivity*, oznaka: ε – epsilon, jedinica: F/m) je veličina koja opisuje svojstvo dielektričnih tvari da se polariziraju u električnome polju. Električna vodljivost (eng. *conductivity*, oznaka: σ – sigma, jedinica S/m) je mjera koja definira sposobnost medija da provodi električnu struju pod utjecajem električnog polja. Magnetska propusnost ili permeabilnost (eng. *permeability,* oznaka: μ-mi, jedinica: H/m) je mjera koja definira intenzitet magnetizacije medija koji je izložen vanjskom magnetnom polju, tj. sposobnost medija da podrži stvaranje vlastitog magnetskog polja. (77). Dielektrična svojstva bioloških materijala ovisna su i o frekvenciji EMP-a te je njihov odnos izražen kompleksnom dielektričnom konstantom kao i brojnim dodatnim parametrima poput relaksacijskog vremena i disperzije (77). Specifična stopa apsorpcije (eng. *SAR – specific absorption rate*) je mjera za brzinu kojom ljudsko tijelo apsorbira energiju kada je izloženo radiofrekvencijskom EMP-u, a izražava se snagom po jedinici mase tkiva (jedinica: W/kg) (77).

Specifični učinci pri medicinskoj primjeni EMP-a ovise o primijenjenoj frekvenciji i valnoj duljini polja, no i o brojnim drugim parametrima koji mogu biti egzogeni (jačina polja,

energetska izloženost, način dostave) i endogeni, a koji su povezani s tkivom ili stanjem pacijenta (anatomske, fiziološke ili patološke varijable) (78). Djelovanje EMP-a na biološke sustave može se podijeliti na toplinske i netoplinske, tj. izravne učinke (77). Toplinski učinci su prouzročeni stvaranjem topline koja nastaje kao posljedica indukcijskog ili pak rezistivnog zagrijavanja, dok su netoplinski učinci posljedica izravne interakcije EMP-a i zračenja sa stanicama ili tkivima.

1.3.2.1 Toplinski učinci elektromagnetskih polja

Primjenom elektromagnetskih polja na tkiva dolazi do konverzije elektromagnetske u toplinsku energiju koja se oslobađa u procesima indukcijskog ili pak rezistivnog zagrijavanja. Indukcijsko zagrijavanje prouzročeno je vremenski promjenjivim magnetskim poljem koje uzrokuje orijentaciju postojećih električnih dipola u tkivu, polarizacijom atoma i molekula koji stvaraju električne dipole te pomakom (eng. *displacement*) ili zanošenjem (eng. *drift*) provodnih elektrona što uzrokuje stvaranje vrtložnih struja (eng. *eddy currents*). Kada struje teku kroz neko tkivo, zbog električnog otpora tkiva, tj. sudaranja elektrona s molekulama i atomima koji se u njemu nalaze, dolazi do zagrijavanja (rezistivno, omsko zagrijavanje ili *Jouleov učinak zagrijavanja*) (79). Stupanj zagrijavanja tkiva ovisit će o karakteristikama primijenjenog EMP-a te specifičnoj stopi apsorpcije tkiva u slučaju indukcijskog zagrijavanja te karakteristikama struja (posebice frekvenciji) i specifičnom otporu tkiva (eng. *resistivity*, oznaka ρ – ro, jedinica Ωm) u slučaju rezistivnog zagrijavanja (80,81). S*tratum corneum*, zbog svoje izolacijske uloge, ima daleko veći specifični električni otpor od dermisa i fizioloških tekućina u dubljim dijelovima kože:

$$(\rho_{\text{stratum}} \approx 0{,}23\text{-}1{,}15 \times 10^6\ \Omega\text{m} >> \rho_{\text{dermis}} \approx 150\ \Omega\text{m} > \rho_{\text{tekućine}} \approx 0{,}72\ \Omega\text{m}) \quad (82)$$

Većina topline koja se stvara protokom struje kroz kožu oslobađa se u njezinom površinskom sloju (*stratum corneum*) te se s tog mjesta u manjoj mjeri odvodi kondukcijom u okolno površinsko tkivo, a u većoj mjeri konvekcijom na krv putem kapilara gornjeg sloja dermisa te zračenjem topline u okolinu (83). Ovisno o svojim morfološkim i anatomskim karakteristikama, tkiva pokazuju različitosti u načinu rasapa topline (tablica 6).

Tablica 6. Značajnost modaliteta rasapa topline u biološkim sustavima (preuzeto iz 83)

	Kondukcija (na okolno tkivo)	**Konvekcija (putem krvi)**	**Radijacija (zračenje u okolinu)**
Tkiva	Značajno	Manje značajno	Neznačajno
Kosti	Značajno	Neznačajno	Neznačajno
Krvne žile	Manje značajno	Značajno	Neznačajno
Koža	Neznačajno	Značajno	Značajno

Krajnja temperatura tkiva u tom slučaju može varirati od svega nekoliko stupnjeva do iznad 100°C (tablica 7) (83). Ovisno o stupnju zagrijavanja tkiva, postupci u primjeni EMP-a mogu se podijeliti na termalnu ablaciju ($T > 46°C$), umjerenu hipertermiju ($41°C < T < 46°C$) i dijatermiju ($< 41°C$) (84). U slučaju termalne ablacije elektromagnetskim se poljima postižu visoke temperature te se koriste kao kirurški alat kojim se postiže djelomična ili potpuna koagulacijska nekroza u svrhu uklanjanja ili modeliranja određenog tkiva. Pri dijatermiji i hipertermiji blago ili umjereno povišenje temperature dovodi do pojačane metaboličke aktivnosti i širenja krvnih žila uz pojačanu perfuziju u ciljnom tkivu kojima se i pripisuju glavni terapeutski učinci ovakve vrste terapije (85). Primjena toplinskih učinaka elektromagnetskih polja koristi se u brojnim medicinskim postupcima u kirurgiji, fizioterapiji i liječenju karcinoma (78,84).

Tablica 7. Rasponi temperatura i njihove interakcije s biološkim procesima (prilagođeno iz 83 i 84)

Raspon temperature (°C)	**Interakcija i terminologija**
35 – 41	Normotermija/dijatermija
41 – 46	Hipertermija
46 – 48	Ireverzibilna oštećenja stanice nakon 45 min
50 – 52	Koagulacijska nekroza nakon 4 – 6 min
60 – 100	Gotovo momentalna koagulacijska nekroza
≥ 110	Vaporizacija tkiva

1.3.2.2 Izravni netoplinski učinci EM-polja

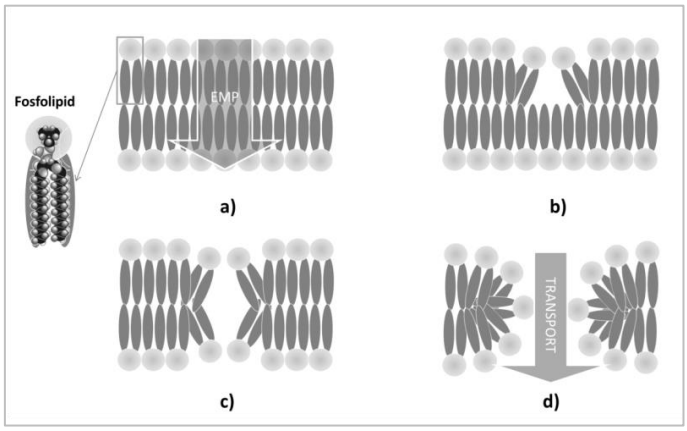
Postoje brojne znanstvene grupe koje istražuju biofizičke mehanizme izravne interakcije i transdukcije električnih i magnetskih polja u biološkim sustavima koji se ne mogu povezati s toplinskim djelovanjem te brojni eksperimentalni i teoretski modeli kojima se pokušava objasniti ove fenomene (86). Tako se danas, uz poznate fenomene poput pojačane ionske izmjene, dielektroforeze i elektroporacije, sve više istražuju i suptilni fenomeni interakcije EM-polja i bioloških sustava koji su zabilježeni u bojnim eksperimentima, a koji se teoretski objašnjavaju modelima kvantne elektrodinamike i koherentnih domena vode, ionske ciklotronske i parametrijske rezonancije, polarizacije elektronskog spina slobodnih radikala i biokemijske amplifikacije (80).

Jedan od najuočljivijih izravnih učinaka električnih i magnetskih polja je vezan uz strujanje iona i ionsku izmjenu (eng. *ion efflux*), prvenstveno kalcijevih, ali i drugih iona, putem naponskih ionskih kanala koji su osjetljivi na vanjska oscilirajuća električna polja (77).

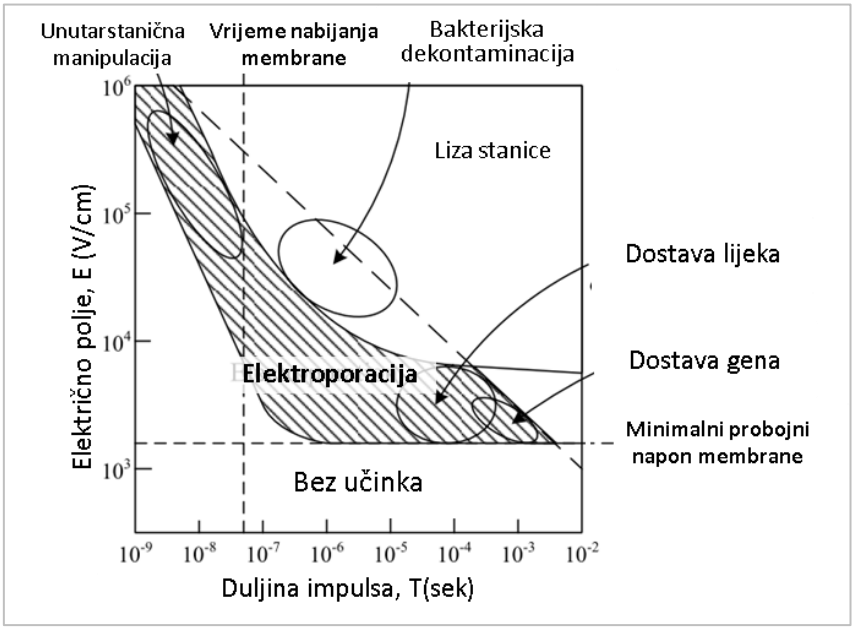
Drugi mehanizam uključuje polarizaciju stanice u prisutnosti električnog polja. Zbog induciranog naboja na samoj površini stanice, stanica može postati električni dipol i privući sličnu polariziranu stanicu ili se pak kretati unutar električnog polja ovisno o stupnju vlastite polarizacije (77). Translacijsko kretanje stanica u oscilirajućem električnom polju naziva se dielektroforeza, tj. elektroforeza u slučaju statičnog električnog polja, dok se rotacijsko kretanje naziva elektrorotacija, a kvantificirani su dielektroforetskom silom i električnim momentom stanice, tj. sposobnošću polarizacije (87). Ove se tehnike praktično, u najvećoj mjeri, koriste u svrhu manipulacije stanica i separacije čestica.

Elektroporacija je fenomen u kojem stanica izložena električnim impulsima može postati propusna, zbog induciranog transmembranskog potencijala i stvaranja pora na staničnoj membrani. Ovaj se proces odvija u nekoliko koraka koji su prikazani na slici 11. Električni impuls uzrokuje povećanje transmembranskog potencijala od 0,2 do 1 V zbog čega nastaje jako električno polje na membrani reda veličina 10^8 V/m, nakon čega dolazi do brze lokalizirane preraspodjele molekularne strukture membrane s posljedičnim formiranjem pora zbog čega se za nekoliko redova veličina povećava ionski i molekularni transport kroz membranu (77). Pri kratkoj izloženosti impulsnim EM-poljima, stanica ima mogućnost oporavka od ovog stanja, no dulja izloženost jakim impulsnim električnim poljima može dovesti do oštećenja stanične membrane zbog čega dolazi do lize stanice (88). Ultrakratki impulsi EM-polja mogu izazvati supraelektroporaciju, koja može inicirati proces apoptoze i

oslobađanje staničnog sadržaja (89). Raznolikost učinaka i primjene u ovisnosti o karakteristikama električnog polja i vremenu trajanja impulsa prikazana je na slici 12.



Slika 11. Hipotetska strukturna preraspodjela fosfolipidnog dvosloja membrane; a) u dvosloju, zbog pojave jakog električnog polja, dolazi do lokalizirane preraspodjele molekularne strukture dvosloja na (b) vanjskoj i (c) unutarnjoj strani membrane zbog čega dolazi do formiranja pora (d) kroz koje se nesmetano odvija transport iona i molekula (prilagođeno iz 77)



Slika 12. Raspon parametara za primjenu impulsnih struja (električno polje *E* i duljina impulsa *T*). Pri malim vrijednostima električnog polja i kratkom trajanju impulsa ne dolazi do elektroporacije dok pri njihovim višim vrijednostima učinci mogu varirati u širokom rasponu od elektroporacije i unutarstanične manipulacije preko dostave gena u stanicu i dekontaminacije bakterija sve do lize stanice (prilagođeno iz 77)

Iako primjena elektromagnetske energije u terapiji ima dugu i značajnu povijest, ona do danas nije u potpunosti zaživjela kao općeprihvaćeno sredstvo u liječenju. Uzrok tome su opće nerazumijevanje kompleksnog područja elektromagnetizma te različita interpretacija pojmova poput električne, magnetske, elektromagnetske i radiofrekvencijske terapije s jedne strane kao i veliki broj nedovoljno detaljno definiranih, opisanih i ispitanih tehnologija koje omogućuju primjenu elektromagnetske energije u terapijske svrhe. U mnogim slučajevima elektromagnetska terapija uključuje isporuku određenog oblika energije u tkiva. Primjena određenog oblika energije na tkiva uzrokuje promjene ili podražaje u fiziološkim procesima koji se mogu koristiti u terapijske svrhe. Različite vrste energija imaju različite stupnjeve apsorpcije u tkivima pa, iako postoji zajednički nazivnik njihovih učinaka, lokalizacija učinaka varira ovisno o vrsti korištene energije (90).

Nalazi na staničnoj razini ukazuju na to da EM-polja mogu uzrokovati brojne biološke učinke od kojih su neki navedeni u tablici 9. U većini navedenih ispitivanja metodološki je isključena mogućnost da su za djelovanje zaslužni isključivo toplinski učinci te stoga mora biti uključen izravni mehanizam djelovanja elektromagnetskih polja. Dokazi o djelovanju elektromagnetskih polja u području radio i mikrovalnih frekvencija na cjelokupni organizam uključuju stimulaciju cijeljenja fraktura i tkiva, redukciju postoperativnih bolova i akutnih bolnih stanja (91–93). Također postoje dokazi o modifikaciji imunoloških parametara poput broja leukocita u krvi i slezeni (94).

Tablica 9. Nalazi izravnih učinaka elektromagnetskih polja na staničnoj razini

Izravni učinci EM-polja na staničnoj razini:	**Reference**
Promjene u koncentraciji staničnog kalcija u ljudskim limfocitima	(95,96)
Promjene u limfoidnim tumorskim stanicama	(97)
Promjene u aktivnosti enzima u T limfo-blastoidnim i drugim stanicama	(98)
Promjene u aktivnosti Na+/K+-ATP-aze u eritrocitima	(99–101)
Ekspresija gena	(102)
Stimulacija sinteze RNK-a i promjene u razini njezine transkripcije	(103,104)
Promjene u sintetskoj aktivnosti DNK-a i trajanju staničnog ciklusa limfocita	(105)
Promjene u aktivnosti sinteze proteina ili diferencijaciji fibroblasta	(106)
Potaknuti odgovor živčanih stanica	(107)

1.3.2.3 Učinci električne struje

Dva osnovna svojstva koja određuju protok struje kroz medij su napon i otpor. Napon (oznaka: *U*, jedinica: V) se može opisati kao pritisak pod kojim se odvija protok nabijenih čestica niz vodljivi medij ili kroz ioniziranu otopinu soli. Struja (oznaka: *I*, jedinica: A) opisuje količinu naboja koji proteče u nekom vremenu dok otpor opisuje lakoću ili težinu kojom čestice mogu teći kroz tkivo. Otpor (oznaka *R*, jedinica: Ω) je mjera koja opisuje suprotstavljanje protoku elektrona ili, u slučaju vodenih otopina u tkivima, iona u međustaničnom prostoru. Otpor je posljedica sudaranja elektrona (iona) s drugim atomima i molekulama pri čemu gube određeni dio energije što posljedično smanjuje mogućnost njihovog kretanja. Odnos napona, struje i otpora opisuje *Ohmov zakon* sljedećim izrazom:

$$U = I \times R \tag{1}$$

U ovakvom će opisanom sustavu pri stalnom naponu količina struje biti recipročna otporu, tj. s povećanjem otpora smanjit će se protok struje i obratno. Svojstvo svih vodiča elektriciteta općenito je da je njihov otpor opisan Ohmovim zakonom u pravilu jednak i za istosmjernu i za izmjeničnu struju nižih frekvencija.

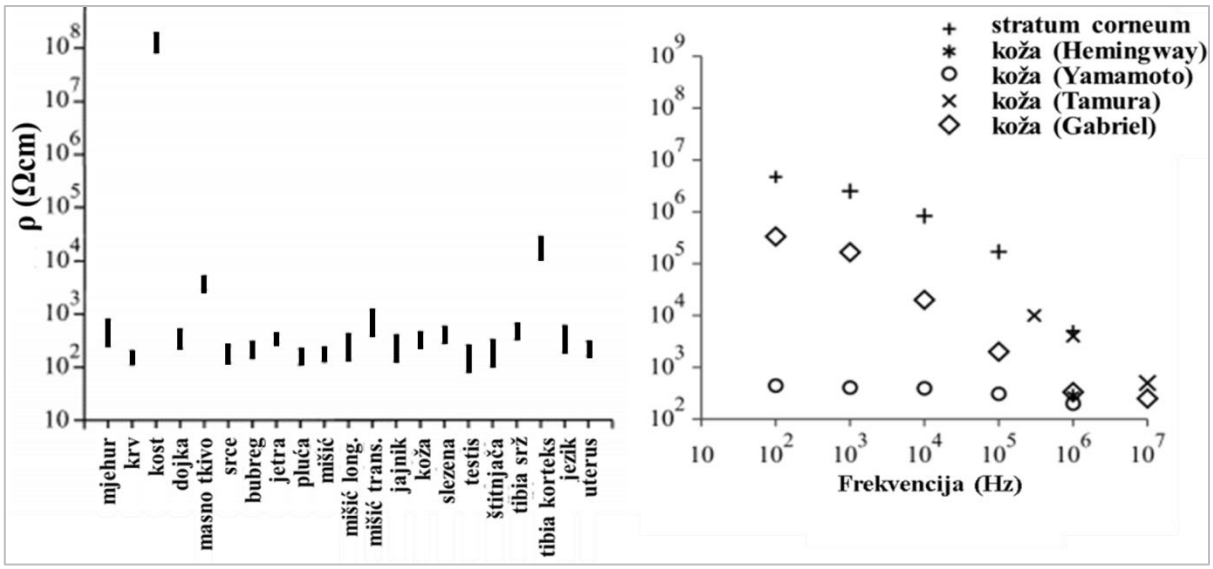
Specifični električni otpor (ρ) definiran je otporom (R) kao i dimenzijama medija tj. površinom (A) i duljinom vodljivog puta (l), a njihov odnos opisuje izraz:

$$\rho = R \times \frac{A}{l} \tag{2}$$

Specifični električni otpor je također opisan kvocijentom jakosti električnog polja (oznaka: *E*, jedinica V/m) i gustoće struje (oznaka: *J*, jedinica: A/m^2) te je recipročan specifičnoj električnoj vodljivosti (σ):

$$\rho = \frac{E}{J} = \frac{1}{\sigma} \tag{3}$$

Različite vrste tkiva pokazuju različite vrijednosti specifičnog električnog otpora koji se smanjuje s povećanjem frekvencije struje (slika 13) (108). Specifični električni otpor tkiva tako može varirati od manje od 1 Ωm (primjerice, izvanstanična tekućina) pa sve do nekoliko milijuna Ωm (*stratum corneum*, kost ili tvrdo zubno tkivo) (81). Gabriel i suradnici (109) daju opširan pregled dielektričnih svojstava tkiva s obzirom na vrstu tkiva i frekvencije (od 10 Hz do 10 GHz).



Slika 13. Lijevo: srednje vrijednosti specifičnog električnog otpora za različite vrste tkiva s izraženim standardnim devijacijama. Desno: ovisnost specifičnog električnog otpora kože o frekvenciji struje prema različitim autorima (1 Ωcm = 0,01 Ωm) (prilagođeno iz 108)

U biološkim sustavima postoje brojne dielektrične barijere (primjerice, koža, stanične membrane i membrane organela) koje razdvajaju vodljive medije (primjerice, izvanstanična i unutarstanične tekućine) zbog čega se mogu opisati modelom kondenzatora (110). Kondenzator se načelno sastoji od dva vodljiva materijala međusobno razdvojena izolatorom (dielektrikom). U kondenzatoru električno polje nastaje u prostoru između dva električno vodljiva tijela zbog razdvajanja električnog naboja. Postojanje polja u kondenzatoru znači da je u njemu pohranjena energija. Upravo ta osobina kondenzatora da pohranjuje energiju imat će za posljedicu da će on svojevrsnim povratnim, reaktivnim, djelovanjem utjecati i na veličinu električne struje koja će teći kroz njega. Svojstvo kondenzatora koje opisuje količinu energije koju on pohranjuje ili otpušta tijekom oscilacija napona i struje unutar svakog (AC) ciklusa naziva se kapacitet (eng. *capacitance, oznaka C, jedinica F – farad*) i opisan je izrazom:

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{l} \qquad (4)$$

Gdje je ε_0 dielektrična konstanta vakuuma (iznosi približno 8,854 x 10^{-12} F/m), ε_r dielektrična konstanta izolatora, A površina ploča kondenzatora te l udaljenost između ploča.

Kondenzator ne provodi istosmjernu električnu struju te za nju predstavlja, u idealnim uvjetima, beskonačno velik otpor. No, izmjenična struja, zbog brzih promjena u protoku naboja, može teći kroz kondenzator. U tom je slučaju protok struje kroz kondenzator (putem

kapaciteta) opisan kapacitivnom reaktancijom (X_C). Kapacitivna reaktancija je svojevrsni *prividni otpor* koji je definiran frekvencijom izmjenične struje (kružna frekvencija $\omega = 2\pi f$) i kapacitetom (C) kondenzatora te je opisana izrazom (110):

$$X_C = \frac{1}{j\omega C} = -j\frac{1}{\omega C} \tag{5}$$

Reaktancija je dakle, posljedica izmjeničnog toka struje koji uzrokuje uzastopno punjenje i pražnjenje kondenzatora, što zahtijeva određeno vrijeme. Ovo kašnjenje najčešće, u usporedbi sa sinusnim valom (čiji puni ciklus iznosi 360°), kasni četvrt ciklusa (90°) (110). Iz izraza je vidljivo i da se reaktancija smanjuje s porastom frekvencije (ω) i kapaciteta (C).

Ukupni otpor protoku struje unutar električnog sustava definiran je impedancijom (eng. *impedance*, oznaka: *Z*, jedinica Ω).

U slučaju kada struja teče isključivo kroz otpornik ona se vremenski podudara (u fazi je) s primijenjenom izmjeničnom strujom te je vrijednost impedancije jednaka vrijednosti otpora ($Z = R$).

U slučaju kada struja teče isključivo kroz kondenzator, napon kasni za strujom pa je impedancija jednaka kapacitivnoj reaktanciji ($Z = X_C$).

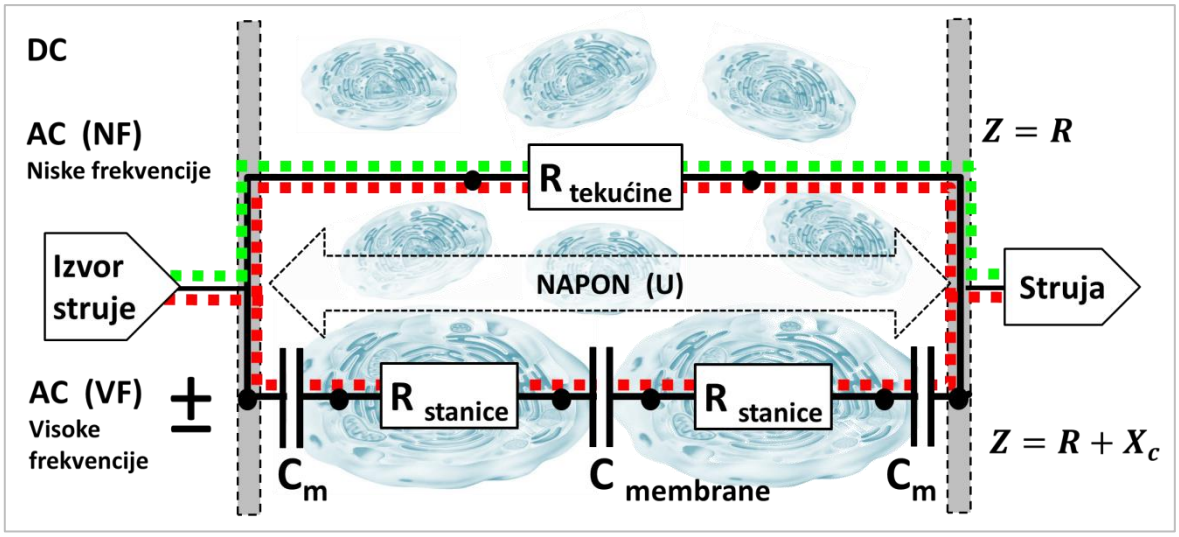
Kada pak struja teče kroz otpornik i kondenzator, impedancija je jednaka zbroju otpora i reaktancije ($Z = R + X_C$).

Vrijednosti impedancija za pojedina tkiva s obzirom na frekvencije prikazane su u tablici 10.

Postoje brojni, i često vrlo složeni, modeli (nadomjesne sheme) kojima se opisuju električna svojstva stanice i tkiva. Na slici 14 prikazan je primjer najjednostavnijeg elektroničkog modela tkiva koji je iskorišten za opis dva moguća načina protoka struje kroz tkivo.

Tablica 10. Primjer različitih vrijednosti impedancija
s obzirom na vrstu tkiva i frekvencijsko područje (podaci prikupljeni iz dostupne literature)

Tkiva	**Frekvencija (*f*)**	**Impedancija (*Z*)**	**Referenca**
Koža	1 Hz	≈ 10kΩ – 1MΩ	(111)
	10 kHz	≈ 1 kΩ	
	100 KHz	≈ 500 Ω	
	1 MHz	≈ 100 Ω	
Apikalni foramen – mukoza	400 Hz	≈ 6 – 12 kΩ	(112)
Kruna zuba	1Hz	≈ 40 MΩ (intaktni zub); ≈ 300 kΩ (karijes)	(113,114)
	30 kHz	≈ 2 MΩ (intaktni zub); ≈ 100 kΩ (karijes)	
Volumen tijela	10 kHz	≈ 100 Ω	(115)
	800 kHz	≈ 50 Ω	(116)



Slika 14. Prikaz osnovnog elektroničkog modela (nadomjesne sheme) tkiva:
a) istosmjerna struja (DC) ili izmjenična struja niske frekvencije (AC NF) teku isključivo međustaničnom tekućinom (zelena isprekidana linija). U tom slučaju je impedancija jednaka otporu međustanične tekućine ($Z = R_{tekućine}$),
b) pri strujama visokih frekvencija (crvena isprekidana linija) dio struje teče međustaničnom tekućinom ($Z = R_{tekućine}$), a dio kroz stanice ($R_{stanice}$) gdje se struja između stanica prenosi kapacitivnim putem ($C_{membrane}$) stoga je impedancija jednaka zbroju otpora unutarstanične tekućine i kapacitivne reaktancije ($Z = R_{stanice} + X_C$)
(prilagođeno iz 110)

Struja, osim ranije navedenog toplinskog učinka (rezistivnog zagrijavanja), pokazuje i dodatne biološke učinke koji se mogu pripisati protoku naboja (elektrona i iona), kao i

stvaranju električnih i magnetskih polja unutar tkiva (117–120). Cheng i suradnici (121) još 1982. godine u svom radu objavljuju da struje u području mikroampera (struje od 1 μA do 1 mA) značajno povećavaju proizvodnju ATP-a te pospješuju transport aminokiselina kroz staničnu membranu, kao i sintezu proteina u stanicama kože štakora. On navodi da je proizvodnja ATP-a bila povećana sve dok struje ne bi bile veće od 1 mA. Kada je struja bila veća od 1 mA, proizvodnja ATP-a se počela smanjivati. Brojna kasnija istraživanja ukazuju na to da različiti oblici stimulacije strujama u području mikroampera iz vanjskog izvora mogu uzrokovati brojne učinke na biološke sustave od kojih su neki prikazani u tablici 11.

Tablica 11. Prikaz poznatih učinaka stimulacije tkiva strujama u području mikroampera

Poznati učinci	**Reference**
Migracija fibroblasta i epitelnih stanica u područje rane	(122,123)
Povećano stvaranje faktora rasta	(124)
Povećano stvaranje kolagena	(125)
Povećana sinteza DNK-a i proteina	(126–128)
Ubrzano cijeljenje rana i ulkusa	(129–131)
Ubrzano cijeljenje fraktura	(132,133)
Ubrzano cijeljenje oštećenog živčanog tkiva	(134–136)
Ubrzano cijeljenje pri oštećenju mekih tkiva	(137)
Redukciju postoperativnih bolova i edema	(138,139)
Smanjenje serumske razine upalnih citokina IL-1, IL-6, TNF-X i neuropeptida P te povećano otpuštanje endorfina i serumskog kortizola	(140)
Smanjenje bolova i povećanje mobilnosti pri kroničnim bolovima kralješnice	(141)
Smanjenje bolova i povećanje mobilnosti – sindrom karpalnog tunela	(142)
Smanjenje bolova i povećanje mobilnosti – artritis	(143–145)
Smanjenje bolova i povećanje mobilnosti – peritendinitis	(146,147)
Smanjenje bolova i povećanje mobilnosti – degenerativne bolesti temporomandibularnog zgloba	(148)
Redukcija mijofacijalnih bolova vrata, glave i lica	(149)
Inhibicija rasta raznih patogena	(150,151)

In vitro studije pokazuju da primjena električnih polja i struja u području μA koje su slične endogenim električnim poljima mogu prouzročiti značajne promjene u strukturi i odgovoru stanica (152,153). Tako je otkriveno da se primjenom navedenih struja povećava broj organela odgovornih za staničnu aktivnost kao i koncentracije ATP-a (153). Blokiranje protoka fizioloških struja može usporiti ili ukinuti reparativne procese u raznim vrstama tkiva,

a primjena mikrostruja može pospješiti staničnu proliferaciju i sintezu proteina u osnovnim stanicama kože, tetiva, hrskavica i kosti (117).

1.4.3 Elektromagnetsko zračenje u vidljivom, bliskom UV i IC dijelu spektra

Elektromagnetsko zračenje je oblik energije koju emitira ili reflektira određeni objekt u obliku elektromagnetskih valova koji se šire kroz prostor, a oslobađa se tijekom određenih elektromagnetskih procesa. Elektromagnetski spektar definira raspon frekvencija elektromagnetskog zračenja od svega nekoliko Hz do 10^{18} Hz kroz: ekstremno niske frekvencije, radio i mikrovalove, infracrvene, vidljive i ultraljubičaste zrake, X-zrake i gama-zrake. Spektar se, prema količini energije određenog zračenja, tj. sposobnosti da uzrokuje oslobađanje elektrona iz atoma i molekula, može podijeliti na neionizirajuće zračenje (od radiovalova do mekog UV zračenja) i ionizirajuće (ekstremno UV, X i gama zračenje). Gotovo svi oblici elektromagnetskog zračenja koriste se u medicinske svrhe kroz različite oblike terapijskih, dijagnostičkih ili sterilizacijskih postupaka, a njihovi učinci na biološki sustav u najvećoj mjeri ovise upravo o količini energije koju nose.

U slučaju da određeni atom i/ili molekula apsorbira određenu energiju, elektroni se podižu na višu energetsku razinu. Tako pobuđena molekula, da bi se vratili u prvobitno stanje, mora izgubiti višak energije. To može učiniti putem ponovne emisije energije u vidu fotona (fluorescencijom ili fosforescencijom) najčešće veće valne duljine (niže energije) te putem prolaznih kemijskih reakcija i oslobađanjem topline (154). Fotobiološke reakcije su proizvod fotokemijskih ili fotofizičkih promjena koje nastaju apsorpcijom neionizirajućeg zračenja u vidljivom, UV i IC dijelu spektra. Ovi fenomeni usko su vezani uz stanične kromofore tj. fotoakceptorske molekule koje se nalaze u stanicama (155). Molekule poput citokrom C oksidaze, NADPH, flavoproteina i lipoamid-dehidrogenaze u mitohondrijskom matriksu, elastina i kolagena u ekstracelularnom matriksu, lipofuscina u mišićnom, živčanom i žljezdanom tkivu i koži, melanina i keratina u koži te porfirina u eritrocitima neke su od prepoznatih kromofora u kojih su zabilježena fotoakceptorska svojstva (155).

U svrhu fotostimulacije koriste se raznovrsni izvori koherentne i nekoherentne svjetlosti koji koriste elektromagnetsko zračenje u bliskom ultraljubičastom (280 – 400 nm), vidljivom (400 – 700 nm) i bliskom infracrvenom (700 – 1000 nm) dijelu spektra. Neki od poznatih učinaka svjetlosti različitih valnih duljina na fiziološke procese prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Pregled poznatih učinaka svjetlosti različitih valnih duljina na fiziološke procese (preuzeto iz 154)

Valna duljina (nm)	Zabilježeni učinci
860	Proliferacija fibroblasta
812	Sinteza DNK-a
780	Proliferacija keratinocita
660	Proizvodnja faktora rasta u fibroblasta
670	Proliferacija vaskularnih endotelnih stanica
632,8	Transformacija fibroblasta u miofibroblaste Proliferacija keratinocita Povećana pokretljivost keratinocita Oslobađanje IL-1 i IL-8 Aktivacija makrofaga Sekrecija faktora rasta u kulturama makrofaga Eliminacija bakterija
620	Proliferacija stanica
470 i 405	Baktericidna svojstva
365 (UVA)	Baktericidna svojstva Pojačana sinteza nukleinske kiseline Pojačana potrošnja kisika u mitohondrijima

Rezultati studija ukazuju na moguću apsorpciju svjetlosti putem mitohondrijskih enzima s posljedičnim lokalnim povećanjem temperature, apsorpciju fotona putem flavina i citokroma u mitohondrijskom respiracijskom lancu što utječe na transport elektrona, proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta putem ekscitacije endogenih porfirina te fotoaktivaciju kalcijevih kanala što uzrokuje povišenu koncentraciju kalcija u stanici, a time i njihovu proliferaciju (156).

Elektronski transportni lanac u mitohondrijima je osjetljiv na valne duljine u crvenom i bliskom infracrvenom spektru (156). Iako mehanizam djelovanja svjetlosti u ovom slučaju nije u potpunosti jasan, pokazalo se da fotostimulacija mitohondrija povećava proizvodnju ATP-a te uzrokuje prolazno povećanje količine reaktivnih kisikovih spojeva u mitohondrijima (157). U sklopu genetskih istraživanja pokazalo se da UVA svjetlost koja se koristi za fotostimulaciju stanica djeluje putem reakcija koje također uključuju prijenos signala u redoks procesima (157).

Postoji rastući broj dokaza da valne duljine u crvenom i bliskom IC dijelu spektra djeluju na stanicu putem primarnog fotoakceptora citokrom C oksidaze, terminalnog enzima u

mitohondrijskom lancu transporta elektrona (154). Tako je dokazano da crvena svjetlost niskog intenziteta može modulirati učinke molekula koje izravno inhibiraju aktivnost citokrom C oksidaze, posebice dušikovog oksida (158). Na staničnoj razini fotostimulacija može prouzročiti fotodisocijaciju dušikovog oksida (NO) od citokrom C oksidaze (CCO), koji u stanica izloženih stresu proizvodi mitohondrijska NO-sintetaza, a koji može zamijeniti mjesto s kisikom na bakrenim ili hem centrima CCO-e, što uzrokuje smanjenje stanične respiracije i proizvodnje energetskih spojeva poput ATP-a (159). Kada se citokrom C oksidaza stimulira svjetlošću, ubrzava se transport elektrona što dovodi do povećane proizvodnje ATP-a (156). Oksidirani oblik citokrom C oksidaze, odnosno najvjerojatnije njezin oksidirani oblik bakrenih centara, posebno je osjetljiv na ove valne duljine (154).

Stanice u aktivnoj proliferaciji i kronično upaljena tkiva pokazuju pojačanu osjetljivost na crvenu i blisku infracrvenu fotostimulaciju (160). Te su stanice posebno fotoosjetljive u svojoj proliferativnoj fazi koja je povezana je s prooksidacijskim redoks stanjem (161). Prooksidativna stanja mogu povećati prisutnost oksidiranih, fotoosjetljivijih oblika citokrom C oksidaze u mitohondrijima tretiranog tkiva (158). Ovaj, kao i drugi čimbenici poput kompromitirane cirkulacije i lošeg metabolizma, mogu pomoći u objašnjavanju pojačanog odgovora na fotostimulaciju (158). Sličan dokaz može se pronaći i u poremećenih oksidacijskih stanja kronično upaljenih zglobova, kao što je to slučaj u poremećaju temporomandibularnog zgloba (162).

Eksperimentalno je dokazano da iradijacija HeLa stanica specifičnom valnom duljinom UVA svjetlosti (365 nm) pokazuje pojačanu aktivnost u sintezi nukleinske kiseline te može dovesti do aktivacije potrošnje kisika u mitohondrijima (163). Citokrom C oksidaza apsorbira svjetlost UV spektra, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražila potencijalna uloga UV fotoakceptora u tom slučaju (163). U sklopu istraživanja u području genske terapije dokazano je da UVC (< 280 nm) svjetlost uzrokuje ozbiljne popratne pojave koje uključuju oštećenja DNK-a i citotoksičnost, dok UVA svjetlost (320 – 400 nm) slabog intenziteta ne uzrokuje mutacije DNK-a te pri nižim dozama ne pokazuje značajne citotoksične učinke već inducira transdukciju gena aktivacijom DNK-polimeraze, koja je povezana s prolaznim povećanjem unutarstaničnog ROS-a (164). UVA fotostimulaciju odlikuje zanimljiva sličnost s crvenom i bliskom infracrvenom fotostimulacijom niskog intenziteta.

Neke od staničnih komponenti poput kvinona, flavina, steroida i porfirina važne su kromofore koje apsorbiraju svjetlost u UVA području. Porfirini koji apsorbiraju svjetlost povezani su s baktericidnom aktivnošću UVA bliske svjetlosti u određenih bakterija (165). Poznato je da

fotoaktivirani endogeni porfirini vrlo učinkovito stvaraju ROS (posebice superoksid) putem prijenosa energije na kisik (166). Zbog navedenog se razloga porfirini koriste u biomedicinske svrhe kao fotosenzibilizatori u fotodinamičkoj terapiji malignih tumora te u razlaganju plakova i liječenju psorijatičnih lezija (167).

1.5 Biofizička svojstva bioloških sustava

1.5.1 Termodinamička svojstva organizma

Ljudsko tijelo je visoko uređeni otvoreni sustav. Samo jedna molekula proteina može biti sastavljena od milijun i više atoma povezanih u točno određenom slijedu i prostornom uređenju. Stanice su u tom pogledu daleko složeniji sustavi. Prvi zakon termodinamike nalaže da ljudsko tijelo *ne troši energiju već je samo pretvara iz jednog oblika u drugi*. Ljudski organizam iskorištava energiju pohranjenu u kemijskim vezama molekula hrane te je pretvara u rad i toplinu (168). Prilikom oslobađanja energije pohranjene u kemijskim vezama molekula istovremeno dolazi do njihovog raspadanja. Produkti koji nastaju ovim putem imaju veću neuređenost od reaktanata višeg uređenog stanja koji ulaze u reakciju. Stoga tijelo kemijsku energiju višeg reda pretvara u neuređenu toplinsku energiju (169).

Prema drugom zakonu termodinamike, svaki visoko uređeni sustav, sam po sebi, teži povećanju nereda, tj. entropije, a kada je entropija jednom postignuta, sustav prestaje funkcionirati (168). Za održavanje uređenog sustava potreban je kontinuirani rad za koji je potrebna energija (grč. *en* – u, *ergon* – rad). Primjerice, koncentracija iona unutar stanice razlikuje se od koncentracije iona izvan nje, što se očituje stvaranjem transmembranskog potencijala. Navedeni prikaz predstavlja uređeni sustav. Prirodna težnja je izjednačenje s okolinom, tj. uspostava elektrokemijske ravnoteže, stoga je za održavanje transmembranskog potencijala potreban rad. Rad je potreban i za održavanje svih drugih funkcija stanice, od izgradnje kompleksno uređenih biomolekula iz manjih i relativno nasumičnih podjedinica do diobe u procesu nastanka novih stanica, kao i apoptoze pri njihovom odumiranju (168). Održavanje reda u stanici vrlo je zahtjevan zadatak koji uključuje neke od najsloženijih mehanizama koje nalazimo u prirodi. Kada ti mehanizmi zataje, nastaje "nered", tj. povećava se entropija te dolazi do disfunkcije organizma (168).

Za uspostavu reda neophodna su dva čimbenika. Prvi je *energija* neophodna za rad, dok je drugi, isto toliko važan čimbenik, *informacija* koja upravlja radom u odgovarajućem smjeru (168). Claude Shannon (170) je 1940. godine razvio kvantitativnu formulaciju za količinu informacija dostupnu u određenom sustavu. *Shannonova formula* za sadržaj informacija recipročna je formuli za entropiju. Ovaj matematički uvid formalno dokazuje da, ako su i energija i informacija dostupne, entropija se u zadanom lokalitetu može smanjiti ovisno o količini dostupnih informacija za uspostavu procesa uređenja. U neuređenom sustavu red se može uspostaviti radom koji vodi odgovarajuća informacija (170). Drugi je zakon

termodinamike pritom očuvan jer se ukupna entropija okoline povećava zbog toga što rad potreban za provedbu uređenja sustava uvijek uzrokuje veće povećanje entropije u svojoj okolini (razgradnja složenih molekula na jednostavne spojeve) od smanjenja entropije unutar samog sustava (168).

Sve informacije potrebne za funkcioniranje organizma pohranjene su i organizirane u strukturi DNK-a, koja se sastoji od gotovo milijardu molekularnih jedinica u jasno određenim sekvencama, stoga upravo dostupnost energije omogućava održavanje strukture i funkcije živih organizama (168). Informacija pohranjena u DNK-u iskorištavanjem energije, pohranjene u kemijskim vezama molekula hrane koju troši organizam, vodi sklapanje brojnih proteina i enzima neophodnih za izgradnju i funkcioniranje organizma (168).

Toplina je jedan od najvažnijih vanjskih čimbenika u funkciji živih organizama. Brzina metaboličkih procesa neophodnih za život, poput diobe stanice i enzimskih reakcija, ovisi o temperaturi te se njezine promjene od samo nekoliko stupnjeva mogu očitovati promjenama u brzini odvijanja metaboličkih reakcija. U biološkim sustavima umjereno povećanje temperature dovodi do ubrzanja metaboličkih reakcija dok znatno povećanje temperature može dovesti do gubitka funkcije i oštećenja organizma (168).

1.5.2 Energetska svojstva stanice

Energija pohranjena u kemijskim vezama molekula, npr. glukoze, oslobađa se u stanici putem glikolize koja se odvija u citoplazmi i putem oksidativne fosforilacije koja se odvija u mitohondrijima. Iako se u procesu glikolize, za čije odvijanje nije potreban kisik, proizvodi relativno mala količina adenozin trifosfata (ATP), ona predstavlja vrlo važan metabolički put koji osigurava dovoljne količine energije (NADPH) i gradivnih elemenata poput acetil-koenzima A u procesu proliferacije stanice (171). U procesu oksidativne fosforilacije, bez obzira na to crpi li se energija iz ugljikohidrata, proteina ili masti, uvijek se troši kisik. Procjenjuje se da 90% kisika u sisavaca troše mitohondriji u sklopu mnogobrojnih procesa oksidativne fosforilacije i proizvodnje ATP-a (172).

Mitohondriji su, prema funkcijskoj i strukturnoj organizaciji, glavno mjesto proizvodnje ATP-a u stanici. Energija pohranjena u fosfatnoj vezi ATP-a, koja se oslobađa hidrolizom ATP-a u adenozin difosfat (ADP), koristi se u gotovo svim staničnim procesima koji zahtijevaju energiju. ATP se stvara u procesu staničnog disanja koji uključuje niz kemijskih reakcija

glikolize u citoplazmi, Krebsovog ciklusa u matriksu mitohondrija te oksidativne fosforilacije u kojima sudjeluje elektronski transportni lanac (ETL) i ATP-sintaza na unutarnjoj membrani mitohondrija. U mitohondrijima ugljikovodici služe kao izvor energijom bogatih elektrona koji omogućavaju redukciju NAD^+ i FAD u NADH i $FADH_2$ u Krebsovom ciklusu. Ove elektronima bogate molekule oksidiraju se u ETL-u na unutarnjoj membrani mitohondrija. U tom procesu se elektroni provode s više na nižu energetsku razinu te se konačno prenose na molekulu kisika pri čemu se oslobađa voda (H_2O). U procesu oksidativne fosforilacije elektroni se prenose s donora elektrona poput NADH, preko ELT-a, na akceptore elektrona poput kisika. Ovaj proces omogućava prijenos protona iz matriksa u intermembranski prostor mitohondrija zbog čega nastaje potencijalna energija u obliku kemijskog gradijenta i električnog potencijala membrane mitohondrija koja obično iznosi 150 – 180 mV (173). Protoni koji se niz elektrokemijski gradijent iz intermembranskog prostora vraćaju u matriks putem enzima ATP-sintaze osiguravaju potrebnu energiju za fosforilaciju ADP-a u ATP.

Od ukupno 80% kisika koji se troši u mitohondrijima za sintezu ATP-a 25 – 30% se troši za sintezu proteina, 19 – 28% za rad Na^+/K^+ ATP-aze, 4 – 8% za rad Ca^{++} ATP-aze, 2 – 8% za rad aktinomiozin-ATP-aze, 7 – 10% za glukoneogenezu i 3% za proizvodnju uree, dok se ostatak energije u velikoj mjeri troši i za proizvodnju mRNK-a i transport supstrata (172). Iz navedenog je vidljivo kako se veliki dio energije stanice troši za održavanje membranskih potencijala stanice. Dio kisika troši se i u procesima u kojima se stvaraju reaktivni kisikovi spojevi koji pokreću brojne signalne putove u stanici (174).

Visoki potencijal prijenosa fosfata ATP-a koristi se u brojnim biološkim procesima, uključujući kontrakciju mišića, sintezu i razgradnju bioloških molekula i membranski transport te može predstavljati izvanstaničnu i unutarstaničnu signalnu molekulu u staničnim procesima, poput proizvodnje inzulina, neurotransmitera, staničnog kretanja i razvoja organa (175).

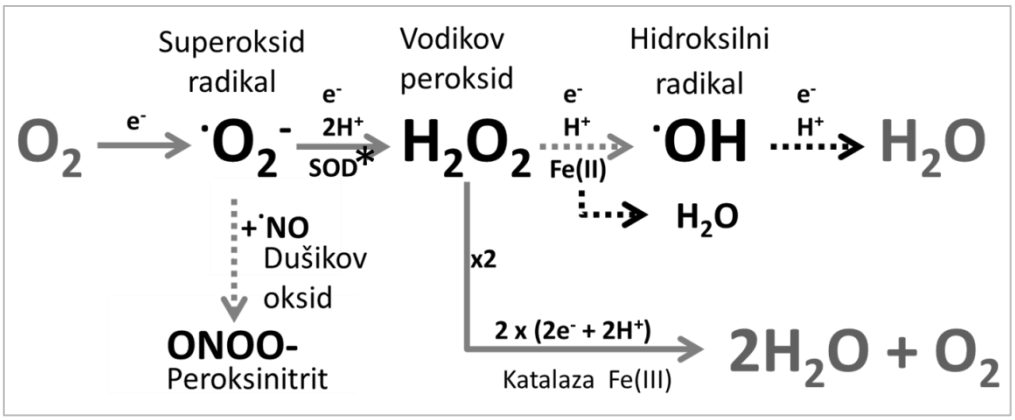
Otto Heinrich Warburg već 1924. godine navodi da tumorske i karcinomske stanice proizvode većinu energije (ATP-a) u anaerobnom procesu glikolize (176). On kao osnovnu razliku između zdravih i karcinomskih stanica navodi upravo omjer između glikolize i respiracije (177). Taj je odnos poznat kao *Warburgov efekt* (171). Warburg je za svoja otkrića na području staničnog disanja 1931. godine primio Nobelovu nagradu. Njegovoj se hipotezi ponovno vraća pozornost jer najnovija istraživanja dokazuju povezanost poremećaja u funkciji mitohondrija kao i smanjenja respiracije s rastom, diobom i širenjem tumora. Rezultati novijih istraživanja pokazuju da pojačani oksidacijski metabolizam može inhibirati

rast tumora u sisavaca (178). Također, postoje brojne druge studije koje pokazuju da bi Warburgov efekt, kao i intervencije u oksido-redukcijskim procesima mitohondrija, mogli imati značajnu ulogu u nastanku i liječenju tumora, ali i drugih bolesti gdje je prisutna oksido-redukcijska neravnoteža, poput neurodegenerativnih i bolesti krvožilnog sustava (179–184).

1.5.3 Endogeni izvori reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta

Mitohondriji, osim proizvodnje ATP-a, imaju važnu ulogu i u drugim metaboličkim procesima stanice, kao što su transport i/ili metabolizam kalcija, sinteza hema i steroida, regulacija potencijala stanične membrane, proliferacije i apoptoze te održavanja oksidacijsko redukcijske homeostaze (173). Mitohondriji su također odgovorni za proizvodnju ROS-a (eng. *reactive oxygen species* – reaktivne vrste kisika) i RNS-a (eng. *reactive nitrogen species* – reaktivne vrste dušika). Njihova se uloga u staničnim procesima proučava desetljećima, a najnovije spoznaje i istraživanja potvrđuju ne samo da nisu isključivo štetni, što se niz godina pretpostavljalo, već predstavljaju vrlo važne sudionike u metaboličkim procesima stanice i održavanju redoks-ravnoteže te njihova redukcija ne mora nužno imati terapijski učinak (174). Štoviše, sve veći broj dokaza upućuje na to da su ROS i RNS vrlo važni posrednici u ravnoteži staničnih ciklusa te zajedno s antioksidansima predstavljaju dinamičke, informacijama bogate, signalne molekule (185).

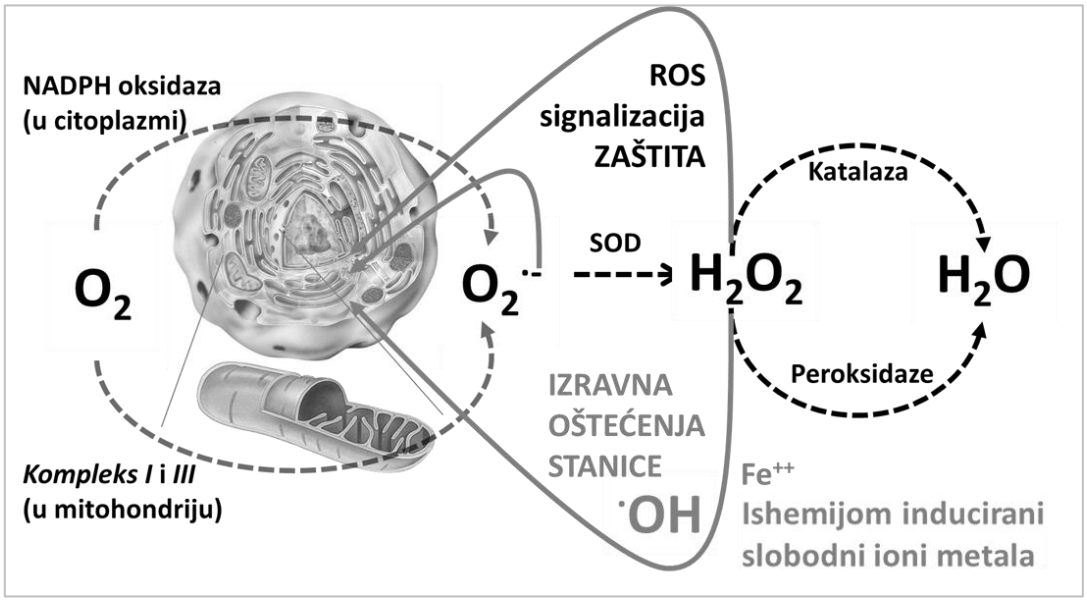
Stvaranje endogenog ROS-a prirodan je proces koji nastaje u mitohondrijima u raznim enzimskim i nekim neenzimskim metaboličkim reakcijama (174). Istraživanja su identificirala enzimske i neenzimske putove u metabolizmu makrofaga i neutrofila u kojima se stvaraju ROS i RNS (186). Nathan (187) ukazuje na to da dodatkom jednog elektrona molekuli kisika nastaje superoksid; dvaju elektrona vodikov peroksid; triju elektrona hidroksilni radikal; te dodatkom četiriju elektrona nastaje molekula vode (H_2O). Ovaj se proces u stanici odvija uz potrošnju vodika (slika 15).



Slika 15. Stvaranje različitih reaktivnih kisikovih vrsta putem transfera energije ili sekvencijalne jednovalentne redukcije kisika (* SOD – superoksid dismutaza) (prilagođeno iz 188)

U procesu stvaranja endogenog ROS-a važnu ulogu imaju određene vrste enzima u elektronskom transportnom lancu (ETL) koji u procesu oksidacije NADH mogu proizvesti superoksid (173). *Kompleks I* je glavno mjesto proizvodnje superoksida koji se oslobađa u matriks mitohondrija te brzo prelazi u vodikov peroksid (H_2O_2) putem superoksid dismutaze (SOD) (189). *Kompleks III* također može proizvoditi superoksid, a proces njegove proizvodnje mogu potaknuti ishemični i apoptotični uvjeti (190). Taj proces može biti potaknut inhibicijom *kompleksa IV*, kao i redukcijom protoka elektrona u ETL-u u sklopu hipoksičnog stresa (191). Redukcija protoka elektrona u ETL-u može biti izazvana visokim membranskim potencijalom mitohondrija (visoka koncentracija protona u intermembranskom prostoru) dok inhibiciju *kompleksa IV* mogu prouzročiti razni spojevi, poput dušikovog oksida (NO) i ugljikovog monoksida (CO), koji su kompetitivni s kisikom na mjestu njegova vezanja (192). Endogeni CO, koji proizvodi hem-oksigenaza u procesu razgradnje hema, može pokrenuti proizvodnju ROS-a i RNS-a zbog jakog afiniteta za reducirane tranzicijske metale poput željeza (Fe^{++}) na mjestu vezanja molekularnog kisika pri čemu dolazi do blokade u protoku elektrona u ETL-u (173). *Kompleks I* oslobađa superoksid u matriksu mitohondrija, a *kompleks III* u matriksu i intermembranskom prostoru, dok je proizvodnja u *kompleksu II* zanemariva (173). U stanicama fagocitirajućih neutrofila, fibroblasta, te mišićnim i endotelnim stanicama krvnih žila superoksid se proizvodi u citoplazmi putem NADPH oksidaze (NOX) (193). Načini stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta u stanici prikazani su na slici 16.

Vodikov peroksid (H_2O_2), koji nastaje redukcijom superoksida putem SOD-a, predstavlja jednu od važnijih signalnih molekula u skupini ROS-a. Vodikov peroksid se može proizvoditi unutar mitohondrija odakle lako prelazi u citoplazmu ili se pak stvara izravno u citoplazmi, putem NADPH oksidaze i monoamin oksidaze, gdje ga zatim reduciraju citoplazmatski glutation (GSH) te katalaza u peroksisomima (174). Dinamičku regulaciju vodikova peroksida također rade peroksi- i tio-redoksini koji, osim regulacije razine vodikova peroksida, u svrhu zaštite od toksičnog učinka oksidativnog stresa, također omogućavaju i postizanje dovoljno visokih koncentracija u staničnom i međustaničnom prostoru koje su neophodne za postizanje prijenosa signala (194). Time vodikov peroksid igra važnu ulogu u translaciji signala o energetskom stanju stanice unutar nje same, ali i prema susjednim stanicama (194).



Slika 16. Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u mitohondrijima i citoplazmi i njihova uloga u stanici (prilagođeno iz 174)

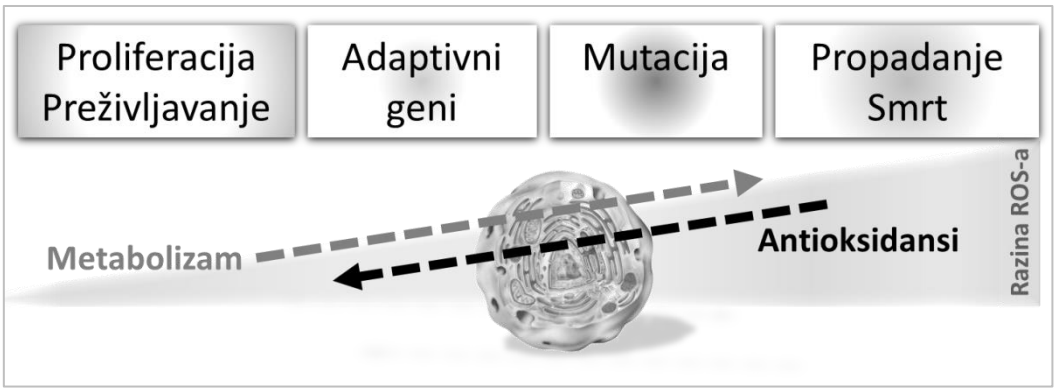
Ovisno o lokalizaciji i brzini proizvodnje, vodikov peroksid može prouzročiti vrlo brze (za manje od jedne sekunde) ili sasvim polagane reakcije koje su izazvane aktivacijom NADPH-oksidaze od faktora rasta, a koje mogu trajati satima, danima pa i dulje (194). Brzi signalni putovi, povezani s proizvodnjom H_2O_2 u mitohondrijima, djeluju na stanične ionske kanale, posebice ATP-osjetljive kalijeve kanale koji mogu inhibirati i time prouzročiti hiperpolarizaciju stanične membrane (194). Spora regulacija odvija se putem redoks-osjetljivih fosfataza, koje H_2O_2 inaktivira, i kinaza koje aktivira te na taj način ugađa daljnju transmisiju signala sve do faktora poput tumor-supresorskog proteina (p53), nuklearnog

faktora kapa B (NFκB) (transkripcija i proizvodnja citokina) i transkripcijskog aktivacijskog proteina 1 (AP-1) (diferencijacija, proliferacija i apoptoza) (194).

Peroksilni radikal ($^{*}OH$) može nastati u reakcijama redukcije H_2O_2 u prisutnosti (ishemijom induciranih) reduciranih iona metala ponajprije željeza (Fe^{++}). On zbog svoje visoke reaktivnosti može reagirati s bilo kojom molekulom u svojoj neposrednoj blizini (174).

Ekspresija mitohondrijske specifične NO-sintaze (NOS) uzrokuje proizvodnju dušikovog oksida (NO) u mitohondrijima u prisutnosti kalcijevih iona te dovodi do smanjenja mitohondrijskog potencijala (173). NO je važan protuupalni i vazorelaksacijski signal u stanici (50). Utjecaj proizvodnje NO na funkciju mitohondrija nije još u potpunosti razjašnjen, ali postoje dokazi da i umjerene razine NO mogu parcijalno inhibirati elektronski transportni lanac i time prouzročiti povećanu proizvodnju ROS-a, zbog čega dolazi do depolarizacije koja vodi smanjenju unosa kalcija u mitohondrij (195). Uloga dušikovog oksida u regulaciji mitohondrijske biosinteze primijećena je kod adipocita i hepatocita (196). Postoje jasne naznake da deficijencija NO-sintaze može prouzročiti manjak mitohondrijskih enzima (197). Također je primijećena obrambena uloga dušikovog oksida u mitohondrijima pri oštećenjima koja mogu nastati u procesu *ishemije/reperfuzije* te se sugerira njihova uloga u prolaznoj djelomičnoj inhibiciji *kompleksa I* koja smanjuje nagli porast ROS-a u *reperfuziji* (173). Pod utjecajem određenih patoloških podražaja prekomjerna proizvodnja dušikovog oksida može prouzročiti ozbiljna oštećenja tkiva, posebice kada je njegova visoka koncentracija popraćena niskom koncentracijom kisika. U tom slučaju dolazi do inhibicije elektronskog transportnog lanca i proizvodnje superoksida, koji može reagirati sa slobodnim dušikovim oksidom tvoreći puno reaktivniji radikal peroksinitrit ($ONOO^{-}$) koji može inaktivirati brojne važne mitohondrijske enzime oksidacijom, nitracijom ili nitrozacijom (173).

Pri umjerenoj proizvodnji ROS-a (u lancu transporta elektrona) dolazi do pojave proliferativnih mehanizama. Kada ona prelazi određeni prag, može dovesti do prilagodbene modulacije u ekspresiji gena, dok visoke koncentracije ROS-a mogu izazvati nekrozu stanice (slika 17) (13).



Slika 17. Reaktivne kisikove vrste, kao i antioksidansi, u stanici imaju značajnu ulogu u prijenosu signala tijekom staničnih procesa te ovisno o svojoj količini i sposobnosti stanice da putem vlastitih procesa ukloni uzroke koji su doveli do neravnoteže, mogu prouzročiti pozitivne ili negativne učinke na fiziološke procese u stanici
(prilagođeno iz 174)

Brojni enzimatski i fiziološki procesi u stanici regulirani su putem ROS-a i RNS-a (ionski kanali i transmembranski transportni proteini, G-proteinom spregnuti receptori, male GTP-aze, fosfataze, kinaze, proteaze, metabolički enzimi, translacijski regulatori, regulatori staničnog ciklusa, transkripcijski faktori, histon-(de)acetilaze i DNK-metilaze) (198). Putem ovih reakcija oni sudjeluju u regulaciji brojnih procesa u područjima staničnog kretanja, matriksa, staničnih veza i komunikacije, sekrecije, respiracije, ekspresije gena, metabolizma, replikacije i apoptoze (198). Iz ovoga se može zaključiti ne samo da ROS, kao i RNS, nisu isključivo štetni za stanicu već igraju važnu ulogu u regulaciji brojnih metaboličkih procesa i rada elektronskog transportnog lanca.

1.5.4 Elektrodinamička svojstva bioloških sustava

Iako elektrofiziologija ima dugu i značaju povijest, koja se može pratiti od prvih eksperimenata Luigia Galvanija s kraja 18. stoljeća, tek je krajem 20. stoljeća, razvojem suvremenih istraživačkih postupaka, postalo moguće opsežnije dokazati suptilne veze između stanične biologije i fenomena bioelektriciteta. Brojni procesi i kemijske reakcije u stanicama i tkivima popraćene su elektromagnetskim fenomenima koji su donedavno, osim na makroskopskoj razini (npr. EKG ili MKG), bili nedostupni procjeni njihove pojavnosti. Razvojem novih tehnoloških postupaka, koji su omogućili dokazivanje i kvantifikaciju električnih potencijala u stanici, otvoren je put boljem razumijevanju njezinih elektrodinamičkih svojstava.

Da ljudsko tijelo posjeduje unutarnje bioelektrične i biomagnetske sustave koji proizvode elektrokemijske signale, može se, primjerice, iščitati iz snimki električnih i magnetskih potencijala srca, mozga, skeletnih mišića i retine tijekom elektro-fizioloških dijagnostičkih postupaka. Živčane stanice možda su najbolje poznate po svojoj sposobnosti pretvorbe različitih oblika energije (mehaničke, kemijske, toplinske, svjetlosne, električne) u informacijama bogate signale, no ova su svojstva prisutna i u svakoj pojedinačnoj stanici u tijelu (152). Dok se na elektromagnetske fenomene u prošlosti gledalo kao na nusprodukte normalne stanične funkcije, novija istraživanja dokazuju da oni čine sastavni dio tih funkcija. (152, 199, 200).

Svaka je stanica okružena staničnom membranom, sastavljenom od fosfolipidnog dvosloja i brojnih proteina koji su u njega uloženi. Membrana zbog svoje fosfolipidne građe ima svojstvo dielektrika i difuzijske barijere zbog čega priječi slobodan protok iona u stanicu i iz nje. Određeni transmembranski proteini tvore kanale kroz membranu i na taj način mogu pasivno propuštati ili aktivno (uz potrošnju energije) prenositi ione kroz nju. U staničnoj membrani ekscitabilnih i neekcitabilnih stanica postoje naponski kanali koji reagiraju na promjene u električnim poljima te sukladno tome reguliraju protok iona (153). Transmembranski potencijal postiže se aktivnim transportom iona, prvenstveno natrija i kalija, suprotno njihovom koncentracijskom gradijentu, zbog čega se uspostavlja razdvajanje naboja koje stvara razliku potencijala ili napon na membrani. Dvije odrednice odgovorne za izmjenu iona kroz membranu su ionski koncentracijski gradijent te električni potencijal (gradijent) tj. napon (152).

Raspon membranskog potencija može se sa strane citoplazme kretati od -40 do -200 mV, dok prosječni potencijali membrane iznose od -40 do -90 mV u diferenciranih stanica te manje

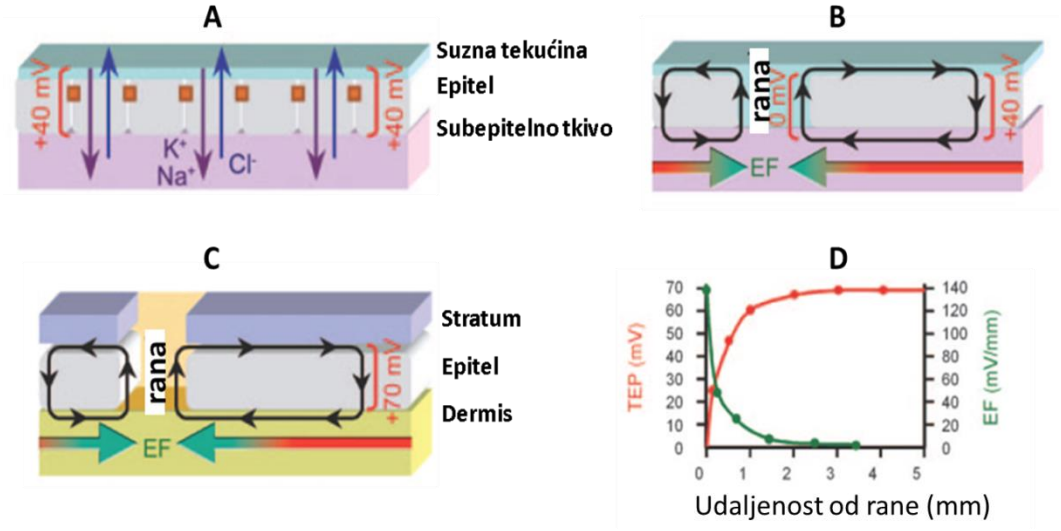
od -25 mV u embrionalnih i tumorskih stanica (200). Vrlo tanak sloj stanične membrane od oko 10 nm pri poznatoj razlici potencijala od oko 100 mV može tako stvoriti električno polje jačine 10^7 V/m (152). Dok je rezistivnost citoplazme niska i iznosi približno 0,7 Ωcm, rezistivnost stanične membrane je, zbog vodljivosti alternativnih puteva membranskih molekula, varijabilna i može biti jednaka ili veća od 100 Ωcm (201). Kapacitivnost membrane, tj. njezina sposobnost da pohrani električne naboje, relativno je izvan utjecaja transmembranskih proteina pa ima više ili manje jednaku vrijednost koja se procjenjuje na 1 $\mu F/cm^2$ (201).

Svaka stanica troši značajnu količinu energije za održavanje napona na staničnoj membrani kao i na membranama svojih organela, a koji su specifični s obzirom na vrstu stanice i tkivo te stupanj diferencijacije (152). Membranski potencijali na mjestima međustanične komunikacije omogućavaju kretanje iona unutar tkiva stvarajući endogena bioelektrična polja koja tvore napone kroz različite slojeve tkiva (117). Bioelektrična polja sačinjena su od električnih polja direktnih struja u području mikroampera (μA) i elektromagnetskih polja ultraniskih frekvencija, nižih od 10 Hz (117). U neekscitabilnim stanicama polja koja se pritom javljaju imaju stalni gradijent koji se sporo mijenja zbog nižeg membranskog potencijala u usporedbi s tipičnim akcijskim potencijalima u živcima i mišićima stoga ne pokazuju nagle skokove u protoku struje već se blago mijenjaju u duljem vremenskom rasponu od nekoliko dana ili tjedana kao što je to slučaj u procesu cijeljenja rane, a za njihovu je stimulaciju potreban potencijal od 0,1 do 10 V/cm (152).

Kod kralješnjaka se tijekom embrionalnog razvoja stvaraju endogeni električni potencijali (eng. *trans-nerual tube potential*), koji unutar neuralne cijevi nekih vrsta mogu dosezati i do 90 mV, a zbog debljine neuralnog zida od samo 50 μm tvore stalni gradijent napona i do 1800 mV/mm (153). Pod utjecajem ovog jakog i stalnog ekstracelularnog električnog polja neuroblasti neuralnog zida migriraju, diferenciraju se i usmjereno šire svoje aksonske nastavke (153). Ovaj je potencijal vrlo važan za normalan embrionalni razvoj, a njegova supresija može dovesti do poremećaja ili prekida u razvoju embrija (153).

Transepitelni potencijal (TEP) nastaje zbog razdvajanja naboja u slojevima epitela, a njegove karakteristike dobro su proučene kod epitela rožnice i kože (153). U epitelnim stanicama većina natrijevih ionskih kanala se nalazi na apikalnoj membrani dok je većina Na^+/K^+ ATP-aza smještena na bazolateralnim membranama epitelnih stanica (153). Kako Na^+/K^+ ATP-aza održava visoku koncentraciju kalijevih iona, a nisku natrijevih iona u stanici, ovakva lokalizacija kanala dovodi do ulaska natrija u stanicu na apikalnoj membrani, a izlaska putem

Na^+/K^+ ATP-aza na bazolateralnim membranama. Nepropusni spojevi epitelnih stanica tvore jaku električki otpornu barijeru epitelnog sloja i priječe izlazak natrijevih iona između apikalne i bazolateralne strane zbog čega dolazi do relativno veće koncentracije natrija s unutarnje strane epitelnog sloja (slika 18 a). TEP koji se pritom stvara može se mjeriti direktno na intaktnom epitelu te je proporcionalan otporu ovog paracelularnog puta i iznosi između 15 i 60 mV koji je pozitivan prema unutrašnjosti tijela (202).



Slika 18. Transepitelni potencijal (TEP)
A: Intaktni epitel rožnice održava jednoliki TEP od + 40 mV koji nastaje zbog unosa kalijevih i natrijevih iona iz suzne tekućine u rožnicu (ljubičaste strelice) te izbacivanja iona klora iz rožnice u suznu tekućinu (plave strelice). TEP se održava zbog prisutnosti prisnih staničnih veza (narančasti kvadrati).
B: Nakon ozljede, epitelna brtva je prekinuta te dolazi do kolapsa TEP-a na 0V na mjestu rane zbog čega dolazi do trenutnog istjecanja iona koji tvore struje (crne strelice) koje se održavaju sve do zatvaranja rane reepitelizacijom. TEP je održan na + 40 mV distalno od rane, a gradijent električnog potencijala uspostavlja električno polje (EF) unutar tkiva rožnice (horizontalne linije).
C: U epitelnom sloju kože ionski transport (uglavnom unos natrijevih iona) omogućava održavanje znatnog TEP-a (+ 70 mV), koji pri ozljedi također stvara struje (crne strelice) i električno polje (horizontalne strelice) u subepitelnom tkivu. U tom slučaju povratni put struje prolazi između mrtvih stanica *stratuma corneuma* i živih stanica epidermisa. Gradijent boja horizontalnih linija na slikama B i C ukazuje na to da je električno polje (EF) najjače u području rane.
D: Izravna mjerenja TEP-a (crvena linija) kao funkcija udaljenosti od ruba rane. Električno polje (EF – zelena linija) koje nastaje zbog gradijenta TEP-a iznosi 140 mV/mm u blizini ruba rane.
Tako stvoreno električno polje predstavlja elektrotaksijski signal koji je važan čimbenik u procesima koji dovode do cijeljenja
(prilagođeno iz 153)

Prilikom ozljede epitelnog sloja dolazi do pada TEP-a prouzročenog istjecanjem struje prema vanjskoj površini epitela te se ovaj proces naziva *potencijalom ozljede*. McCaig i suradnici (153) tako navode da, evolucijski gledano, zatvaranje membrane kako bi se spriječilo istjecanje električne struje pripada jednom od najprimitivnijih odgovora stanice i tkiva na ozljedu. Pojedinačne stanice ili nakupine stanica koriste momentalni električni signal induciran ozljedom kako bi zatvorile svoju membranu ili ranu (153). Intaktne epitelne stanice koje se nalaze u blizini ozljede svojom aktivnošću održavaju stalne struje u području rane te se depolarizacija TEP-a i posljedično električno polje (slika 18 b, c i d), koje nastaje na samom rubu ozljede, širi u unutarnjost tkiva. Tako stvoreno električno polje predstavlja elektrotaksijski signal koji je važan čimbenik u procesima koji dovode do cijeljenja (153). Elektro ili galvanotaksija, tj. sposobnost stanica da se usmjereno kreću pod utjecajem električnog polja, dokazana je u brojnih vezivnih i imunogenih stanica, a smjer kretanja ovisan je o vrsti stanica kao i polaritetu električnog polja (152).

S obzirom na razinu tkiva endogena električna polja su esencijalna za brojne metaboličke procese, uključujući razvoj, prilagodbu i obnavljanje. Ona mogu utjecati na oblikovanje i rast organa i dijelova tijela (153). Električna polja se također stvaraju kada je vezivno tkivo pod stresom te mogu utjecati na prilagodbene izmjene u izvanstaničnom matriksu, a kada je tkivo oštećeno, ona stvaraju struje koje pokreću kretanje elemenata reparativnog odgovora (203,204). Struje se smanjuju kako reparacija napreduje te se vraćaju u normalne vrijednosti po završetku procesa cijeljenja (152).

Izvori endogenih električnih polja prisutni su i na subcelularnoj razini. Zbog visokog membranskog potencijala od oko 180 mV i kemijskoga gradijenta od oko 60 mV, ukupni napon na membranama mitohondrija može dosegnuti i 240 mV (205). Mitohondriji povezani međumitohondrijskim čvorovima mogu predstavljati električki jedinstven sustav koji može olakšati dostavu energije unutar stanice (206). Također je dokazano da mitohondriji mogu, putem elektroforeze, akumulirati katione koji mogu dosegnuti koncentracije i do tisuću puta veće od njihove koncentracije u mediju (207).

Ideju da su elektronska mobilnost i prijenos naboja preko bioloških polimernih molekula mogući temeljni mehanizam živih organizama iznijeli su Szent i Györgyi 1941. godine (208). U idućim desetljećima prikupljeni su dokazi da brojni proteini međustaničnog matriksa, uključujući kolagen, pokazuju poluvodička, piezoelektrična i fotoprovodljiva svojstva *in vitro* (209). Lokalno razdvajanje ionskih naboja, koje nastaje prilikom mehaničkog stresa, dobro je razvijeno u vezivnom tkivu te se može mjeriti kao stresom inducirani potencijal (ili protočni

potencijal) (210). Poznato je da ionski izvedeni potencijali imaju važan lokalni učinak na sintezu ekstracelularnog matriksa (211).

Istraživanja stanične biologije otkrila su načine povezivanja površine i unutarnjosti stanice s kontinuiranim fibroznim sustavom putem transmembranskih proteina poput integrina te ukazuju na to da je tijelo sastavljeno od međusobno povezanog fibroznog poluvodičkog matriksa koji se proteže čitavim tijelom (212,213). Utvrđeno je da membranski proteini posjeduju određena svojstva koja ih čine osjetljivima na električna polja što se stvaraju u području stanične membrane (214).

Prema Beckeru (215), koštano je tkivo građeno od kristala na kojima se, uslijed mehaničke deformacije, mogu razdvojiti naboji zbog čega dolazi do stvaranja piezoelektričnog efekta, tj. stvaranja električnog potencijala. Pretpostavlja se da upravo piezoelektrični efekt koštanih kristala igra važnu ulogu u formiranju, resorpciji i održavanju koštanog tkiva (216).

Biološke polarne molekule i polimerne strukture poput mikrotubula i citoskeleta mogu se pobuditi ili stvarati endogena elektromagnetska polja koja, djelovanjem na naboje, dipole i multipole, kao i polarizacijom uzrokujući dielektroforetski učinak, mogu pokretati naboje i čestice u stanici (217).

Preispitivanje staničnih signala, uzimajući u obzir interakcije proteina s elektrostatskim profilom membrane, upućuje na to da je električna dimenzija duboko uključena u temeljne aspekte stanične biologije.

1.5.5 Fotodinamička svojstva stanice

Ruski liječnik i histolog Alexander Gurwitsch i njegova supruga otkrili su 1923. godine da su žive stanice, razdvojene kvarcnim staklom koje propušta UV svjetlost od 260 nm, sposobne razmjenjivati vitalne stanične informacije putem elektromagnetskih valova u UV frekvencijskom spektru koji prolazi kroz kvarcno, ali ne i obično natrijevo staklo koje ne propušta UV zrake (218). Navedenu pojavu nazvali su "mitogeni ili mitotički" valovi s obzirom na to da su bili primijećeni tijekom odvijanja enzimskih reakcija u mitozi (218). Gurwitsch je utvrdio kako mišićna tkiva, rožnica, krv i živci odašilju ovu specifičnu energiju (218). Njegov je rad prvi dokumentirani dokaz biofotona, tj. koherentne svjetlosti koju odašilju stanice biljaka i životinja (219). Tek je početkom 1960-ih Lenjingradsko državno sveučilište uspjelo snimiti mitogene zrake osjetljivim fotopojačalima (220). Bernard Ruth (221) u svojoj disertaciji ponovno otkriva vrlo slabu, ali stalnu emisiju fotona u živim

stanicama. Njegova skupina, predvođena Fritz-Albertom Poppom, u daljnjim istraživanjima također eksperimentalno dokazuje da biofotoni nisu samo posljedica spontane kemoluminiscencije, već da imaju višemodalitetna koherentna svojstva slična laseru (222). Dodatna istraživanja otkrila su da pod određenim uvjetima, poput staničnog rasta i mitoze, žive stanice mogu odašiljati i emitirati ultraslabe visokofrekvencijske elektromagnetske valove (fotone) bliskih infracrvenih frekvencija čiji intenzitet ovisi o funkcionalnom statusu stanice te može voditi staničnu orijentaciju i migraciju (222).

Tijekom metaboličkih procesa različitih organizama, bez vanjske pobude, stalno i spontano se oslobađaju biofotoni koji nastaju zbog bioluminiscentnih reakcija reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta i uključuju jednostavan prestanak njihova pobuđenog stanja, a njihov glavni izvor predstavlja oksidativni metabolizam koji se odvija u mitohondrijima (223). Biofotoni se ne raspršuju nasumično po stanici, već ih apsorbiraju obližnje kromoforne molekule (poput citokrom c oksidaze, porfirina, flavina, tubulina i drugih) koje se time električki pobuđuju zbog čega mijenjaju svoja kemijska i fizička svojstva te se na taj način pokreću/reguliraju složeni signalni procesi u stanici (223).

Neuroni također neprekidno emitiraju i provode biofotone, a njihov je nastanak povezan s depolarizacijom membrane, dok je njihov intenzitet u izravnoj vezi s metabolizmom, EEG aktivnošću, protokom krvi i oksidativnim procesima neurona (223).

Mikrotubuli staničnog citoskeleta spregnuti s filamentoznim mitohondrijima tvore kontinuiranu mrežu (mitohondrijski retikulum) koja igra važnu ulogu u signalizaciji i obradi informacija unutar neurona, a njihovo je stvaranje i pokretanje regulirano redoks-ovisnom fosforilacijom i kalcijevim signalima (223). Refrakterni indeks mitohondrijskog retikuluma je viši od citoplazme koja ih okružuje, pa mitohondriji i mikrotubuli mogu imati ulogu optičkih vodiča (223). Proces stvaranja mikrotubula osjetljiv je na UV i plavu svjetlost, a biofotoni koje oslobađaju u mitohondrijima nalaze se upravo u tom dijelu spektra (223).

Navedeni primjeri, kao i sve veći broj novih spoznaja na području bioelektromagnetizma i biofotonike, predstavljaju vrlo važna otkrića. Ona čine velik iskorak u pogledu razumijevanja elektromagnetske prirode živih organizama, kao i važne uloge elektromagnetske energije u odvijanju bioloških procesa, koji su se još donedavno objašnjavali isključivo biokemijskim modelima. Ove spoznaje otvaraju bojna pitanja ali i šire vidike u svim znanstvenim područjima koja se bave proučavanjem fizisa (grč. *physis:* priroda, esencija).

2 SVRHA RADA I HIPOTEZA

Visokofrekvencijski generator ozona Ozonix (Biozonix GmbH, Münich, Germany) je klasificiran kao medicinski generator ozona, stoga su se njegovi terapijski učinci do sada pripisivali isključivo djelovanju ozona. Načelo rada uređaja i proizvodnje ozona putem kapacitivne sprege između aktivne plazma-elektrode u kojoj se nalazi pobuđeni plin i ciljnog tkiva, pri čemu dolazi do dielektričnog barijernog izboja i pojave mikroizboja, nalaže da bi tijekom zahvata u terapijskom polju, uz ozon, trebali biti prisutni i dodatni fizički i kemijski čimbenici koji mogu djelovati na ciljno tkivo.

Svrha istraživanja je:

1. Odrediti emisijski spektar plazma-elektrode
2. Odrediti emisijski spektar mikroizboja koji nastaje pri izboju kroz zrak
3. Odrediti postojanje i obilježja električnog polja elektrode
4. Odrediti postojanje i obilježja magnetskog polja u području kontaktnog izboja
5. Odrediti postojanje i obilježja magnetskog polja u području izboja kroz zrak
6. Odrediti postojanje i obilježja električne struje u području kontaktnog izboja
7. Odrediti postojanje i obilježja električne struje u području izboja krozu zrak
8. Odrediti temperaturne promjene na površini uzorka tkiva pri kontaktnom izboju
9. Odrediti temperaturne promjene na površini uzorka tkiva pri izboju kroz zrak
10. Usporediti dobivene vrijednosti s obzirom na dva modaliteta primjene

Hipoteza rada je:

1. U terapijskom polju visokofrekvencijskog generatora ozona su, uz ozon, prisutni drugi fizički i kemijski čimbenici koji mogu imati određene učinke na ciljno tkivo
2. U terapijskom polju prilikom izboja kroz zrak prisutna je hladna atmosferska plazma
3. U terapijskom polju prisutno je i neionizirajuće elektromagnetsko zračenje
4. U terapijskom polju prisutno je električno polje
5. U terapijskom polju prisutno je magnetsko polje
6. Tijekom zahvata kroz terapijsko polje teku struje
7. Tijekom zahvata dolazi do toplinskih promjena na površini tkiva
8. Učinci ove vrste terapijskog zahvata se ne mogu pripisati samo djelovanju ozona već bi se trebali pripisati kumulativnom učinku:
    a. elektromagnetske energije: neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja, elektromagnetskog polja i struje
    b. hladne atmosferske plazme, koja uz ozon sadrži elektrone i druge kemijske konstituente poput pobuđenih i/ili ioniziranih molekula i atoma
    c. topline: koja se oslobađa kao posljedica interakcije navedenih čimbenika s ciljnim tkivom

3 MATERIJALI I POSTUPCI

U radu je istraživano terapijsko polje visokofrekvencijskog generatora ozona Ozonix (Biozonix GmbH, München, Germany).

Optička emisijska spektroskopija provedena je u Laboratoriju za fiziku plazme Instituta za fiziku u Zagrebu.

Istraživanja električnih i magnetskih veličina prisutnih u terapijskom polju, kao i toplinskih promjena na površini ispitivanog uzorka, provedena su na Fakultetu elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanja su provedena sljedećim mjernim postupcima:

1. Pomoću optičke emisijske spektroskopije određen je spektar tinjavog izboja elektrode, mikroizboja u zračnom međuprostoru te izboja kroz tekući medij na površini uzorka tkiva
2. Mjerenjem električnog i magnetskog polja te mjerenjem efektivnih vrijednosti napona i struje na uzorku tkiva uz procjenu količine predane električne energije
3. Mjerenjem temperature površinskog sloja ispitnog uzorka, prije i nakon zahvata, kao funkcije izlaznog napona i vremena izloženosti.

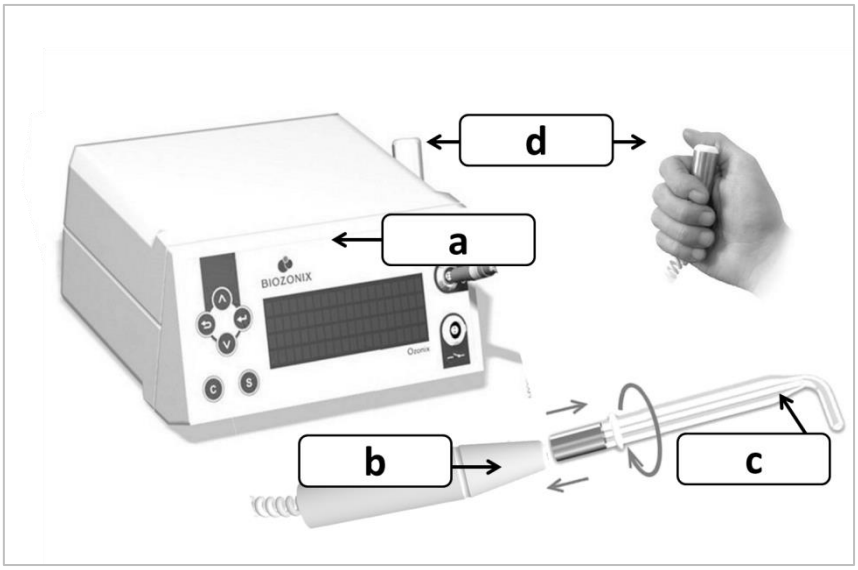
S obzirom na modalitet primjene, ispitivanja su provedena za:

1. *Kontaktni izboj* pri kojem se plazma-elektroda nalazi u izravnom kontaktu s ciljnim tkivom/objektom/tekućinom
2. *Izboj kroz zrak* gdje je između elektrode i terapijskog polja prisutan zračni međuprostor u kojem dolazi do dielektričnog barijernog izboja i formiranja mikroizboja.

3.1 Ispitivani uređaj

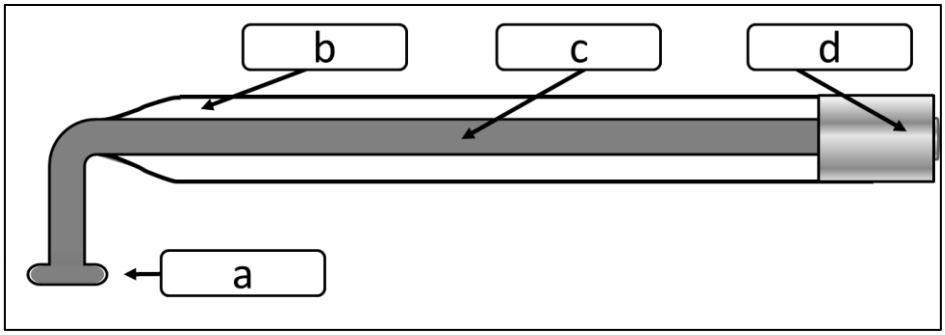
Visokofrekvencijski generator ozona Ozonix (Biozonix GmbH, München, Njemačka), koji je uporabljen u ispitivanjima, službeno je klasificiran kao medicinski generator ozona koji proizvodi ozon putem električnih izboja (224). Uređaj pritom proizvodi visokofrekvencijske (frekvencija impulsa od 400 do 1100 Hz, rezonantna frekvencija od 25 do 50 kHz) impulse napona između 3 i 18 kV (224). Putem staklenih plazma-elektroda, ispunjenih plemenitim plinom, strujni se impulsi prenose na ciljno tkivo/objekt u svrhu stvaranja ozona prema načelu dielektričnog barijernog izboja (DBI). Sustav se sastoji se od centralne upravljačke jedinice, aplikatora – visokonaponskog Teslinog transformatora, staklenih plazma-elektroda te referentne elektrode (slika 19).

Centralna upravljačka jedinica proizvodi elektromagnetske impulse te omogućava regulaciju napona (intenzitet od 10 do 100% u koracima od 10%), čime se regulira intenzitet izboja i količina proizvedenog ozona (224). Centralna jedinica povezana je s visokonaponskim Teslinim transformatorom koji čini dio aplikatora (eng. *hand piece*) što se putem opruge povezuje s plazma-elektrodom (224). Referentna elektroda omogućava zatvaranje strujnog kruga između pacijenata/objekta i uređaja te se prije provedbe zahvata dovodi u izravni kontakt s pacijentom/objektom (224).



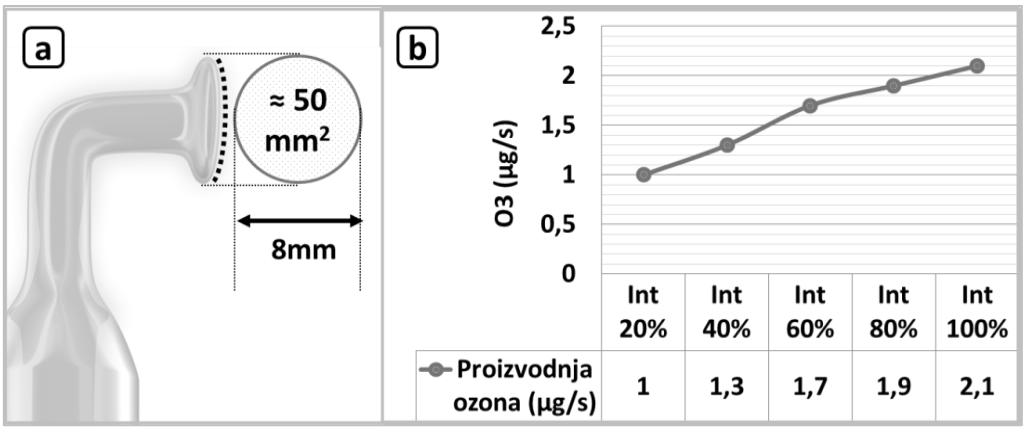
Slika 19. Prikaz ispitivanog visokofrekvencijskog generatora ozona *Ozonix* (*Biozonix GmbH, München, Njemačka*) koji je službeno klasificiran kao medicinski generator ozona: a) centralna upravljačka jedinica, b) visokonaponski transformator – aplikator, c) staklena plazma-elektroda, d) referentna elektroda (prilagođeno iz 224)

Plazma-elektroda (slika 20) građena je od staklene komore ispunjene jednim ili mješavinom više plemenitih plinova (plazma-cijev) te metalnog dijela za spoj s aplikatorom. (224) U određenim slučajevima, kao što je onaj u elektroda za primjenu u usnoj šupljini, tijelo plazma cijevi uklopljeno je u dodatnu staklenu komoru koja služi kao izolator te priječi rasap električnih izboja pri kontaktu tijela elektrode s okolnim tkivima usne šupljine. Opisana konstrukcija omogućava prijenos elektromagnetskih impulsa, tj. postizanje električnih izboja isključivo na aktivnom vrhu elektrode kada ona dođe u neposrednu blizinu (udaljenost ovisi o odabranom intenzitetu) ili u izravan kontakt s ciljnom površinom (224). Elektrode su oblikom i dimenzijama svog aktivnog vrha prilagođene potrebama i lokalizaciji terapijskog zahvata.



Slika 20. Shematski prikaz plazma-elektrode:
a) vrh ili aktivni dio elektrode koji omogućava prijenos impulsa na ciljno područje,
b) izolacijska staklena komora priječi rasap izboja na okolna tkiva usne šupljine,
c) staklena (plazma) cijev ispunjena plemenitim plinom u kojoj se javlja tinjavi izboj,
d) metalni nastavak za povezivanje s aplikatorom.

Plazma-elektroda korištena u svim ispitivanjima kružnog je oblika blago konveksne površine ($D = 8$ mm, $A \approx 50$ mm^2) (slika 21 a). Uređaj, u sprezi s navedenom plazma-elektrodom, ovisno o odabranom intenzitetu, kojim se regulira izlazni napon, prema načelu dielektričnog barijernog izboja, u zračnom međuprostoru između staklene površine aktivne plazma-elektrode i ciljne površine na tkivu, proizvodi ozon-stopom od 1 do 2,1 μg/s (mjerenja proveo *TÜV SÜD Industrie Service GmbH, München, Germany*) (slika 21 b) (224). Tako izražena stopa proizvodnje ozona predstavlja najveću moguću količinu ozona koja se može stvoriti u idealnim uvjetima (kontinuirani protok zraka preko elektrode), dok stvarna stopa proizvodnje može ovisiti o svojstvima zraka, modalitetima primjene kao i svojstvima površine na koju se primjenjuje elektroda (224).



Slika 21. Plazma-elektroda korištena u ispitivanjima:
a) aktivna elektroda je kružnog oblika blago konveksne površine (D = 8 mm A ≈ 50 mm^2),
b) stopa proizvodnje ozona od 1 do 2,1 µg/s pri izboju kroz zrak prikazana kao funkcija intenziteta (prilagođeno iz izvješća *IS-US3-MUC, TÜV SÜD Industrie Service GmbH, München, Germany*) (preuzeto iz 224)

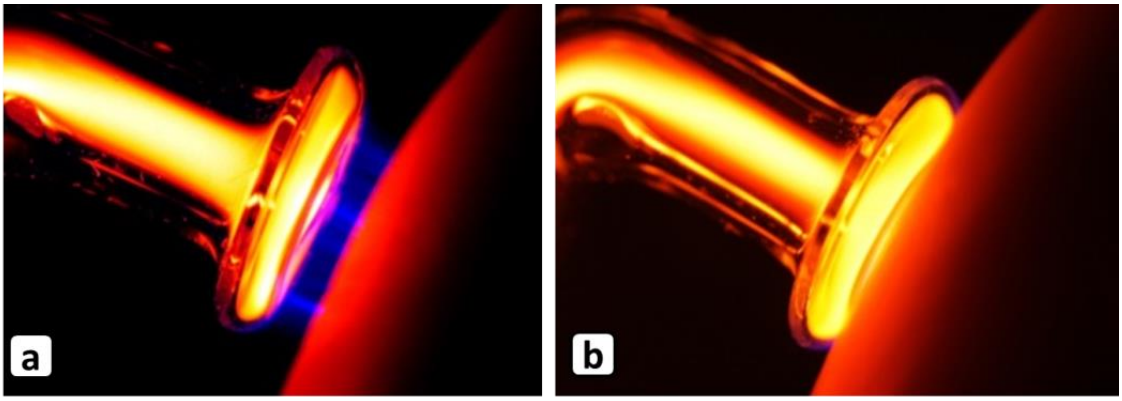
Ciljnu površinu tj. područje može predstavljati bilo koja biološka površina, poput kože, sluznice ili tvrdog zubnog tkiva ali i (ne)biološka površina kao što je protetski rad ili implantat. U izborniku uređaja moguće je proizvoljno odabrati intenzitet od 10 do 100%, kao i vrijeme trajanja zahvata od 10 do 120 sekundi u koracima od 10 sekundi, no moguće je odabrati i programski predefinirane protokole koje preporučuje proizvođač. U tom slučaju ovisno o namjeni pri korištenju intenziteta 100% preporučeno vrijeme terapijskog zahvata iznosi 40 sekundi dok pri intenzitetu 20% ono iznosi 120 sekundi (tablica 13) (224).

Tablica 13. Primjer preporučenih intenziteta i trajanja terapijskih postupaka koji se primjenjuju u dentalnoj medicini (prema preporuci proizvođača) te stopa proizvodnje ozona pri navedenim intenzitetima (preuzeto iz 224)

Intenzitet	**Vrijeme (s)**	**O_3 (µg/s)**	**Primjena**
100%	40	2,1	Dezinfekcije korijenskih kanala i kruna avitalnih zuba
80%	40	1,9	Dezinfekcija mekih tkiva, koagulacija, stimulacija
60%	60	1,7	Dezinfekcija, stimulacija tkiva
40%	90	1,3	Cijeljenje rana i lezija
20%	120	1,0	Osjetljiva tkiva i pedodontski zahvati

Plemeniti plin u elektrodi, pobuđen elektromagnetskim impulsima, prelazi u stanje plazme te dolazi do pojave tinjavog izboja (eng. *glow discharge*) unutar plazma-cijevi elektrode (224).

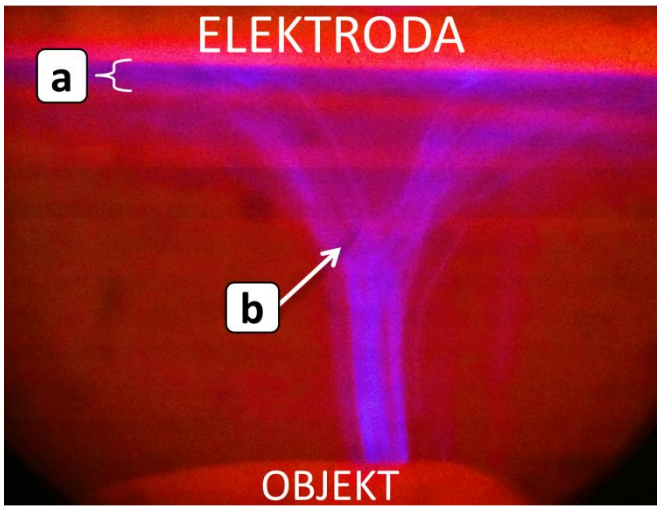
Nakon uspostave strujnog kruga (uređaj – plazma-elektroda – ciljno područje – referentna elektroda) događaji koji slijede ovise o tome nalazi li se elektroda u izravnom kontaktu s ciljnom površinom (kontaktni izboj) ili je između elektrode i tkiva prisutan zračni međuprostor (izboj kroz zrak) (slika 22).



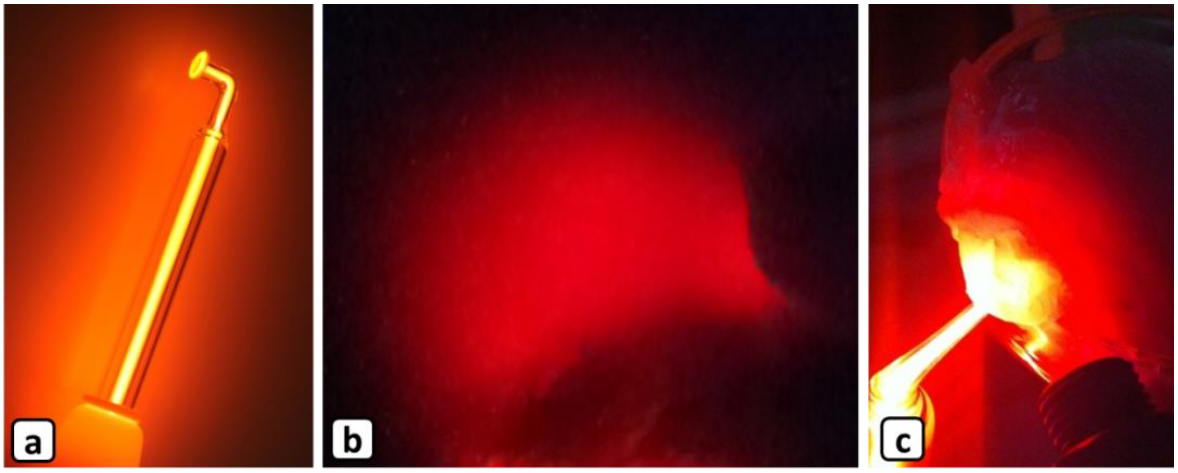
Slika 22. Modaliteti primjene elektrode u terapijskom polju:
a) *izboj kroz zrak*: elektroda se nalazi u neposrednoj blizini površine tkiva pri čemu je u zračnom međuprostoru prisutan ambijentalni zrak u kojem nastaju mikroizboji prema načelu dielektričnog barijernog izboja
b) *kontaktni izboj*: elektroda i tkivo nalaze se u izravnom kontaktu pri čemu nema zračnog međuprostora ili je sveden na minimum (mikroskopski džepovi zraka i rubni dijelovi elektrode) stoga i stvaranje mikroizboja izostaje ili je svedeno na minimum

Pri kontaktnom izboju dolazi do prijenosa energije kapacitivnom spregom između staklene površine elektrode i ciljne površine dok se pri izboju kroz zrak taj prijenos odvija kroz zračni međuprostor između elektrode i tkiva/objekta pri čemu dolazi do dielektričnog barijernog izboja i formiranja mikroizboja. Mikroskopska snimka izboja kroz zrak ukazuje na karakterističnu strukturu izboja u kojem se mikroizboji u obliku lijevka pružaju filamenti te se koncentriraju na manju površinu objekta (slika 23).

Plazma-elektroda u svom aktivnom stanju, zbog tinjavog izboja plazme u plinovima kojima je punjena, emitira svjetlost koja se širi kroz terapijsko polje. Svjetlost narančasto-crvene boje tijekom zahvata prolazi kroz strukture tkiva (slika 24). Općenita složenost bilo kojeg zahvata u području usne šupljine često onemogućava fiksaciju elektrode na točno određenoj udaljenosti od površine ciljnog tkiva pa se pri primjeni VFGO-a zbog pomicanja elektrode tijekom terapije može pretpostaviti da se postupak sastoji od stalne izmjene kontaktnog izboja i izboja kroz zrak.



Slika 23. Dielektrični barijerni izboj u zračnom međuprostoru između elektrode i površine objekta (povećanje 50 puta):
a) difuzni izboj na površini elektrode
b) formiranje mikroizboja u obliku lijevka koji završavaju na maloj površini objekta



Slika 24. Snimke izvedene u potpunom mraku:
a) svjetlosna emisija tinjavog izboja koji nastaje pobudom plina u plazma-elektrodi,
b) prosvjetljenje kroz sluznicu obraza u infraorbitalnom području u projekciji 12 – 14,
c) zone različitog intenziteta prosvjetljenja tkiva prilikom primjene plazma-elektrode na uzorku tkiva

Iz navedenih razloga i u svrhu razjašnjavanja mehanizama određenih terapijskih učinaka, a koji se ne mogu objasniti isključivo mehanizmom topikalnog djelovanja ozona, smatra se vrijednim ispitati fizičke i kemijske čimbenike, koji su uz ozon prisutni u terapijskom polju, te definirati možebitne razlike u njihovim vrijednostima s obzirom na dva modaliteta primjene: kontaktni izboj i izboj kroz zrak.

3.2 Optička emisijska spektroskopija

Optička emisijska spektroskopija provedena je u svrhu bilježenja i analize emisijskih spektralnih linija koje su prisutne u terapijskom polju VFGO-a s ciljem utvrđivanja fizičkih i kemijskih čimbenika prisutnih tijekom terapijskog zahvata. Provedena su ispitivanja emisijskog spektra elektrode, emisijskog spektra izboja kroz zrak (mikroizboja) te emisijskog spektra pri kontaktnom izboju kroz tekući medij na površini tkivnog uzorka.

3.2.1 Materijali

Za snimanje spektara korišteni su spektrometri s lećom i optičkim vlaknom AvaSpec-ULS-RS-TEC i AvaSpec-3648 (Avantes, Apeldoorn, Netherlands). Spektrometar AvaSpec-ULS-RS-TEC namijenjen je snimanju spektara niskog intenziteta u području optičkog spektra 200 nm do 760 nm. Spektralno razlučivanje spektroskopa je 0,3 nm. Spektrometar je opremljen detektorom *CCD linear array, 3648 pixels*, uz ulaznu pukotinu 10 mikrona. Za snimanje spektra izboja kroz zrak od 180 od 1100 nm korišten je spektrometar AvaSpec-3648 spektralnog razlučivanja 1 nm. U svrhu kalibracije spektralnog odziva sustava spektrometar, svjetlovod-leća, korištena je kalibrirana spektralna lampa deuterij/halogen AvaLight-DH-CAL (Avantes, Apeldoorn, Netherlands). Podaci su bilježeni na računalu koje je opremljeno programom AvaSoft-All (Avantes, Apeldoorn, Netherlands).

Za identifikaciju spektralnih linija atoma korišteni su podaci iz NIST-ove baze podataka (*Handbook of basic Atomic data*: http://www.nist.gov/pml/data/handbook/index.cfm). Spektralna simulacija atomskih spektara provedena je na NIST-ovoj web-stranici, uz pretpostavku da vrijede uvjeti za primjenu *Saha-LTE* jednadžbe (http://physics.nist.gov/PhysRefData). Za identifikaciju molekularnog spektra i spektralnu simulaciju molekularnog spektra korišten je komercijalni program SpecAir 3 (SpectralFit, Atony, France).

Sva su mjerenja provedena na optičkom stolu na kojem su putem nosača i držača elektroda optičko vlakno s lećom te ciljni objekt (tkivo/žica) postavljeni u odnose koji su omogućili provedbu mjerenja.

Pri bilježenju spektra izboja kroz zrak kao ciljna površina na koju se djeluje elektrodom korišteni su uzorci kože i potkožnog tkiva svinjske potrbušnice (dimenzija 30 x 30 mm i debljine 20 mm) te bakrena žica (površine poprečnog presjeka 0,8 mm^2 – AWG 18) koja je uzemljena izravnim povezivanjem s referentnom elektrodom.

U ispitivanjima izboja kroz tekući medij na površini uzorka tkiva korištena je 0,9-postotna sterilna apirogena otopina natrij klorida (0,154 mmol/ml) za parenteralnu primjenu (*Natrii chloridi infundibile*, Pliva Hrvatska, d.o.o. Zagreb, Hrvatska).

3.2.2 Mjerni postupci

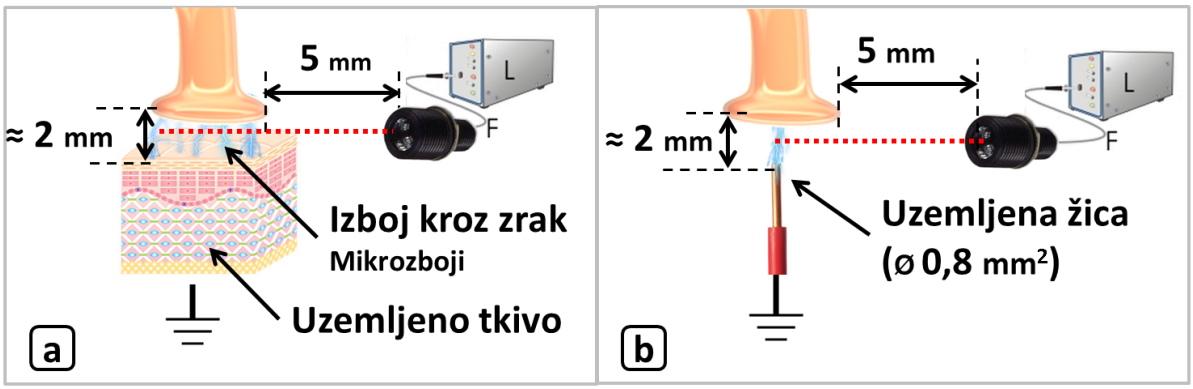
Optička emisijska spektroskopija provedena je trima mjernim postupcima u kojima je zabilježen spektar plazma-elektrode, izboja kroz zrak te kontaktnog izboja kroz tekući medij na površini uzorka tkiva. Sva su mjerenja provedena u optičkom području od 200 do 760 nm te 180 do 1100 nm.

U svrhu mjerenja spektra koji emitira plazma-elektroda, tj. tinjavog izboja u plinu elektrode, optičko vlakno s lećom je usmjereno izravno u plazma-elektrodu pri udaljenosti leće od površine aktivne elektrode od 60 mm. Signali su integrirani u vremenskom rasponu od 500 ms.

U svrhu bilježenja emisijskog spektra pri izboju kroz zrak optičko vlakno s lećom usmjereno je u volumen (zračni međuprostor) koji je omeđen aktivnom površinom plazma-elektrode i površinom uzorka tkiva. Korištena konfiguracija prikazana je na slici 25 a. Tkivni uzorci su korišteni kao ciljna površina radi što vjernije simulacije stvarnih uvjeta prisutnih tijekom terapijskog zahvata ali i zbog pretpostavke da bi sama vrsta površine na koju se djeluje mogla imati određeni utjecaj na vrstu kemijskih reakcija u procesu nastanka mikroizboja. Kako bi se dodatno pojačao intenzitet, relativno slabe svjetlosti izboja, mikroizboji su koncentrirani u malom volumenu, koji zatvara površina elektrode i poprečni presjek bakrene žice površine 0,8 mm^2 (slika 25 b) u koji je usmjereno optičko vlakno s lećom. Signali su integrirani u rasponu od 2 sekunde.

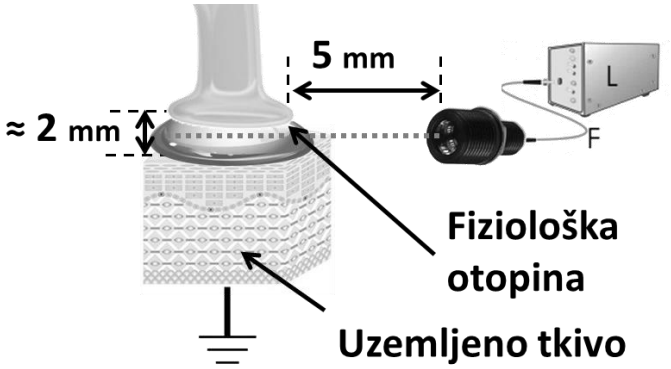
Zbog intenzivne svjetlosti plazma-elektrode, koja je prisutna u zračnom međuprostoru, čiji je spektar predstavljao određenu smetnju u bilježenju spektra mikroizboja, sva su mjerenja provedena pri najvećem intenzitetu (100%). Najveći intenzitet odabran je u svrhu postizanja što intenzivnijeg izboja u volumenu pri razmaku između elektrode i površine tkiva koji je osiguravao dovoljan prostor u koji je mogla biti usmjerena leća optičkog vlakna. Pritom se nastojalo da navedeni razmak bude što je moguće manji (≈ 2 mm). Zbog relativno slabog intenziteta signala u slučaju bilježenja spektralnih linija izboja kroz zrak signali su integrirani u duljem vremenskom rasponu (2 sekunde) čime se pojačalo bilježenje najzastupljenijih spektralnih linija u terapijskom polju, no time je ujedno smanjena mogućnost bilježenja

spektralnih linija vremenski kratkih mikroizboja koji traju svega nekoliko desetaka nanosekundi.



Slika 25. Shematski prikaz konfiguracije za mjerenje spektara izboja kroz zrak:
a) izboj kroz zrak u kojem su mikroizboji raspršeni u zračnom međuprostoru,
b) izboj kroz zrak u kojem su mikroizboji koncentrirani na žicu poprečnog presjeka 0,8 mm^2

Postupak koji je korišten u svrhu bilježenja emisijskih spektralnih linija prisutnih u terapijskom polju u slučaju kada se aktivna površina elektrode nalazi u kontaktu s fiziološkom tekućinom (0,154 mmol NaCl / ml) kojom je prethodno navlažena površina tkivnog uzorka prikazan je na slici 26. Ovim su modelom simulirani uvjeti u kojima se elektroda nalazi u izravnom kontaktu s tkivnim tekućinama (primjerice, slina i/ili krv). Signali su integrirani u rasponu od 1 sekunde.



Slika 26. Shematski prikaz konfiguracije za mjerenje spektra u volumenu u slučaju kada je ispunjen fiziološkom otopinom

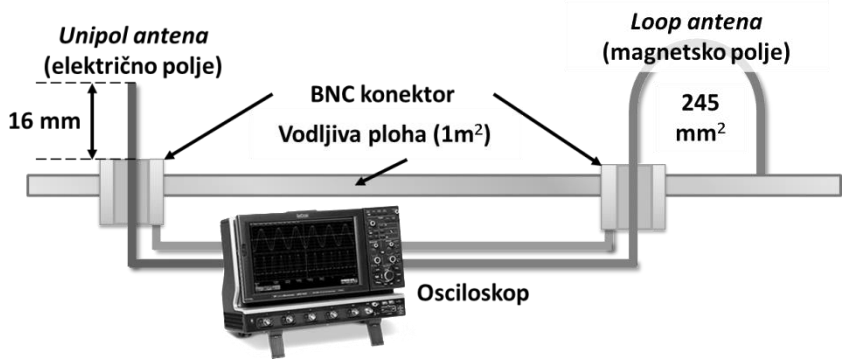
3.3 Mjerenja elektromagnetskih veličina

U svrhu istraživanja elektromagnetskih veličina prisutnih u terapijskom polju tijekom primjene visokofrekvencijskog generatora ozona (VFOG) provedena su sljedeća mjerenja:

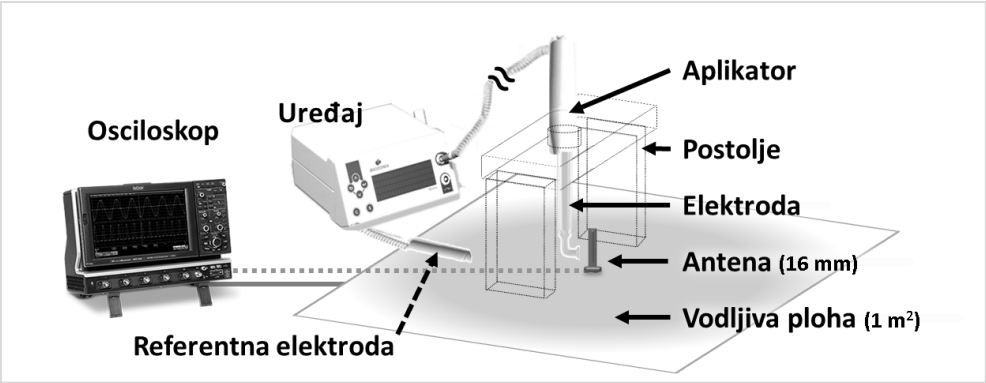
1. Mjerenje električnog polja aktivne plazma-elektrode
2. Mjerenje magnetskog polja aktivne plazma-elektrode pri kontaktnom izboju i pri izboju kroz zrak uz razmak elektrode od referentne ravnine (d ≈ 0,5 mm)
3. Mjerenje efektivnih vrijednosti napona i struje kroz tkivo pri kontaktnom izboju i pri izboju kroz zrak uz razmak elektrode od referentne ravnine (d ≈ 0,5 mm) kao funkcije namještenog intenziteta. Navedene vrijednosti su korištene u svrhu procjene srednje vrijednosti snage (*P*), gustoće struje (*J*) s obzirom na aktivnu površinu elektrode (≈ 50 mm^2) te procjenu vrijednosti predane energije (*E*) s obzirom na trajanje zahvata (30, 60, 90 i 120 sekundi).

3.3.1 Materijali

Za mjerenje električnog polja korištena je unipol antena (engl. *monopole antenna*) (slika 27 lijevo) duljine 16 mm (žica AWG 16 promjera 1,29 mm, površine poprečnog presjeka 1,31 mm^2) (225). Antena je pomoću BNC-konektora ugrađena u vodljivu plohu i spojena na osciloskop WaveRunner 640Zi (Teledyne LeCroy, Inc., California, USA). Ulazna impedancija osciloskopa bila je 1 MΩ || 14 pF. Vodljiva ploha (dvostrani vitroplast, dimenzija 1 × 1 m i debljine 1,6 mm) je povezana s masom osciloskopa. Tijekom mjerenja referentna elektroda VFOG-a postavljena je na vodljivu plohu. Postolje za aplikator s elektrodom izrađeno je od antistatičkog ekspandiranog polietilena (slika 28).

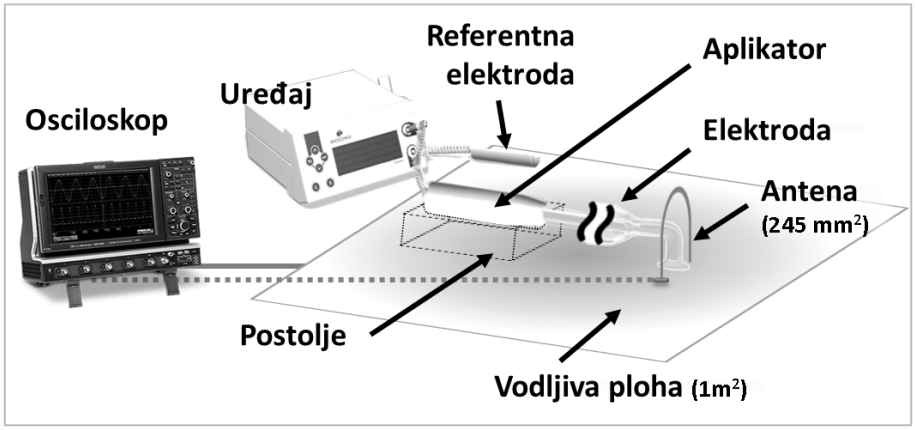


Slika 27. Antene korištene u mjerenjima električnog i magnetskog polja



Slika 28. Konfiguracija korištena za mjerenje električnog polja

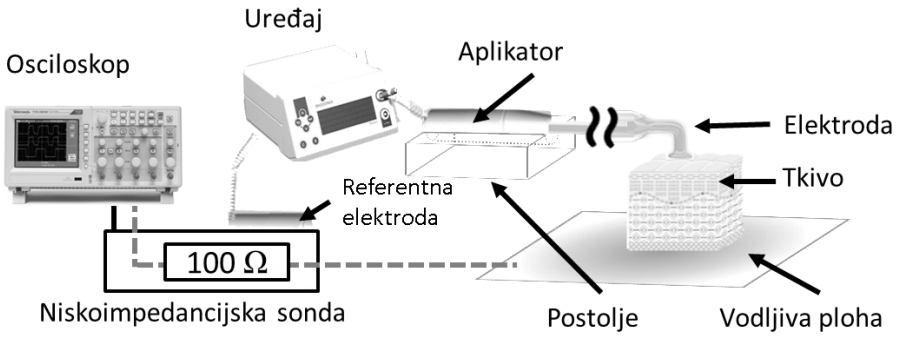
Za mjerenje magnetskog polja (frekvencija i jakost magnetskog polja te gustoća magnetskog toka) korištena je antena u obliku petlje (engl. *loop antenna*) (slika 27 desno) izrađena od žice promjera 1,291 mm (AWG 16) tako da s horizontalnom ravninom vodljive plohe zatvara površinu od 245 mm^2 (slika 29) (225). Antena je pomoću BNC-konektora ugrađena u vodljivu plohu i povezana s osciloskopom WaveRunner 640Zi. Antena je izravno priključena na visokoohmski (1 MΩ || 17 pF) ulaz osciloskopa (226). Vodljiva ploha (dvostrani vitroplast, dimenzija 1 × 1 m i debljine 1,6 mm) je povezana s masom osciloskopa. Tijekom mjerenja referentna elektroda VFOG-a postavljena je na vodljivu plohu. Aplikator s elektrodom je učvršćen na postolje od ekstrudiranog polistirena. Korištena konfiguracija prikazana je na slici 29. U svrhu mjerenja magnetskog polja pri kontaktnom izboju korišteni su uzorci svinjske kože (100 × 50 mm, debljine 4 mm) koji su učvršćeni na vodljivu plohu uz pomoć samoljepljive trake.



Slika 29. Konfiguracija korištena u mjerenjima magnetskog polja

Za obradu zabilježenih valnih oblika napona izmjerenih na antenama za mjerenje električnog i magnetskog polja te procjenu njihove jakosti korišten je program Matlab R2015b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

Za mjerenje napona i procjenu efektivnih vrijednosti napona i struje kroz tkivo korišten je osciloskop Tektronix TPS2024 (Tektronix, Inc., Beaverton, USA) na koji je spojena, u tu svrhu posebno izrađena, elektrostatski oklopljena niskoimpedancijska sonda (R_{ul}= 100 Ω). Konfiguracija korištena za mjerenje efektivnih struja kroz tkivo prikazana je na slici 30. Sonda je pomoću konektora povezana s vodljivom plohom (dimenzija 200 × 70 × 3 mm) na koju je postavljen uzorak tkiva. Uzorci tkiva izrađeni su od kože i potkožnog tkiva svinjske potrbušnice (dimenzije: 150 × 50 × 40 mm). Tijekom mjerenja referentna elektroda VFOG-a postavljena je na oklop sonde. Aplikator s elektrodom je učvršćen na postolje od ekstrudiranog polistirena. Podaci zabilježeni na osciloskopu obrađeni su u programu MS Excel 2010 (Microsoft Corp., Washington, USA).

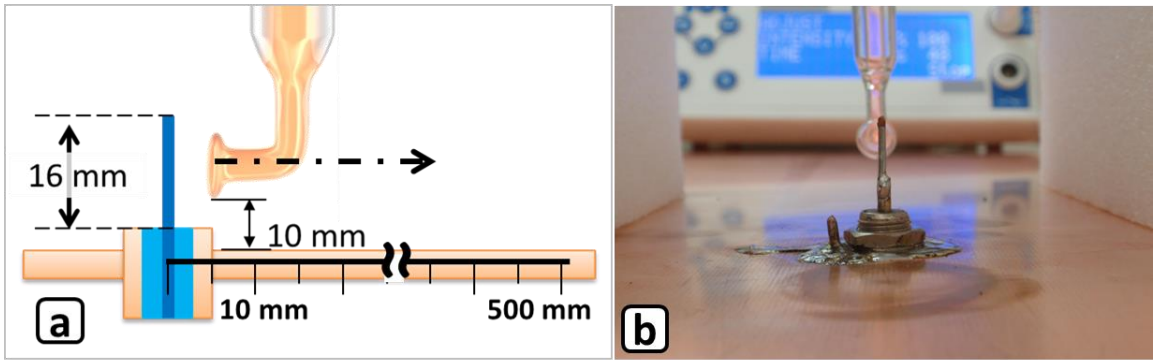


Slika 30. Konfiguracija korištena za mjerenje efektivnih struja kroz tkivo

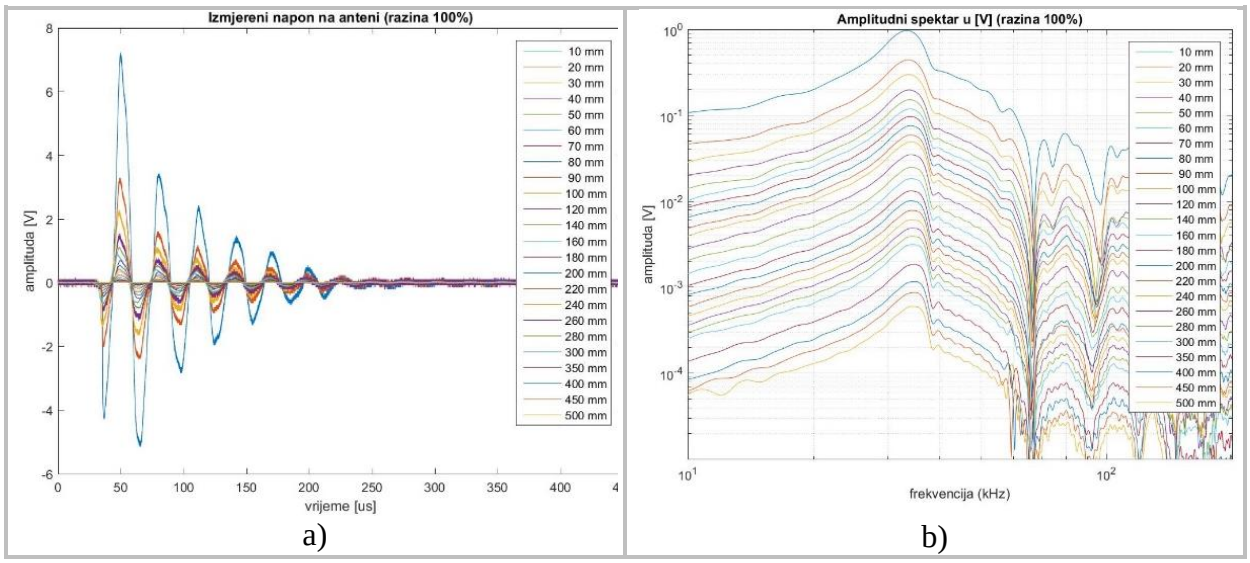
3.3.2 Mjerni postupci

3.3.2.1 Mjerenje električnog polja

Mjerenja električnog polja su provedena uz stalni vertikalni razmak elektrode od vodljive plohe od 10 mm. Horizontalni razmak između plazma-elektrode i antene mijenjao se u rasponu od 10 do 100 mm u koracima od 10 mm, od 100 do 300 mm u koracima od 20 mm te od 300 do 500 mm u koracima od 50 mm. Na svakoj udaljenosti izmjereni su valni oblici napona za promjenu izlaznog intenziteta od 10 do 100% u koracima od 10% Na slici 31 prikazani su međusobni odnosi aktivne plazma-elektrode, antene i vodljive plohe.



Slika 31. Mjerenje električnog polja: a) međusobni odnosi elektrode, antene i vodljive plohe te horizontalne udaljenosti na kojima su mjerene vrijednosti napona na anteni; b) aktivna plazma-elektroda i antena za mjerenje električnog polja ugrađena u vodljivu plohu



Slika 32. Mjerenje električnog polja: a) valni oblik napona izmjerenog na monopol anteni, b) amplitudni spektar napona izmjerenog na monopol anteni

Podaci o valnim oblicima napona zabilježeni osciloskopom učitani su u Matlab R2015b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) u kojem su razvijene skripte za računanje spektra signala i jakost električnog polja. Na slici 32a prikazan je valni oblik napona zabilježen u namještenoj izlaznoj razini VFGO-a na 100% i uz promjenu udaljenosti od antene od 10 do 500 mm, dok je na slici 32b prikazan amplitudni spektar tog signala.

Napon na stezaljkama otvorene antene (U_p) jednak je umnošku jakosti električnog polja E na mjestu prijema (ako je antena paralelna s vektorom električnog polja) i efektivne duljine (tj. visine) antene l_{ef} (225):

$$U_p = E \cdot l_{ef} \tag{6}$$

Efektivna duljina dipola računa se prema izrazu:

$$l_{ef} = \frac{l(\Omega - 1)}{4(\Omega - 2 - \ln 4)} \tag{7}$$

Pri čemu je l = 32 mm fizička duljina dipola (duljina unipola je 16 mm) dok se Ω računa prema izrazu:

$$\Omega = 2 \cdot \ln \frac{l}{a} = 2 \cdot \ln \frac{32}{0{,}6455} = 7{,}81 \tag{8}$$

U gornjem izrazu je a = 0,6455 mm polumjer žice od koje je načinjena antena. Kada vrijednost za Ω uvrstimo u izraz za l_{ef}, dobivamo:

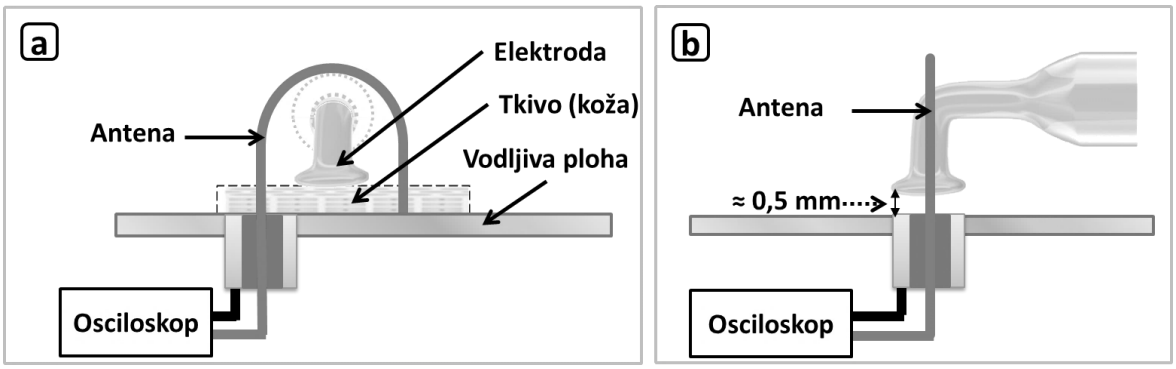
$$l_{ef} = \frac{32 \cdot (7{,}81 - 1)}{4 \cdot (7{,}81 - 2 - \ln 4)} = 12{,}32\,\text{mm} \tag{9}$$

Na primjer, uz izlaznu razinu namještenu na 100% i uz udaljenost aktivne plazma-elektrode od antene 10 mm izmjeren je napon U_p = 7,2 V. Uvrštavanjem u izraz za jakost električnog polja dobivamo:

$$E = \frac{U_p}{l_{ef}} = \frac{7{,}2}{12{,}32 \cdot 10^{-3}} = 586\,\text{V/m} \tag{10}$$

3.3.2.2 Mjerenje magnetskog polja

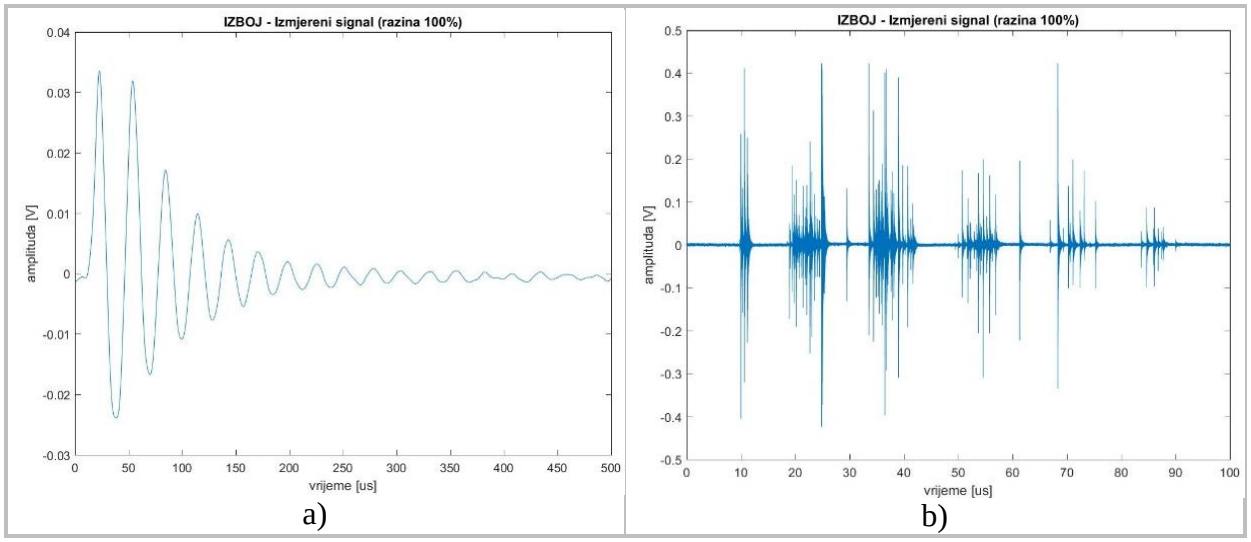
Mjerenja magnetskog polja provedena su za intenzitete od 10 do 100% u koracima od 10% pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak. Pritom je na osciloskopu bilježen napon koji se inducira na *loop* anteni. Horizontalni razmak između osi koja prolazi okomito kroz središte kruga koji opisuje površina elektrode i ravnine koju zatvara *loop* antena bio je 0 mm. Na slici 33 prikazani su međusobni odnosi aktivne plazma-elektrode, antene, ispitnog uzorka kože i vodljive plohe.



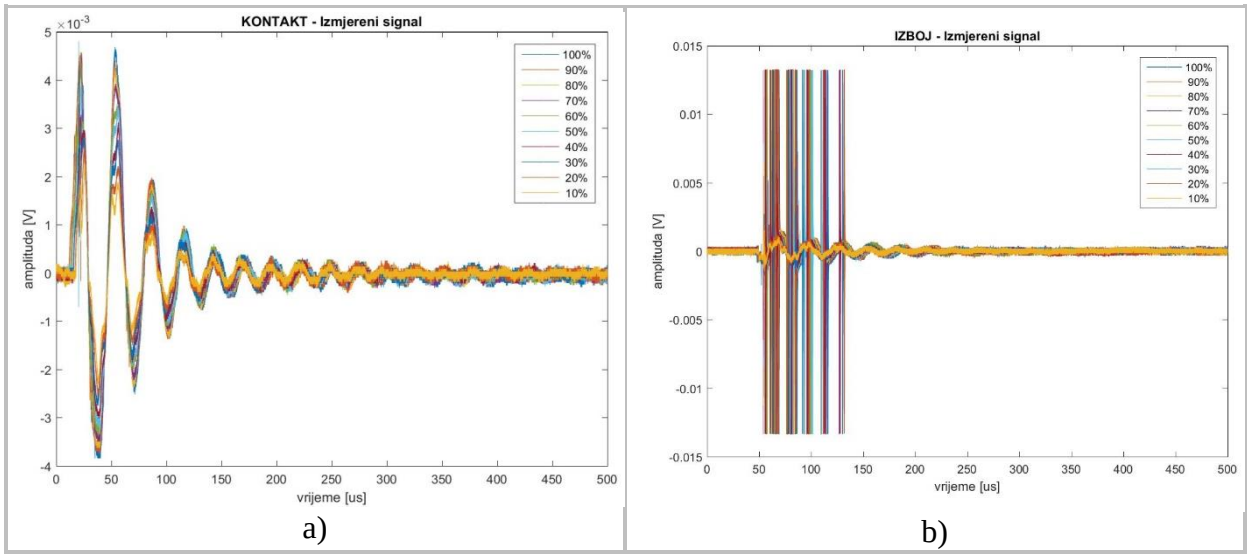
Slika 33. Odnosi aktivne plazma-elektrode i antene pri mjerenju magnetskog polja tijekom: a) kontaktnog izboja na uzorku tkiva i b) izboja kroz zrak na vodljivu plohu

U mjerenjima magnetskog polja pri kontaktnom izboju korišteni su uzorci tkiva (svinjske kože) koji su pričvršćeni na vodljivu plohu samoljepljivom trakom (slika 33a). Uzorci kože korišteni su radi što vjernije simulacije kontakta između elektrode i tkiva koju, zbog blago konveksne površine elektrode, nije moguće ostvariti na krutoj površini vodljive plohe. Mjerenje magnetskog polja pri izboju kroz zrak provedeno je uz vertikalnu udaljenost elektrode od vodljive plohe pri kojoj se uz najmanji izlazni intenzitet (10%) javljaju izboji (≈ 0,5 mm).

U preliminarnim mjerenjima uočena su dva frekvencijska područja u kojima se bilježe signali. Prvo je frekvencijsko područje oko 33 kHz (slika 34a) koje je prisutno u oba modaliteta primjene dok se prilikom izboja kroz zrak bilježi i signal frekvencije oko 41 MHz (slika 34b). Na slici 35 su prikazani valni oblici napona zabilježeni na osciloskopu prilikom kontaktnog izboja (signal isključivo u području oko 33 kHz) te izboja kroz zrak (prilikom kojeg se uz osnovni signal javlja signal u frekvencijskom području oko 41 MHz).



Slika 34. Prikaz valnih oblika napona koji se bilježe prilikom pojave mikroizboja: a) signal frekvencije 31 kHz (filtriran niskopropusnim filtrom 100 kHz), b) signal izboja u području 41 MHz



Slika 35. Prikaz valnih oblika napona zabilježenih prilikom mjerenja magnetskog polja elektrode u *loop* anteni pri: a) kontaktnom izboju i b) izboju kroz zrak

Podaci o valnim oblicima napona zabilježeni osciloskopom učitani su u Matlab R2015b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) u kojem su razvijene skripte za procjenu maksimuma amplitudnog spektra te računanje jakosti magnetskog polja i gustoće magnetskog toka za pojedine frekvencijske komponente. Ovako dobiveni rezultati korišteni su za računanje jakosti magnetskog polja (H) prema sljedećim izrazima.

Napon U izmjeren na *loop* anteni određen je izrazom:

$$U = \mu_0 \cdot \omega \cdot S \cdot H_M \tag{11}$$

pri čemu je $\mu_0 = 4\pi 10^{-7}$ H/m apsolutna permeabilnost, $\omega = 2\pi f$ kružna frekvencija, S površina *loop* antene, a H_M maksimalni iznos jakosti magnetskog polja (H).

Iz amplitude spektra U_i na frekvenciji f_i jakost magnetskog polja (ili H-polje) H_{Mi} računa se kao (76):

$$H_{Mi} = \frac{U_i}{\mu_0 \cdot 2 \cdot \pi \cdot f_i \cdot S \cdot} \tag{12}$$

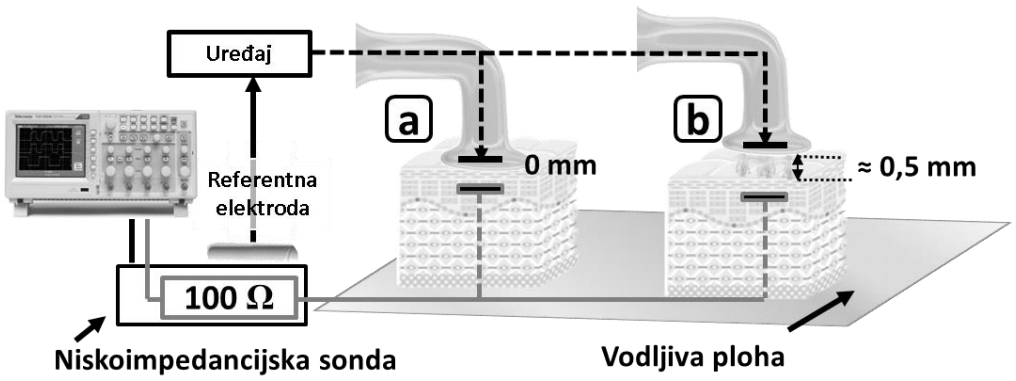
Iz maksimalne jakosti magnetskog polja H_{Mi} (A/m) vrijednost gustoće magnetskog toka koja se u literaturi naziva i B poljem, a u čast Nikole Tesle izražava se jedinicom Tesla (T), izračunata je prema izrazu (76):

$$B = \mu_0 H_{Mi} \tag{13}$$

3.3.2.3 Mjerenje efektivnog napona i struje na uzorku tkiva

Efektivna vrijednost napona i struje kvantitativno povezuje amplitudu i oblik izmjeničnog napona tj. struje s veličinom rada i snage u električnim strujnim krugovima. Pri prolasku izmjenične struje kroz otpor stvara se pad napona na otporu koji se mijenja u vremenu. Efektivna vrijednost (eng. RMS – *root mean square*) je konzistentan i standardiziran način izražavanja izmjeničnih napona koji ne ovisi o obliku signala. Efektivna vrijednost izmjeničnog napona vezana je uz energetski učinak (toplinski, mehanički, kemijski) koji taj napon proizvede na otporniku. Tako će izmjenični napon efektivne vrijednosti U_{ef}, neovisno o svom obliku, proizvesti isti energetski učinak na nekom otporu kao i istosmjerni napon te iste vrijednosti (227).

Vrijednosti efektivnog napona korištene su za računanja efektivne struje kroz tkivo kao funkcije intenziteta (10% do 100% u koracima od 10%) pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak uz razmak (≈ 0,5 mm) elektrode od površine tkiva. Korištena konfiguracija prikazana je na slici 36. Elektrostatski oklopljena niskoimpedancijska sonda (R_{ul} = 100 Ω) je preko vodljive metalne plohe povezana s tkivom na koje se primjenjuje aktivna plazma-elektroda, a preko oklopa je povezana s elektrodom uzemljenja. Na taj način je tok struje kroz mjerni krug bio kontroliran i poznat.



Slika 36. Konfiguracija korištena za mjerenje efektivnog napona i struja u tkivu pri: a) kontaktnom izboju i b) izboju kroz zrak

Korišteni otpornik (100 Ω) odabran je zbog dva razloga. Njegova vrijednost daje u isto vrijeme dovoljno malu grešku mjerenja uz dovoljno veliki pad napona koji se jednostavno može izmjeriti pomoću osciloskopa, a k tome je jednaka iznosu impedancije volumena tijela (115,116). Stoga se može pretpostaviti da je energija predana mjernom otporniku po iznosu

jednaka onoj koja je predana volumenu tijela. Na ovaj su način, s obzirom na relativno nisku vrijednost korištenog otpora, ujedno zabilježene maksimalne vrijednosti struja koje mogu prolaziti tkivom.

Zabilježeni valni oblici i vrijednosti efektivnog napona korišteni su za računanje efektivnih vrijednosti prolaska struja kroz tkivo prema izrazu (76):

$$I_{ef} = \frac{U_{ef}}{R_{ul}} \tag{13}$$

gdje je I_{ef} efektivna struja, U_{ef} efektivni napon, a R_{ul} otpor otpornika korištenog u elektrostatski oklopljenoj niskoimpedancijskoj sondi (R_{ul}= 100 Ω).

Na osnovu dobivenih vrijednosti efektivne struje (I_{ef}) kroz tkivo procijenjene su vrijednosti gustoće struje (J) s obzirom na aktivnu površinu plazma-elektrode ($A \approx 50\ \mathrm{mm}^2$) koje su računate prema izrazu (76):

$$J = \frac{I_{ef}}{A} \tag{14}$$

Prolaskom kroz materijale električna struja uzrokuje toplinski učinak, odnosno zagrijava materijal kroz koji prolazi. Isto tako, ona može uzrokovati i magnetski, kemijski ili mehanički učinak. Taj će učinak biti to jači što je veći umnožak jakosti struje i napona koji je tu struju protjerao kroz strujni krug. Ovaj se umnožak stoga zove snaga ili električni učinak električne struje. Snaga se izražava jedinicom W (vat) ili VA (voltamper). Snaga (P) koja definira brzinu prijenosa, odnosno pretvorbe energije računata je prema izrazu (76):

$$P = I_{ef} \times U_{ef} \tag{15}$$

Ukupan izvršen rad tj. energija predana električnim nabojima proteklim kroz otpornik razmjeran je iznosu napona, tj. padu napona na otporniku, iznosu struje kroz otpornik (100 Ω) i vremena u kojem je tekla električna struja. Rad tj. količina prenesene energije (E) kroz otpor u vremenu računata je prema izrazu (76):

$$E = I_{ef} \times U_{ef} \times t = I^2 \times R \times t \tag{16}$$

gdje su za vrijeme izloženosti (t) uzete vrijednosti od 30, 60, 90 i 120 sekundi.

3.4 Mjerenje temperaturnih promjena na površini uzroka tkiva

Infracrvena termografija provedena je u svrhu mjerenja promjene temperature na površini uzorka tkiva (ΔT) kao funkcije odabranog intenziteta (20, 40, 60, 80 i 100%), trajanja zahvata (30, 60, 90 i 120 sekundi) te modaliteta primjene elektrode (kontaktni izboj i izboj kroz zrak).

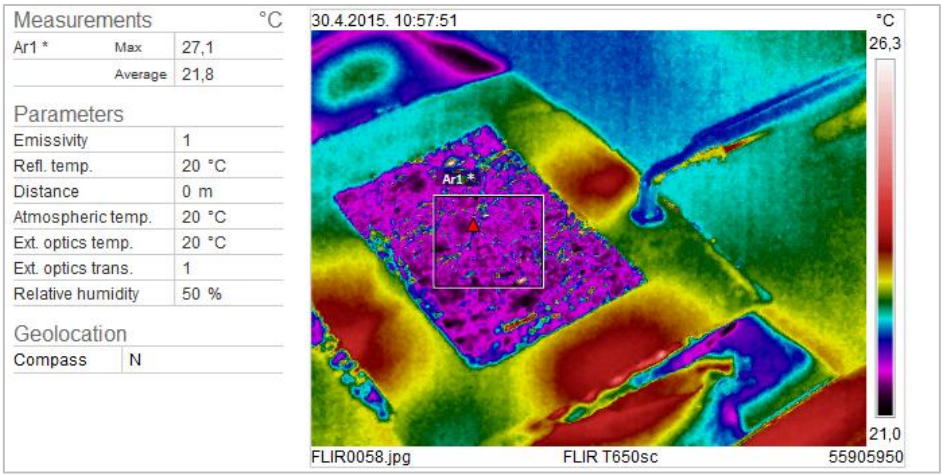
3.4.1 Materijali

U mjerenjima je korištena infracrvena termografska kamera FLIR T650sc (FLIR Systems, Wilsonville,USA) čiju je uporabu omogućila tvrtka MKP d.o.o. iz Zagreba. Mjerni opseg kamere korišten u mjerenjima iznosi 233,15 K do 423,15 K (-40 do 150°C). Broj peltierom hlađenih bolometara na osjetilu iznosio je 307.200 (u mreži 640 x 480). Rezolucija jednog bolometra je < 20 mK, a mjerna nesigurnost ± 1 K. Minimalna žarišna daljina kamere iznosi 0,25 m. S mjernim instrumentom je korištena leća koja propušta zračenje u području od 7,5 do 14 μm, a u kojem su prisutni maksimumi snage zračenja za temperature oko 300 K (228).

Kamera je povezana s računalom koje je opremljeno programom FLIR ResearchIR (FLIR Systems, Wilsonville, USA). Navedeni program je korišten za bilježenje, pohranu i analizu snimaka. Za obradu podataka korišteni su programi Matlab R2015b (The MathWorks Inc., Natic, USA) i MS Excel 2010 (Microsoft Corp., Washington, USA).

Vrijednosti temperature prostora i relativna vlažnost zraka praćene su kontinuirano tijekom svih mjerenja uređajem Kestrel 4200 (Nielsen-Kellerman Co., Boothwyn, USA). Reflektirana temperatura određena je prosječnom vrijednošću temperature na površini objekta (aluminijska folija) koji u infracrvenom spektru zrači difuzno na mjestu mjerenja (slika 37).

Podaci o temperaturi prostora i relativnoj vlažnosti zraka su, zajedno s kompenzacijskim parametrima o emisivnosti tkivnog uzorka (kože) i reflektiranoj temperaturi, unošeni u postavke kamere te su uzeti u obzir prilikom analize snimaka u programu FLIR Research IR.



Slika 37. Prikaz određivanja reflektirane temperature određivanjem prosječne vrijednosti temperature na površini objekta koji u infracrvenom spektru zrači difuzno (aluminijska folija)

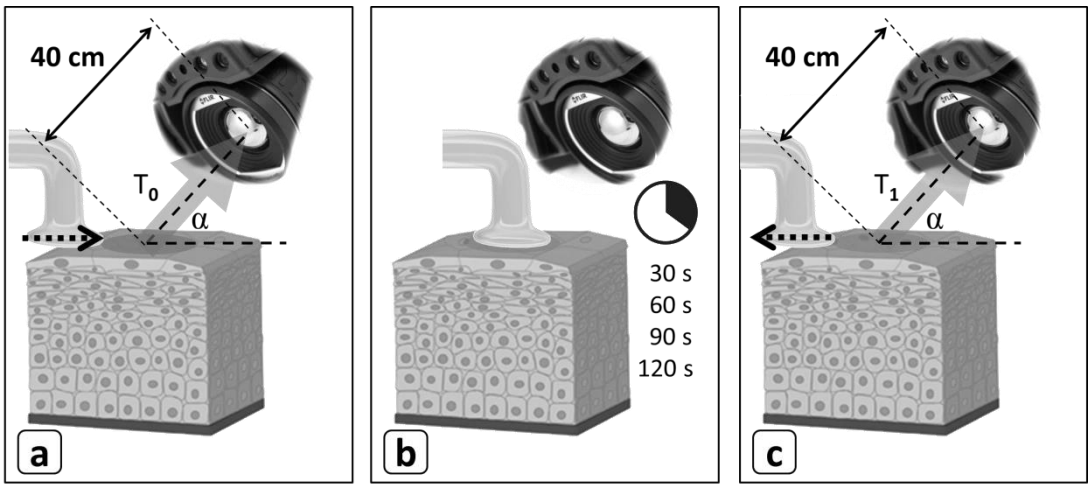
Tkivni uzorci korišteni u ispitivanjima izrađeni su od kože i potkožnog tkiva svinjske potrbušnice (dimenzija 150 x 50 x 40 mm). Postolje na koje je učvršćen aplikator s elektrodom izrađeno je od ekstrudiranog polistirena. Podatak o emisivnosti svinjske kože bez krvne perfuzije (0,98) preuzet je iz rada Soerensena i suradnika (229).

3.4.2 Mjerni postupak

U preliminarnim ispitivanjima definiran je najveći raspon u promjeni temperature (oko 12°C iznad početne temperature tkiva), te je na kameri određeno mjerno područje od -40 do 150°C. Mjerna nesigurnost uređaja u mjernom području od -40 do 150°C iznosi 1°C, dok se u kalibracijskom izvješću uređaja korištenog u ispitivanjima za područje od 24 do 55°C navodi razlika od 0,2°C između izmjerene i stvarne temperature (230).

Ispitivanja su provedena za dva modaliteta primjene: kontaktni izboj i izboj kroz zrak. Pri kontaktnom izboju aktivna površina elektrode je postavljena izravno na površinu kože uzorka tkiva, dok je pri izboju kroz zrak udaljenost aktivne površine elektrode i referentne ravnine (površine tkiva) određena udaljenošću pri kojoj i pri najmanjem intenzitetu (20%) dolazi do pojave izboja kroz zrak (≈ 0,5 mm). Mjerenja su provedena za pojedine intenzitete (20, 40, 60, 80 i 100%) pri različitim vremenskim intervalima izlaganja tkiva djelovanju elektrode (30, 60, 90 i 120 sekundi).

Udaljenost između leće termografske kamere i ciljne površine iznosila je 40 cm, a kut (α) između referentne ravnine (površine tkiva) i upada infracrvenih zraka u termografsku kameru iznosio je od 40 do 50 stupnjeva (Slika 38).

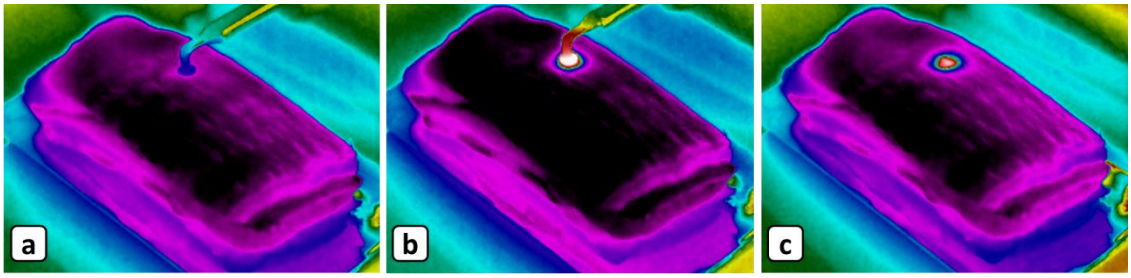


Slika 38. Shematski prikaz konfiguracije korištene za snimanje temperature ciljne površine:
a) izrada termografskog snimka ciljne površine neposredno prije zahvata (T_0),
b) provođenje zahvata u trajanju od 30, 60, 90 ili 120 sekundi,
c) izrada termografskog snimka neposredno nakon zahvata (T_1)

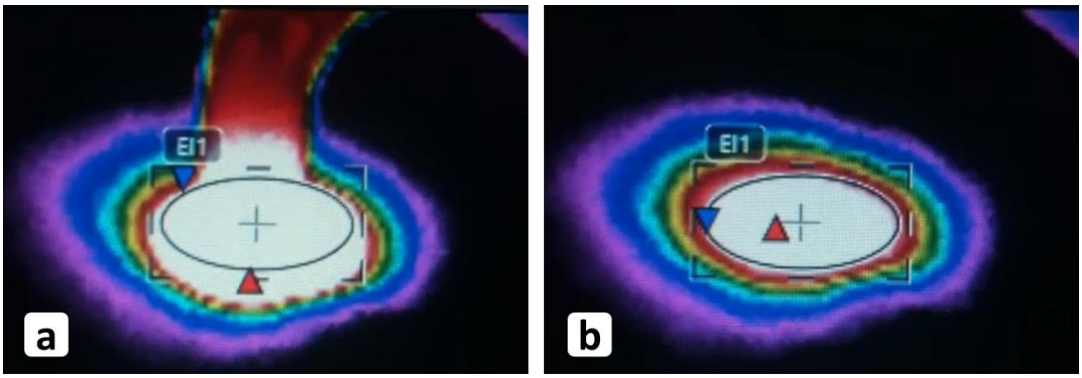
Kako bi se mogla procijeniti razlika između početne i krajnje temperature tkiva za svaki pojedini intenzitet i vrijeme djelovanja, zabilježena su dva snimka: i) snimak ciljne površine neposredno prije zahvata te ii) snimak ciljne površine tkiva neposredno nakon zahvata (slika 39).

Program FLIR ResearchIR je korišten u svrhu obrade snimaka te definiranja (manualnog ucrtavanja granica) ciljne površine na svakom pojedinačnom snimku. Na slici 40 prikazan je primjer određivanja površine na snimku pomoću alata u programu FLIR ResearchIR. Ciljna površina tkiva definirana je površinom na tkivu koje se tijekom terapijskog zahvata nalazilo neposredno ispod aktivne površine plazma-elektrode (≈ 50 mm^2). Na taj je način definiran skup podataka tj. bolometara čiji se podaci o temperaturi uzimaju u obzir prilikom određivanja srednje vrijednosti temperature ciljne površine. Prosječan broj uzoraka unutar skupa za pojedinačnu snimku iznosio je 200 (4 bolometra po mm^2). U svrhu obrade relativno velikog broja uzoraka (200 uzoraka × dva snimka × 5 intenziteta × 4 vremenska intervala × dva modaliteta primjene = 16.000) u programu Matlab R2010b je razvijena skripta za obradu uzoraka i računanje srednjih vrijednosti i standardnih devijacija početne (T_0) i krajnje

temperature (T_1) te njihove razlike tj. srednje vrijednosti povećanja temperature tkiva ($\Delta T = T_1 - T_0$) za svaki pojedinačni intenzitet (20, 40, 60, 80 i 100%) i trajanje zahvata (30, 60, 90 i 120 sekundi). Ovako dobiveni rezultati za slučaj kontaktnog izboja te izboja kroz zrak, s obzirom na mjernu nesigurnost uređaja od 0,2°C u mjernom području od 24 do 55°C, zaokruženi su na prvu decimalu te su prikazani tablično i grafički.



Slika 39. Infracrveni termografski snimci:
a) snimak elektrode i tkiva prije provedbe zahvata,
b) snimak izveden tijekom zahvata pri kontaktnom izboju,
b) snimak neposredno nakon uklanjanja elektrode s površine tkiva



Slika 40. Analiza termografskih snimaka:
a) provedba zahvata, b) analiza snimka i određivanje ciljne površine (*El*1) koja se nalazila neposredno ispod aktivne površine elektrode tijekom zahvata

Vrsta izboja, temperatura, jakost magnetskog polja, efektivne vrijednosti struje te predane energije čije su veličine zabilježene u terapijskom polju, a koje čine osnovne varijable ovog istraživanja testirane su na normalnost razdioba Kolmogorov-Smirnovljevim testom te opisane parametrima lokacije (aritmetička sredina) i disperzije (standardna devijacija i koeficijent varijacije) (231). Razlike među vrstama izboja (kontaktni izboj i izboj kroz zrak) testirane su t-testom za nezavisne uzorke. Statistička obrada podataka izvedena je uz pomoć programa MS Excel 2003 (Microsoft Corp., Washington, USA) i programom za statističke analize Statistica 10 (StatSoft, Inc. Tulsa, USA). Statistička pogreška je uobičajenih 5% ($\alpha = 0{,}050$).

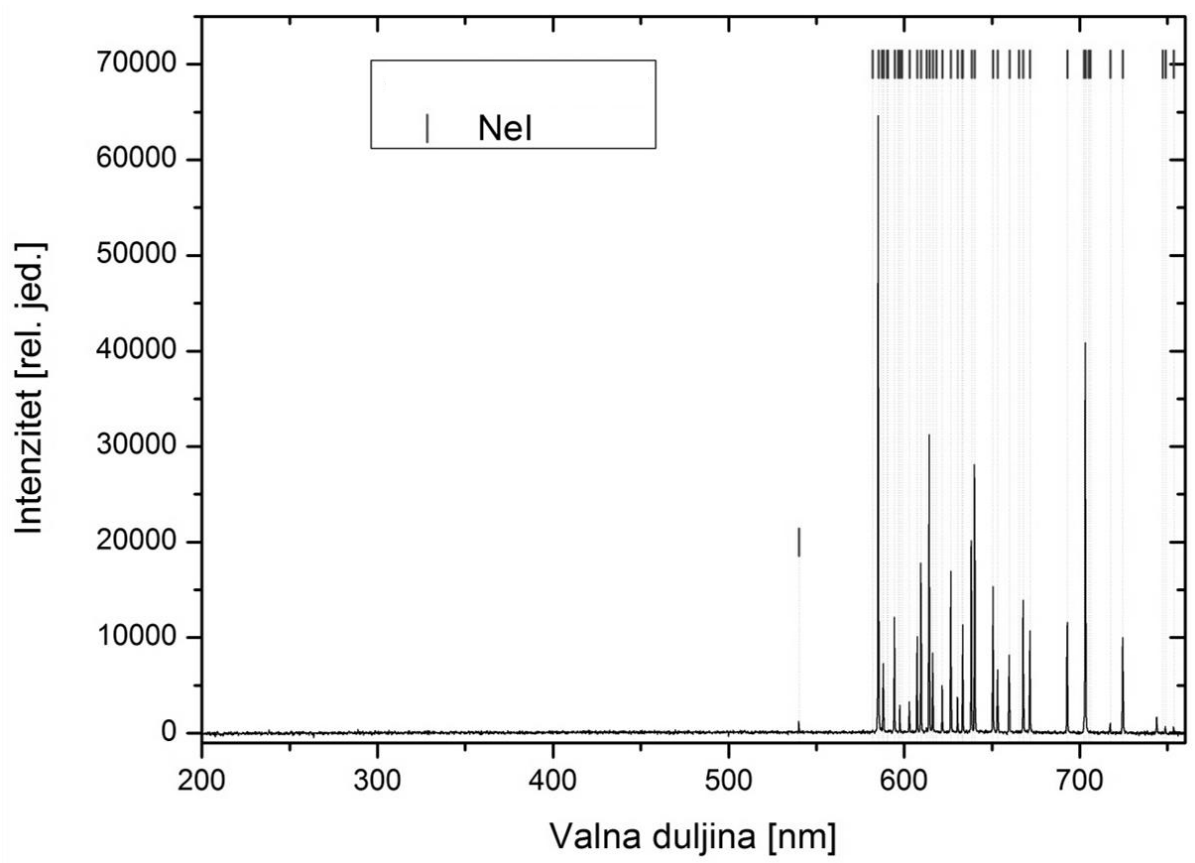
Struktura međusobnih odnosa varijabli istraživana je linearnim i kvadratnim regresijskim modelima s promjenom temperature i varijablama elektromagnetskih veličina, kao zavisnim varijablama (kriterijem) te intenzitetom i trajanjem zahvata kao nezavisnim varijablama (prediktorima) (231). U regresijskim modelima *konstanta a* pokazuje vrijednost zavisne varijable u slučaju kada je nezavisna varijabla jednaka nuli dok *regresijski koeficijent b* pokazuje za koliko se mijenja zavisna varijabla ako se nezavisna varijabla promijeni za jednu jedinicu (231). Regresijski modeli korišteni su u svrhu određivanja trendova kojima bi se pokušali opisati utjecaji intenziteta i trajanja zahvata na temperaturu površine tkiva i vrijednosti predane električne energije kao i njihov utjecaj na temperaturu tkiva. S obzirom na to da će u slučaju kada nezavisna varijabla (intenzitet i/ili vrijeme zahvata) iznosi nula i sve zavisne varijable iznositi nula, ovi su modeli, u pogledu predikcije, vrijedni isključivo u slučaju minimalne vrijednosti nezavisne varijable koja se približava nuli, tj. u ovom slučaju iznosi 1. U tom se slučaju predviđaju vrijednosti zavisnih varijabli koje bi, u terapijskom polju, bile prisutne pri odabranom intenzitetu 1% i/ili trajanju zahvata od 1 sekunde ili pak u slučaju kada bi zavisne varijable bile veće od njihovih maksimalnih vrijednosti (100% ili 120 sekundi). U pogledu odabranog intenziteta ovi slučajevi nisu praktično mogući dok u pogledu trajanja zahvata jesu. Rezultati linearnih i kvadratnih modela promjene temperature u zavisnosti o intenzitetu i trajanju zahvata za varijable predane električne energije prikazani su tablično i grafički.

4 REZULTATI

4.1 Emisijski spektri zabilježeni u terapijskom polju

4.1.1 Emisijski spektar elektrode

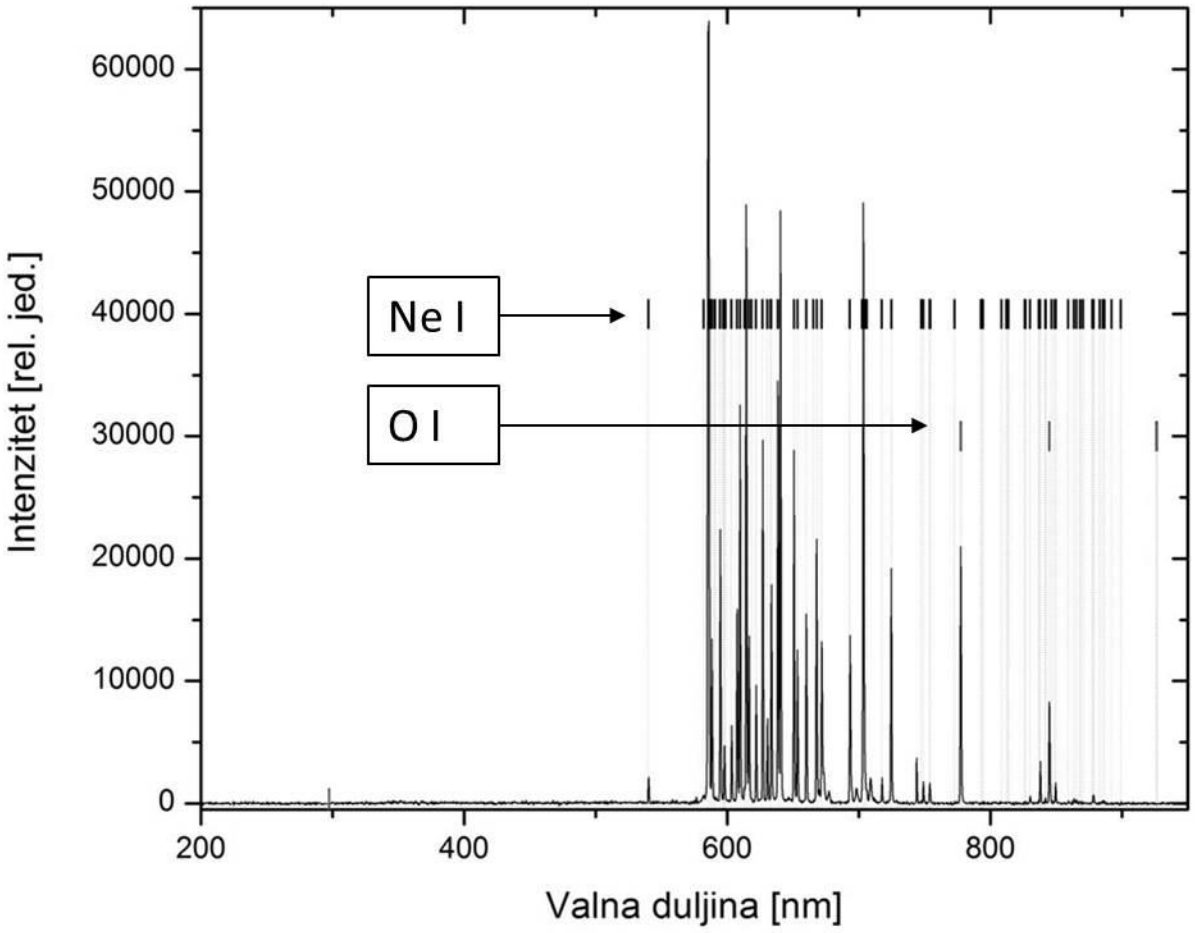
U optičkom području od 200 do 750 nm, u spektru aktivne plazma-elektrode, koji je mjeren izravno optičkim vlaknom usmjerenim u aktivnu elektrodu, zabilježene su isključivo atomske linije neona (Ne I) (slika 41). Glavni maksimumi vrpci atoma neona prikazani su u tablici 14. Spektralna simulacija spektra neona pokazala je ekscitacijsku temperaturu elektrona između 0,5 i 0,75 eV.



Slika 41. Emisijski spektar elektrode mjeren optičkim vlaknom izravno usmjerenim u aktivnu površinu elektrode bilježi isključivo atomske spektralne linije neona (optičko područje od 200 do 750 nm)

U optičkom području od 180 do 1100 nm uz spektar neona bilježe se linije neutralnog atoma kisika na 777 i 844 nm. Na slici 42 prikazane su spektralne linije zabilježene u području od 200 do 950 nm. U području iznad 950 nm ne bilježe se spektralne linije. Važnije valne duljine atomskih linija kisika (O I) prikazane su u tablici 14. Spektralna simulacija spektra atoma kisika pokazala je ekscitacijsku temperaturu elektrona oko 0,25 eV.

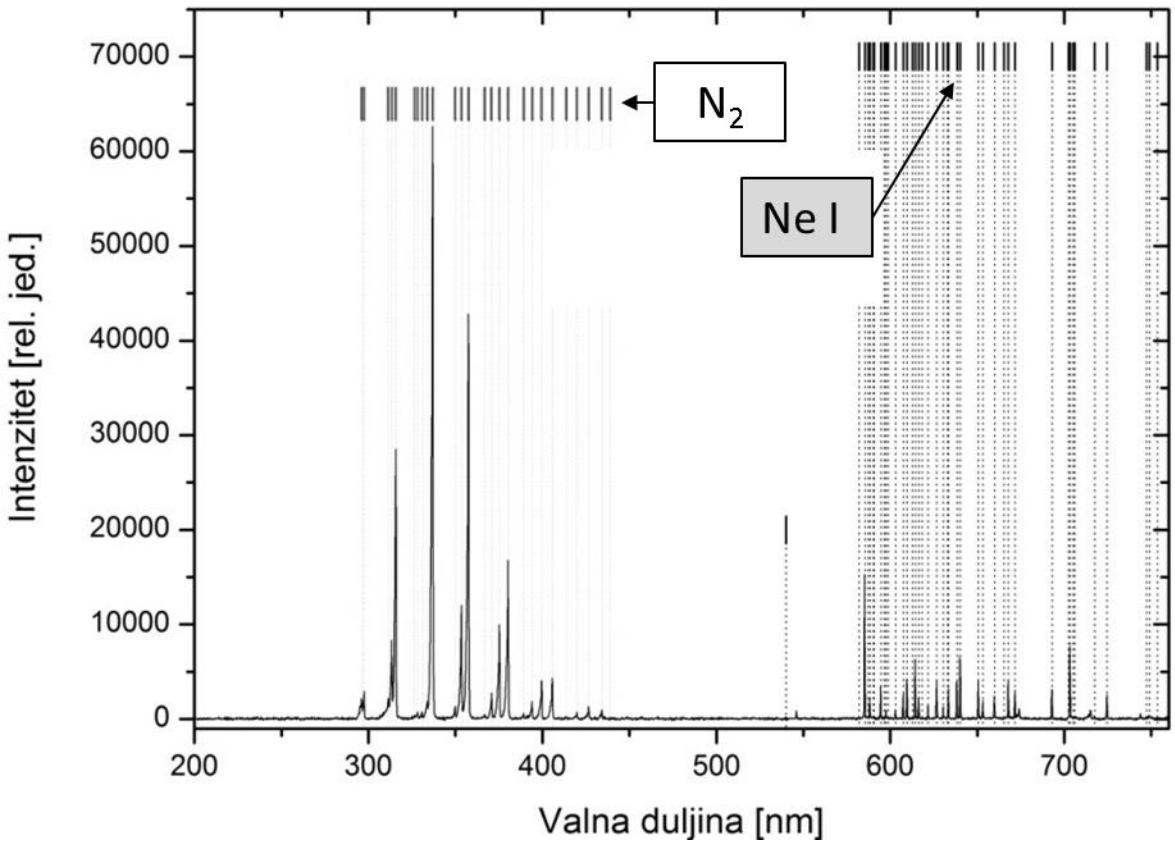
VB



Slika 42. Emisijski spektar elektrode mjeren optičkim vlaknom izravno usmjerenim u aktivnu površinu elektrode. Bilježe se atomske linije neona i linije atoma kisika (prikazano područje od 200 do 950 nm)

4.1.2 Emisijski spektar izboja kroz zrak

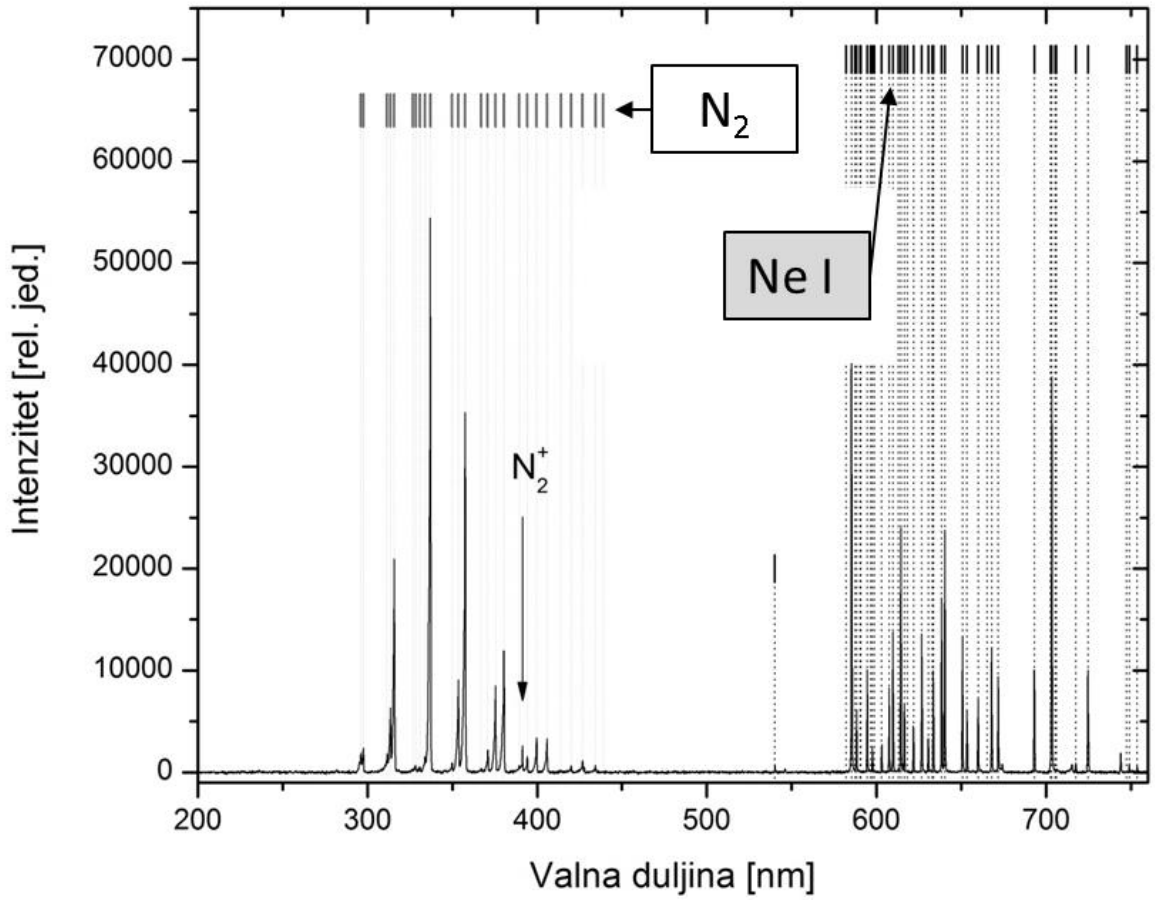
U mjernom postupku u kojem je optičko vlakno s lećom usmjereno u mikroizboje koji se javljaju u volumenu omeđenom aktivnom površinom plazma-elektrode i površinom tkiva dio svjetlosti koji se bilježi dolazi iz tog volumena, a dio iz elektrode. Na slici 43 prikazane su spektralne linije zabilježene u optičkom području od 200 od 750 nm. Spektralna analiza pokazala je prisutnost molekularnog spektra dušika (N_2) i atomskog spektra neona (Ne I).



Slika 43. Emisijski spektar zabilježen u volumenu koji je omeđen aktivnom površinom elektrode i površinom tkiva u kojem se javljaju mikroizboji gdje dio svjetlosti dolazi iz tog volumena a dio iz same elektrode (optičko područje od 200 do 750 nm)

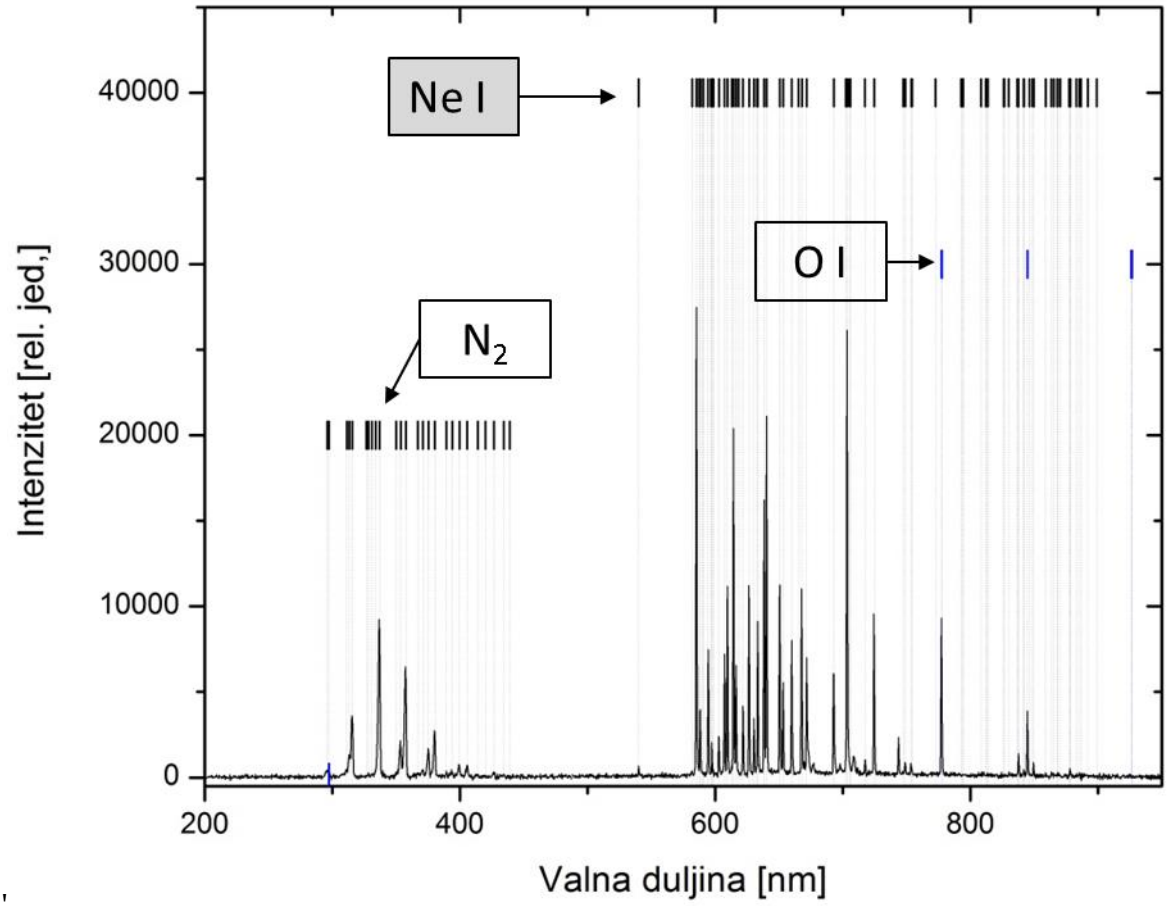
Kao dominantan identificiran je spektar neutralne dušikove molekule N_2, takozvane druge pozitivne vrpce u području od 200 do 450 nm. Glavni maksimumi vrpci neutralne molekule dušika prikazani su u tablici 14. Spektralna simulacija dušikovog spektra pokazala je ekscitacijsku temperaturu oko 3000 K (0,25 eV). Usporedba simulacija s eksperimentom dala je najbolje slaganje za rotacijsku temperaturu 300 K i vibracijsku temperaturu 3400 K.

U slučaju kad je na mjesto uzorka tkiva postavljena uzemljena žica male površine (0,8 mm^2), pri čemu dolazi do koncentracije mikroizboja u malom volumenu, u spektru dolazi do pojave glavne molekularne vrpce iona dušikove molekule (N_2^+) na 391 nm. Na slici 44 prikazane su spektralne linije zabilježene u optičkom području od 200 od 750 nm. Spektri drugih molekula koji bi se mogli očekivati u području 200 – 500 nm (NO, OH) nisu opaženi. Važnije spektralne linije iona dušikove molekule prikazane su u tablici 14.



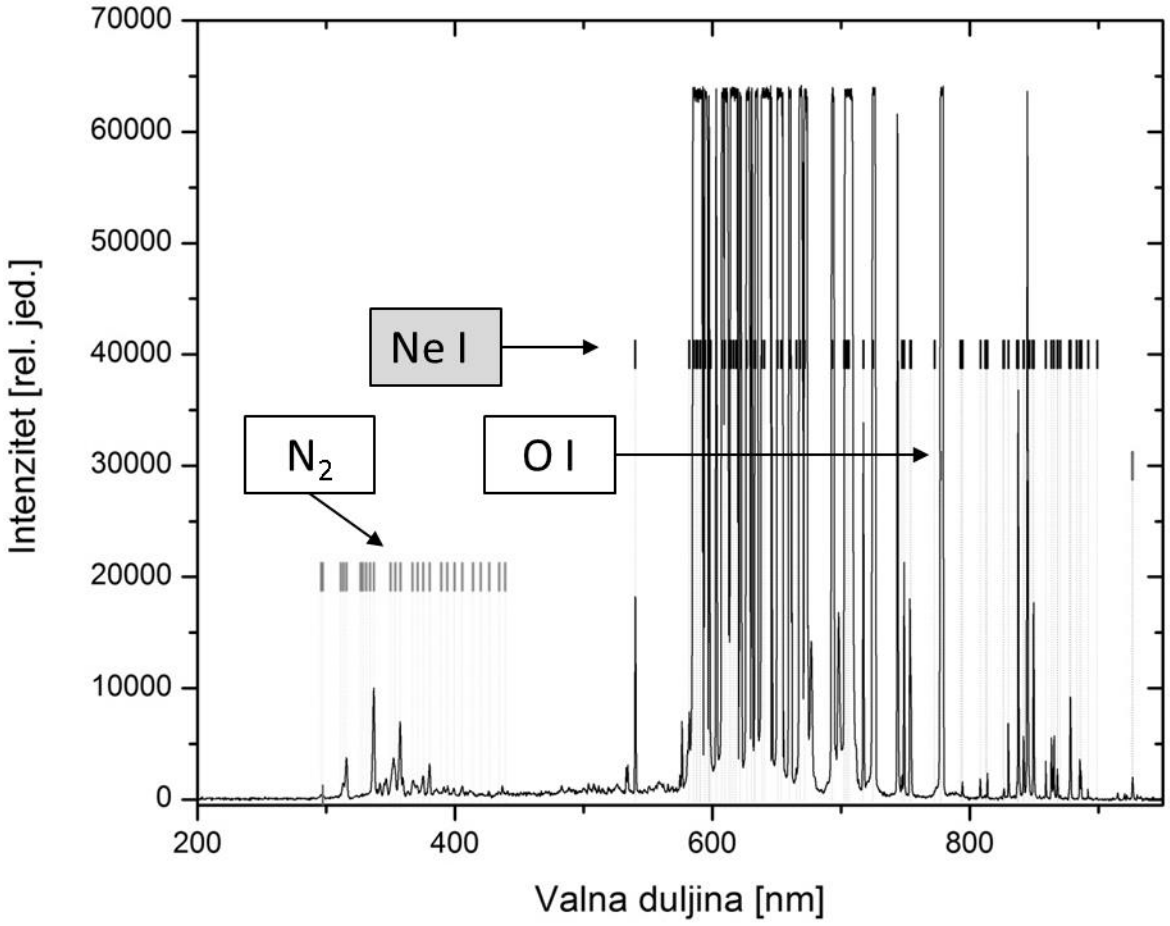
Slika 44. Emisijski spektar zabilježen prilikom izboja na malu površinu žice (površine 0,8 mm^2) u kojem se uz spektralne linije neutralnog atoma neona (Ne I) i molekule dušika (N_2) javlja i linija iona dušikove molekule (N_2^+)

U optičkom području od 180 do 1100 nm, uz atomske linije neona i molekularne linije dušika, bilježe se izražene linije neutralnog atoma kisika na 777 i 844 nm (slika 45). Važnije valne duljine atomskih linija kisika (O I) prikazane su u tablici 14. Spektralna simulacija spektra atoma kisika pokazala je ekscitacijsku temperaturu elektrona oko 3000 K (0,25 eV).



Slika 45. Spektar zabilježen pri izboju kroz zrak u volumenu koji je omeđen aktivnom površinom elektrode i površinom tkiva u kojem se, uz atomske linije neona i molekularne linije dušika, bilježe i izražene atomske linije kisika (O I) na 777 nm i 844 nm (prikazano područje od 200 do 950 nm)

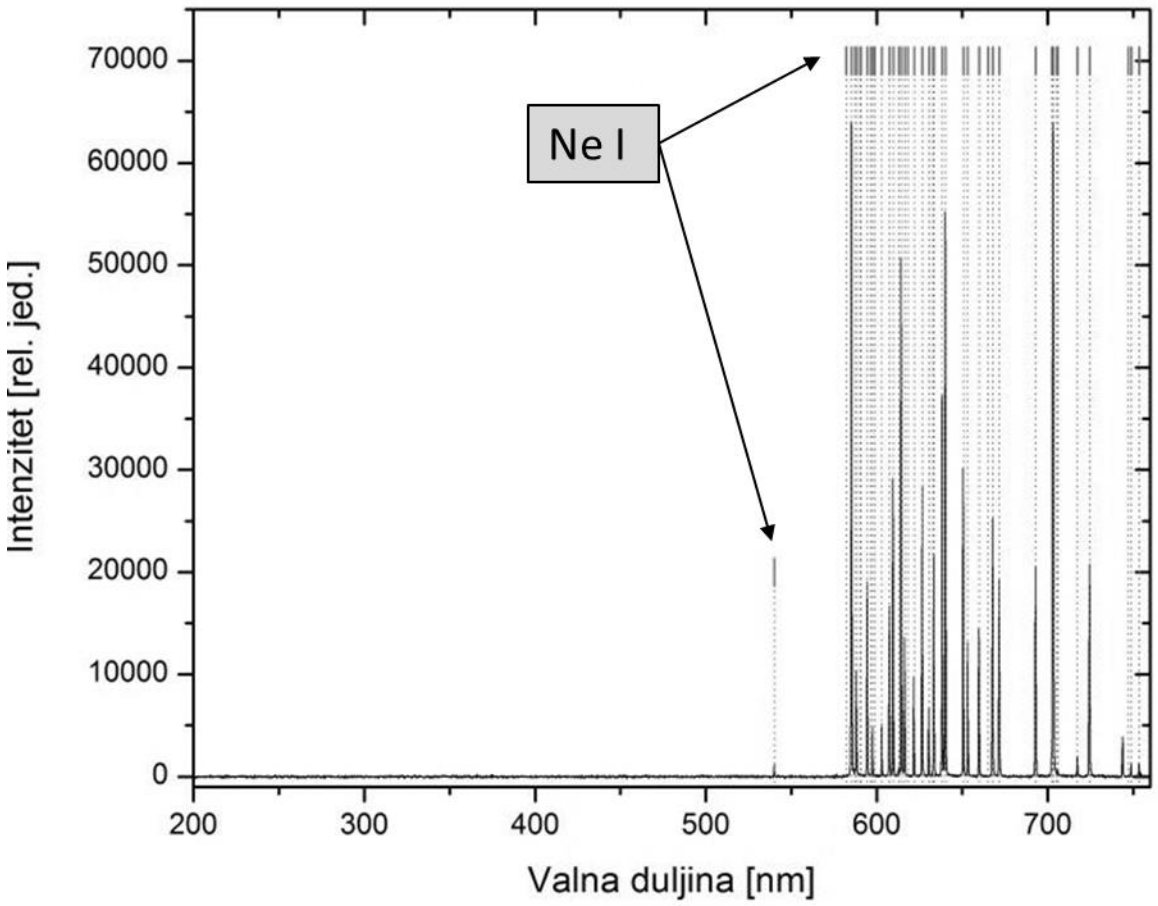
U slučaju kada je pri izboju kroz zrak na malu površinu žice optičko vlakno bilo usmjereno kroz volumen u neposrednoj blizini površine elektrode (zbog čega dolazi do saturacije određenih linija u spektru) bilježe se i dodatne atomske linije neona, kao i atoma kisika (na 926 nm). Na slici 46 prikazane su spektralne linije zabilježene u optičkom području od 200 do 950 nm. U području iznad 950 nm ne bilježe se spektralne linije.



Slika 46. Spektralne linije zabilježene u slučaju izboja kroz zrak na malu površinu žice gdje je optičko vlakno s lećom usmjereno uz samu površinu elektrode
zbog čega dolazi do zasićenja spektralnih linija neutralnog atoma neona (Ne I).
Tom prilikom bilježe se linije atoma kisika na 926 nm
(prikazano područje od 200 do 950 nm)

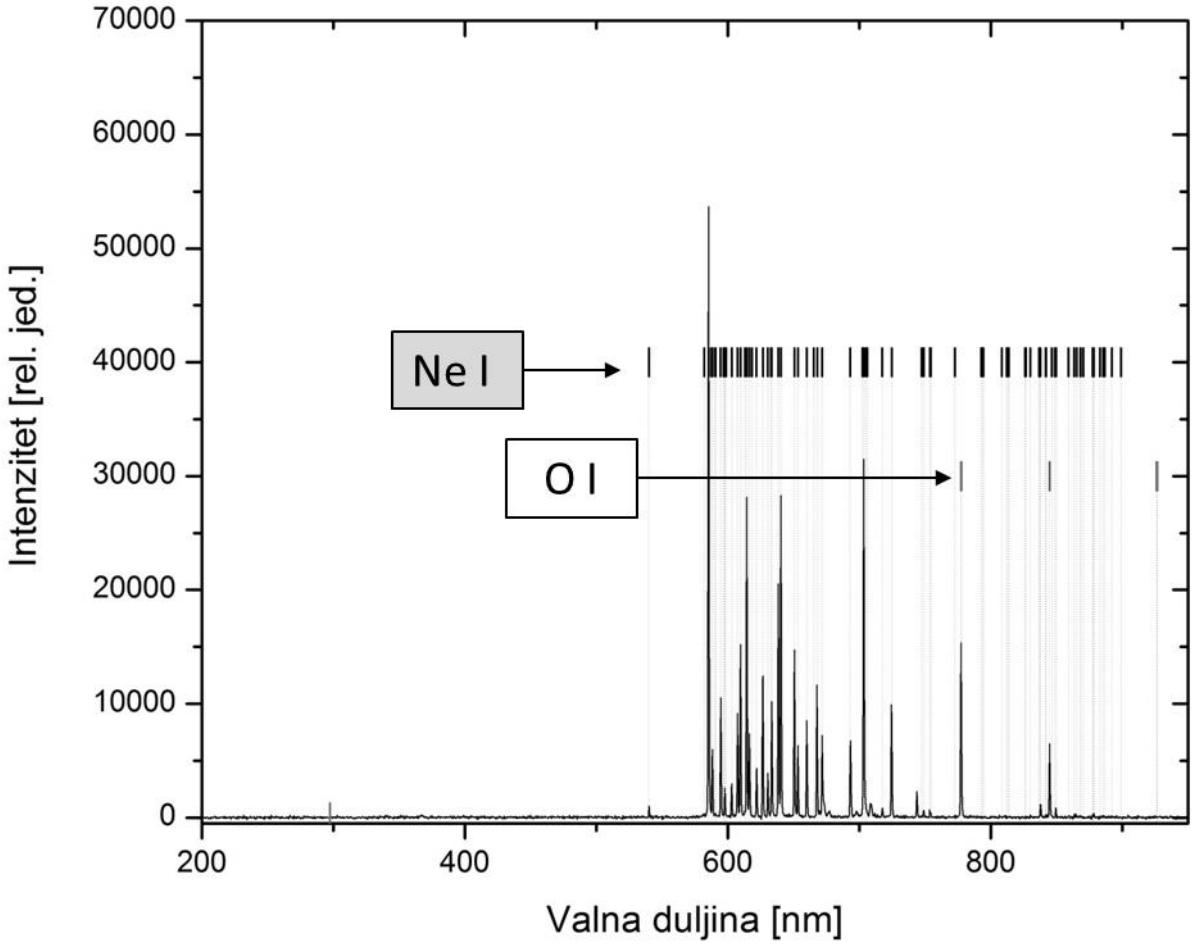
4.1.3 Emisijski spektar izboja kroz tekući medij na površini uzorka tkiva

U mjernom postupku u kojem je optičko vlakno s lećom usmjereno u volumen omeđen aktivnom površinom elektrode i površinom tkiva, koja je prethodno navlažena fiziološkom otopinom, bilježe se isključivo linije neutralnog atoma neona (Ne I). Na slici 47 prikazane su spektralne linije zabilježene u optičkom području 200 – 750 nm. Ne bilježe se spektralne linije koje su prisutne prilikom pojave mikroizboja



Slika 47. Atomske linije neona zabilježene pri kontaktnom izboju kroz tekući medij na površini uzorka tkiva (optičko područje od 200 do 750 nm). Ne bilježe se spektralne linije koje su prisutne prilikom pojave mikroizboja

U optičkom području 180 – 1100 uz atomske linije neona bilježe se i linije atoma kisika na 777 i 844 nm. Na slici 48 prikazane su spektralne linije zabilježene u optičkom području od 200 do 950 nm. U području iznad 950 nm ne bilježe se spektralne linije te one koje su prisutne prilikom pojave mikroizboja.



Slika 48. Spektralne linije neutralnog atoma neona te atoma kisika (O I) zabilježene pri kontaktnom izboju kroz tekući medij na površini uzorka tkiva (prikazano optičko područje od 200 do 950 nm)

4.1.4 Spektralne linije zabilježene u terapijskom polju

Tablica 14. Važnije valne duljine spektralnih linija neona, neutralne i ionizirane molekule dušika te atoma kisika. Naglašene su najizraženije linije zabilježene u emisijskom spektru elektrode (*) i emisijskom spektru mikroizboja (ˆ)

Atom neona (Ne I) λ [nm]								
540,06*	588,19*	609,62*	638,3*	703,24*	749,21*	826,48	863,46*	885,38*
556,28	590,25*	612,85*	640,23*	705,13*	753,57*	826,60	864,70	886,57*
565,67	590,64*	614,31*	650,65*	705,91*	754,40*	830,03*	865,43	891,95
571,92	594,48*	616,36*	653,29*	717,39*	774,07	831,49	865,55	907,95
574,83	596,55*	618,22*	659,9*	721,32	792,62	836,57	866,82	914,87
576,44*	597,46*	621,73*	665,21*	723,52	793,69*	837,21*	867,94	920,18
580,45	597,55*	626,65*	667,83*	724,52	794,32*	837,76*	868,19	922,01
582,02	598,79*	630,48*	671,7*	734,4	808,25*	841,84*	877,16	928,76
585,25	603	632,82*	692,95*	747,24	808,43*	849,53*	878,06	930,09
587,28	607,43	633,44*	702,41*	748,89*	813,64*	859,12*	878,37	932,65

Molekula dušika (N_2) λ [nm]								
296,06ˆ	313,49ˆ	328,41	337,06ˆ	357,61ˆ	375,43ˆ	394,16ˆ	413,99	434,34ˆ
297,5	315,82ˆ	331,02	349,93ˆ	366,96	380,4ˆ	399,7ˆ	419,98ˆ	438,94
311,5	326,69	333,97	353,58ˆ	370,89ˆ	389,33	405,84ˆ	426,79ˆ	

Atom kisika (O I) λ [nm]								
615,81	645,59	700,23	715,67	777,19*	822,18	844,63*	882,04	926,27*

Ion molekule dušika (N_2^+) elektronski prijelaz $B^2\sum u - X^2\sum g$) λ [nm] / (vibracijski prijelaz)		
358 / (0,1)	**391,2 / (0,0)** ˆ	427,6 / (1,0)

*značajnije linije u emisijskom spektru elektrode, ˆ značajnije linije u emisijskom spektru mikroizboja

4.2 Elektromagnetske veličine prisutne u terapijskom polju

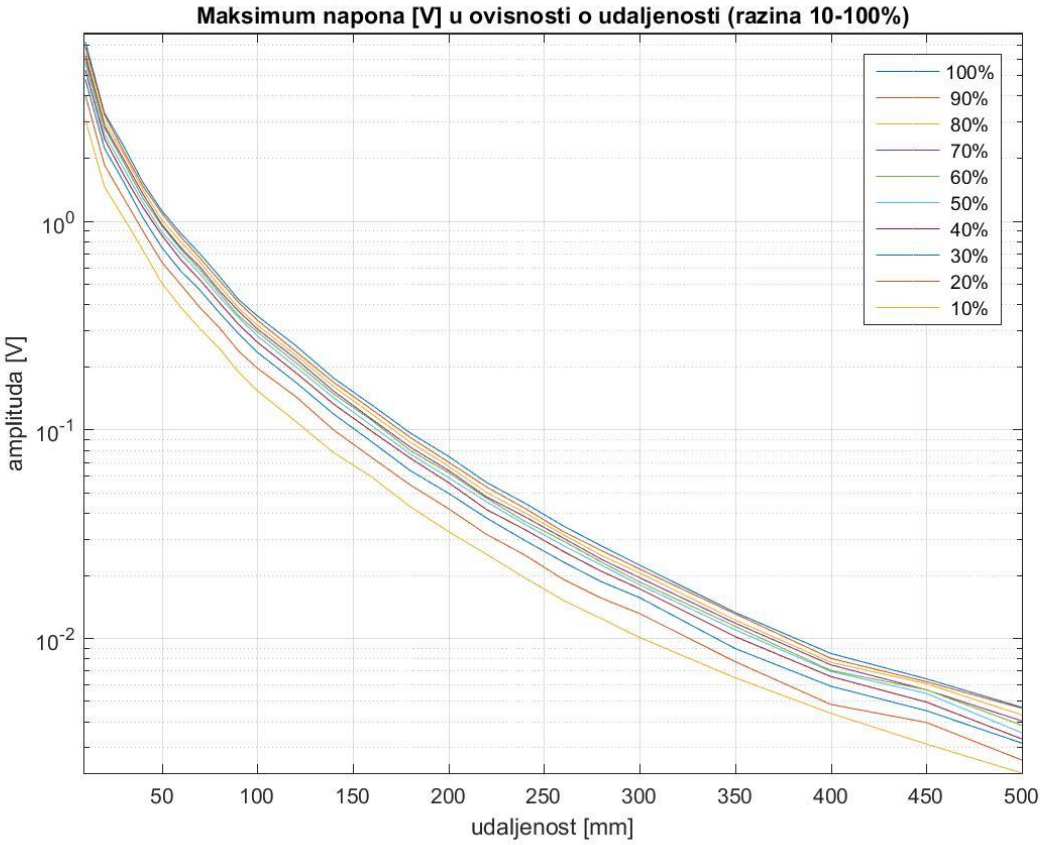
4.2.1 Električno polje

Valni oblici napona koji se mogu opisati eksponencijalno prigušenom sinusnom krivuljom javljaju se u intervalima od 950 μs (frekvencija impulsa: 1052,63 Hz). Frekvencija izmjerenog napona iznosi oko 34 kHz, što odgovara valnoj duljini od približno 8800 m.

Vrijednosti izmjerenog napona u ovisnosti o intenzitetu i udaljenosti od antene prikazani su u tablici 15. Rezultati mjerenja koji opisuju promjenu maksimuma amplitudnog spektra kao funkcije udaljenosti, s promjenom razine (10 – 100%), prikazani su grafički u logaritamskoj skali (slika 49). Vrijednosti napona zabilježene na najmanjoj udaljenosti od elektrode (10 mm) iznose: od 3,06 V (pri 10% intenziteta) do 7,22 V (pri 100% intenziteta) dok ukupna srednja vrijednost izmjerenih napona (X±SD) na 10 mm udaljenosti iznosi 5,56 ± 1,29 V.

Tablica 15. Izmjerene vrijednosti napona na unipol anteni s obzirom na odabrani intenzitet i pojedinu udaljenost od antene (vrijednosti su izražene u V)

	Intenzitet (%)									
[mm]	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	3,061	4,026	4,782	5,291	5,736	5,977	6,199	6,410	6,852	7,224
20	1,458	1,854	2,233	2,475	2,602	2,790	2,855	2,981	3,227	3,289
30	1,035	1,289	1,540	1,668	1,787	1,911	1,978	2,101	2,165	2,288
40	0,728	0,898	1,041	1,167	1,230	1,292	1,352	1,416	1,476	1,537
50	0,503	0,635	0,746	0,854	0,885	0,947	0,964	1,012	1,089	1,120
60	0,385	0,495	0,574	0,651	0,698	0,731	0,745	0,792	0,838	0,871
70	0,304	0,384	0,465	0,521	0,558	0,583	0,602	0,633	0,664	0,695
80	0,246	0,309	0,364	0,407	0,433	0,451	0,465	0,490	0,521	0,546
90	0,189	0,239	0,289	0,320	0,345	0,352	0,371	0,383	0,408	0,421
100	0,153	0,197	0,235	0,262	0,281	0,294	0,303	0,316	0,334	0,350
120	0,110	0,144	0,169	0,188	0,200	0,210	0,219	0,228	0,237	0,253
140	0,077	0,099	0,118	0,132	0,142	0,148	0,153	0,160	0,168	0,176
160	0,059	0,073	0,087	0,098	0,104	0,111	0,112	0,118	0,125	0,131
180	0,043	0,054	0,064	0,073	0,076	0,079	0,082	0,087	0,092	0,096
200	0,032	0,042	0,049	0,056	0,059	0,062	0,064	0,067	0,070	0,074
220	0,025	0,031	0,038	0,041	0,045	0,047	0,048	0,050	0,053	0,056
240	0,019	0,025	0,029	0,033	0,035	0,036	0,038	0,040	0,042	0,044
260	0,015	0,019	0,023	0,026	0,028	0,029	0,030	0,031	0,032	0,035
280	0,012	0,016	0,019	0,021	0,022	0,023	0,024	0,025	0,026	0,028
300	0,010	0,013	0,016	0,017	0,018	0,019	0,019	0,021	0,021	0,022
350	0,006	0,008	0,009	0,010	0,011	0,011	0,012	0,012	0,013	0,013
400	0,004	0,005	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,008
450	0,003	0,004	0,004	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
500	0,002	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005

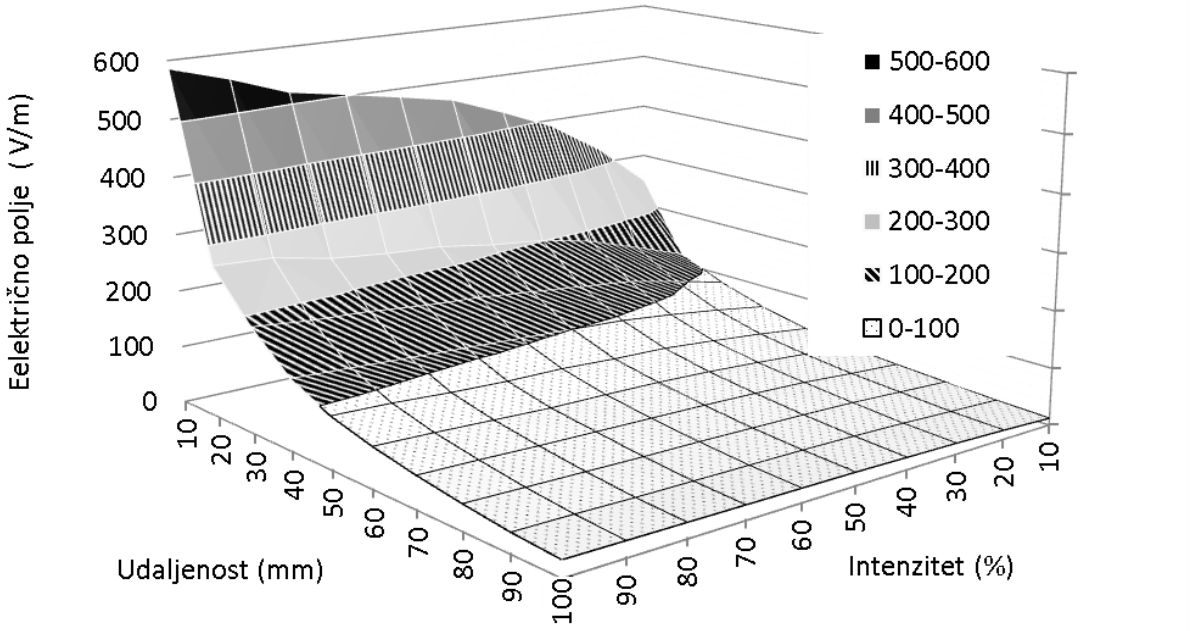


Slika 49. Prikaz promjene maksimuma napona na anteni s promjenom intenziteta (10 – 100%) u logaritamskoj skali

Iz dobivenih vrijednosti napona izračunata je jakost električnog polja za svaki intenzitet i udaljenosti. Tako izračunate jakosti električnog polja pri najmanjoj udaljenosti elektrode od antene (10 mm) iznose od 248 V/m (pri intenzitetu 10%) do 586 V/m (100%) dok je ukupna srednja vrijednost jakosti električnog polja na udaljenosti od 10 mm X±SD=450 ± 105 V/m Jakosti električnog polja za intenzitet (od 10 do 100%) s obzirom na udaljenosti od antene (10 do 500 mm) prikazane su u tablici 16. Na slici 50 prikazana je jakost električnog polja za sve intenzitete pri udaljenosti od 10 do 100 mm od antene.

Tablica 16. Jakost električnog polja (V/m) u ovisnosti o intenzitetu i udaljenosti od antene

	Intenzitet (%)									
[mm]	**10**	**20**	**30**	**40%**	**50**	**60**	**70**	**80**	**90**	**100**
10	248	327	388	429	466	485	503	520	556	586
20	118	150	181	201	211	226	232	242	262	267
30	84	105	125	135	145	155	161	171	176	186
40	59	73	85	95	100	105	110	115	120	125
50	41	52	61	69	72	77	78	82	88	91
60	31	40	47	53	57	59	60	64	68	71
70	25	31	38	42	45	47	49	51	54	56
80	20	25	30	33	35	37	38	40	42	44
90	15	19	23	26	28	29	30	31	33	34
100	12	16	19	21	23	24	25	26	27	28
120	8,9	11,7	13,7	15,2	16,2	17,0	17,7	18,5	19,3	20,5
140	6,3	8,1	9,6	10,7	11,5	12,0	12,4	13,0	13,7	14,3
160	4,8	5,9	7,1	7,9	8,4	9,0	9,1	9,6	10,1	10,6
180	3,5	4,4	5,2	5,9	6,2	6,4	6,7	7,1	7,4	7,8
200	2,6	3,4	4,0	4,5	4,8	5,0	5,2	5,4	5,7	6,0
220	2,0	2,5	3,1	3,4	3,7	3,8	3,9	4,1	4,3	4,5
240	1,6	2,0	2,4	2,7	2,8	2,9	3,1	3,2	3,4	3,6
260	1,2	1,6	1,9	2,1	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,8
280	1,0	1,3	1,5	1,7	1,8	1,9	1,9	2,0	2,1	2,2
300	0,8	1,1	1,3	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,7	1,8
350	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	1,1
400	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
450	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
500	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4



Slika 50. Jakost električnog polja za sve intenzitete pri udaljenostima od 10 do 100 mm

4.2.2 Magnetsko polje

Rezultati mjerenja magnetskog polja u *loop* anteni zabilježeni su u dva frekvencijska područja. Polje u frekvencijskom području oko 33 kHz prisutno je u oba modaliteta primjene (kontaktni izboj i izboj kroz zrak) dok se isključivo u slučaju izboja kroz zrak i pojave mikroizboja bilježi magnetsko polje u frekvencijskom području od 41,5 MHz.

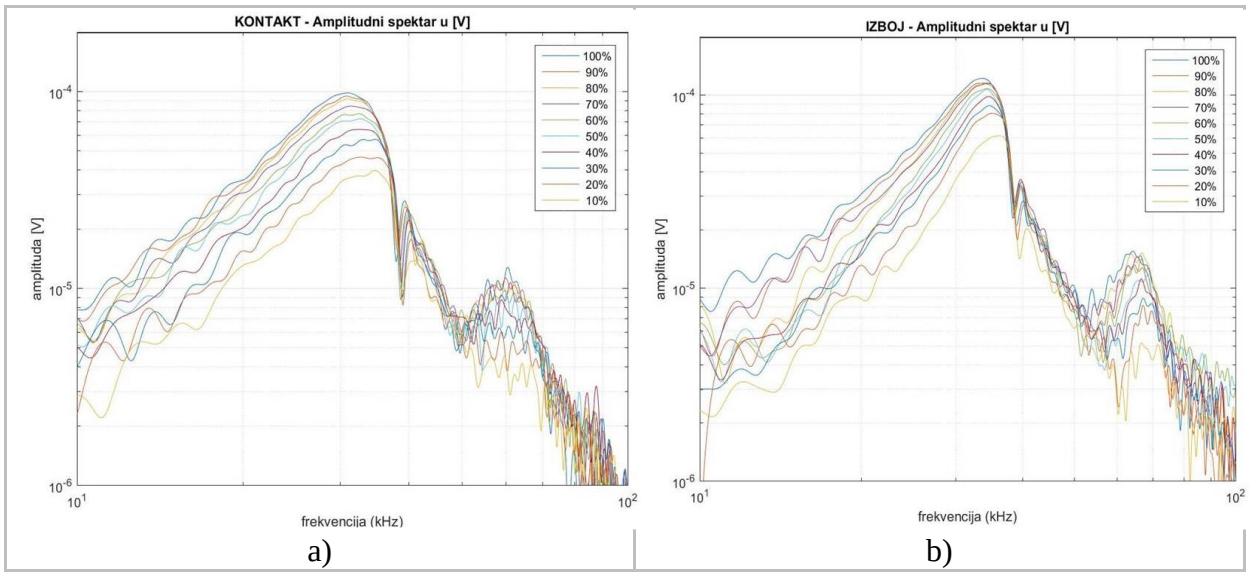
Ukupni rezultati mjerenja koji opisuju promjenu maksimuma amplitudnog spektra napona s promjenom razine intenziteta (10 do 100%) u frekvencijskom području oko 33 kHz grafički su prikazani za kontaktni izboj (slika 51a) i izboj kroz zrak (slika 51b). Rezultati mjerenja jakosti magnetskog polja i gustoće magnetskog toka u frekvencijskom području oko 33 kHz u *loop* anteni pri kontaktnom izboju (na uzorku tkiva) i izboju kroz zrak (na vodljivu plohu) prikazani su u tablici 17. Na slici 52 prikazane su vrijednosti frekvencija i gustoće magnetskog toka izmjerene pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak. Ukupni rezultati mjerenja koji opisuju promjenu maksimuma amplitudnog spektra napona s promjenom razine intenziteta (10 do 100%) u frekvencijskom području oko 41,5 MHz pri izboju kroz zrak prikazani su na slici 53 i u tablici 18.

Srednja vrijednost jakosti magnetskog polja (*H*), gustoće magnetskog toka (*B*) te frekvencije polja (*f*) u području 30 – 36 kHz iznosi:

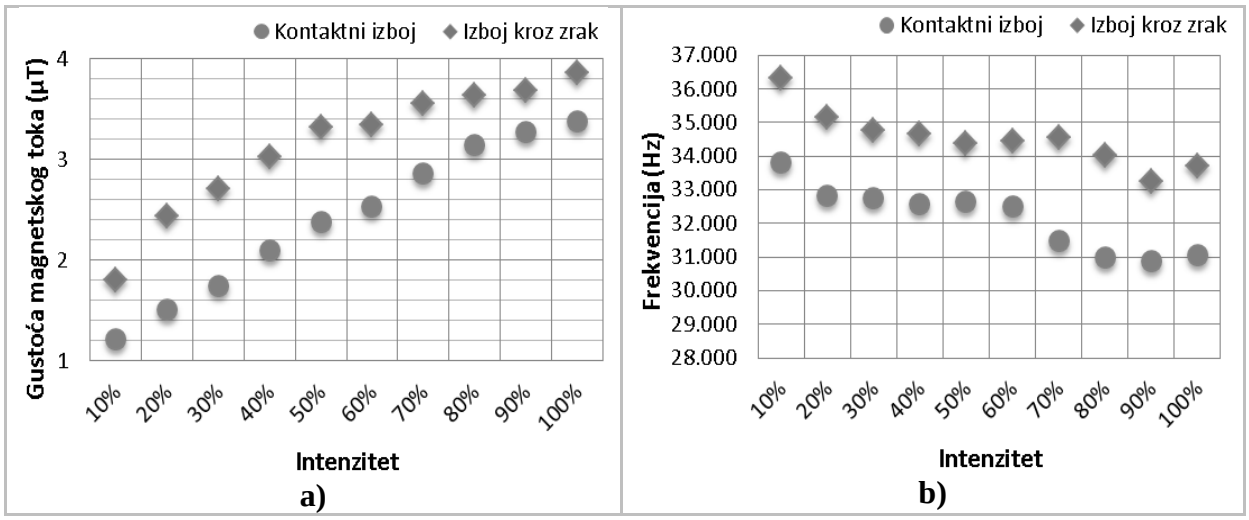
- pri kontaktnom izboju: *H* (1,93 ± 0,59 A/m), *B* (2,43 ± 0,75 μT), *f* (32151 ± 985Hz)
- pri izboju kroz zrak: *H* (2,50 ± 0,52 A/m), *B* (3,14 ± 0,65 μT), *f* (34526 ± 833 Hz)

Tablica 17. Frekvencija magnetskog polja *f* [Hz] na kojoj je izmjeren napon na anteni *U* [V] te jakost magnetskog polja *H* [A/m] i gustoća magnetskog toka *B* [μT] za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

	Kontaktni izboj				**Izboj kroz zrak**			
Intenzitet	***f*[Hz]**	***U*[V]**	***H*[A/m]**	***B*[μT]**	***f*[Hz]**	***U*[V]**	***H*[A/m]**	***B*[μT]**
100%	31.054	1,62E-04	2,69	**3,38**	33.706	2,00E-04	3,07	**3,86**
90%	30.875	1,56E-04	2,61	**3,28**	33.259	1,89E-04	2,94	**3,69**
80%	30.994	1,50E-04	2,51	**3,15**	34.034	1,91E-04	2,90	**3,64**
70%	31.471	1,39E-04	2,28	**2,86**	34.571	1,89E-04	2,83	**3,56**
60%	32.514	1,27E-04	2,01	**2,53**	34.451	1,78E-04	2,66	**3,35**
50%	32.663	1,19E-04	1,89	**2,38**	34.362	1,76E-04	2,64	**3,32**
40%	32.574	1,05E-04	1,67	**2,10**	34.660	1,61E-04	2,41	**3,03**
30%	32.739	9,39E-05	1,48	**1,86**	34.750	1,45E-04	2,15	**2,71**
20%	32.812	7,62E-05	1,20	**1,51**	35.137	1,32E-04	1,95	**2,44**
10%	33.809	6,52E-05	1,00	**1,25**	36.329	1,01E-04	1,44	**1,81**
Mean	32.151	1,19E-04	1,93	**2,43**	34.526	1,66E-04	2,50	**3,14**
SD	985	3,36E-05	0,59	**0,75**	833	3,15E-05	0,52	**0,65**



Slika 51. Prikaz promjene maksimuma amplitudnog spektra mjerenog napona promjenom intenziteta (10 – 100%) pri: a) kontaktom izboju i b) izboju kroz zrak

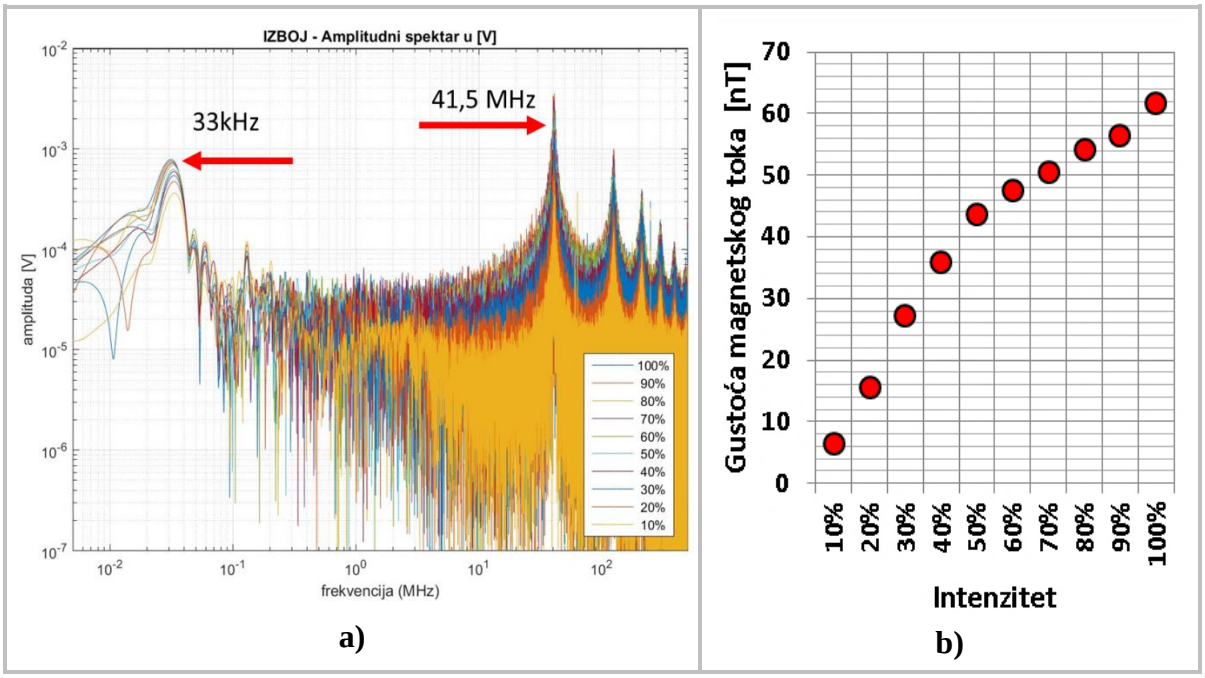


Slika 52. Magnetsko polje uz promjenu intenziteta od 10 do 100% pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak: a) gustoća magnetskog toka [μT], b) frekvencija magnetskog polja [Hz]

Srednja vrijednost jakosti magnetskog polja i gustoće magnetskog toka (± SD) koja se bilježi pri izboju kroz zrak na frekvenciji 41,5 MHz iznosi *H* (0,032 ± 0,014 A/m) i *B* (40 ± 18 nT).

Tablica 18. Magnetsko polje izmjereno na frekvenciji 41,5 MHz pri izboju kroz zrak kao funkcija intenziteta (*f* – frekvencija magnetskog polja [Hz], *U* – napon izmjeren na *loop* anteni [V], *H* – jakost magnetskog polja [A/m], *B* – gustoća magnetskog toka [nT])

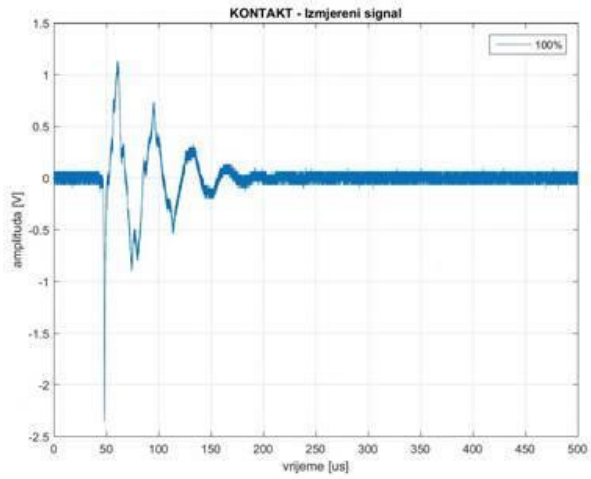
	Izboj kroz zrak 41,5 MHz			
Intenzitet	***f* [Hz]**	***U*, [V]**	***H*, [A/m]**	***B* [nT]**
100%	4,150E+07	3,89E-03	4,91E-02	**61,66**
90%	4,150E+07	3,57E-03	4,50E-02	**56,51**
80%	4,150E+07	3,42E-03	4,32E-02	**54,24**
70%	4,150E+07	3,19E-03	4,02E-02	**50,55**
60%	4,150E+07	3,00E-03	3,79E-02	**47,59**
50%	4,150E+07	2,76E-03	3,48E-02	**43,73**
40%	4,150E+07	2,26E-03	2,85E-02	**35,88**
30%	4,150E+07	1,72E-03	2,17E-02	**27,21**
20%	4,150E+07	9,79E-04	1,23E-02	**15,51**
10%	4,150E+07	4,12E-04	5,19E-03	**6,53**
Mean	4,150E+07	2,52E-03	3,18E-02	**39,94**
SD	0	1,10E-03	1,38E-02	**17,40**



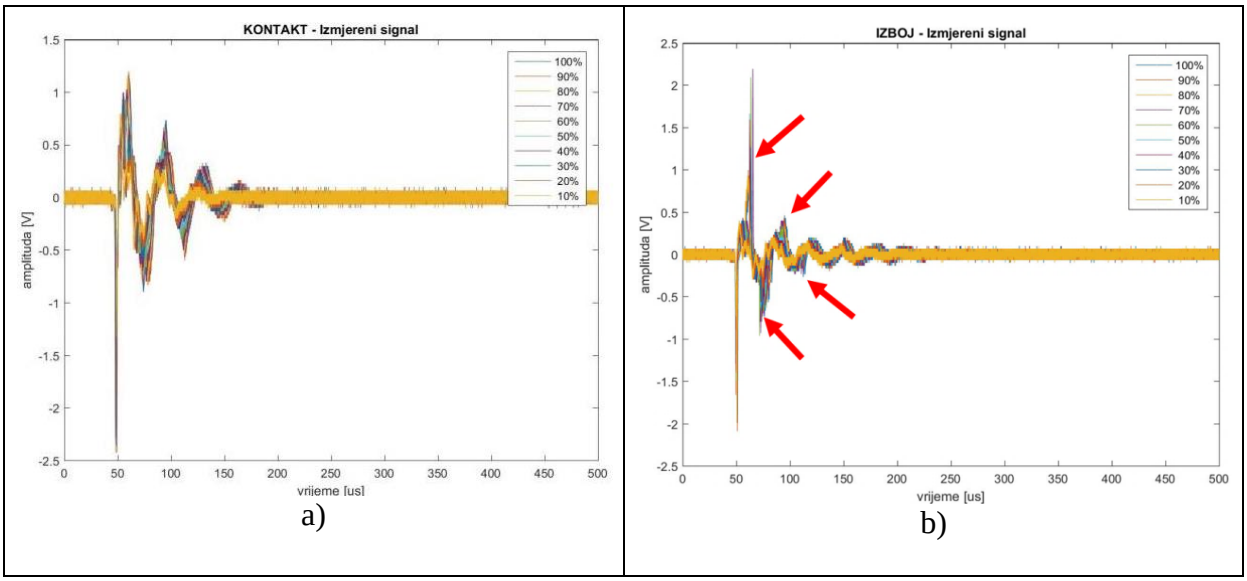
Slika 53. Magnetsko polje: a) prikaz amplitudnog spektra izboja kroz zrak (crvene strelice: frekvencijske komponente signala u području 33 kHz i iznad 40 MHz), b) izmjerene vrijednosti gustoće magnetskog toka *B* [nT] na frekvenciji 41,5 MHz kao funkcija intenziteta

4.2.3 Efektivne vrijednosti napona i struje zabilježene na uzorku tkiva

Na naponskoj sondi bilježe se valni oblici napona koji se mogu opisati eksponencijalno prigušenom sinusnom krivuljom. Ovi se oblici javljaju u intervalima od 950 μs (frekvencija impulsa: 1052,63 Hz). Srednja vrijednost frekvencije iznosi 32,2 kHz pri kontaktnom izboju te 34,5 kHz pri izboju kroz zrak. Amplituda vala mijenja se ovisno o intenzitetu te udaljenosti elektrode od referentne ravnine (površine tkivnog uzorka). Najveće vrijednosti amplitude vala zabilježene su pri kontaktnom izboju (slika 54).



Slika 54. Primjer zabilježenog valnog oblika napona pri kontaktnom izboju (intenzitet 100%)



Slika 55. Zabilježeni valni oblik napona u slučaju (a) kontaktnog izboja i (b) izboja kroz zrak prilikom kojeg dolazi do formiranja mikroizboja koji se uočavaju na osciloskopu kao oštri nanosekundni šiljci (strelice)

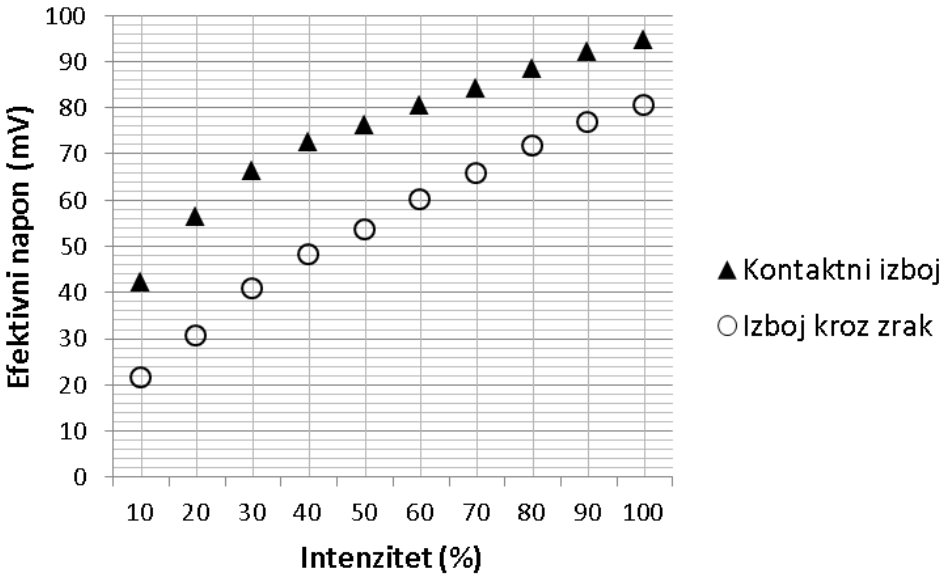
U slučaju izboja kroz zrak bilježe se manje vrijednosti amplitude uz pojavu vrlo kratkih (nekoliko desetaka nanosekundni) šiljaka koji koreliraju sa zabilježenim magnetskim izbojima u području iznad 40 MHz, a javljaju se u trenutku pojave mikroizboja (slika 55).

Vrijednosti izmjerenih i procijenjenih električnih veličina prisutnih u terapijskom polju prikazane su u tablici 19.

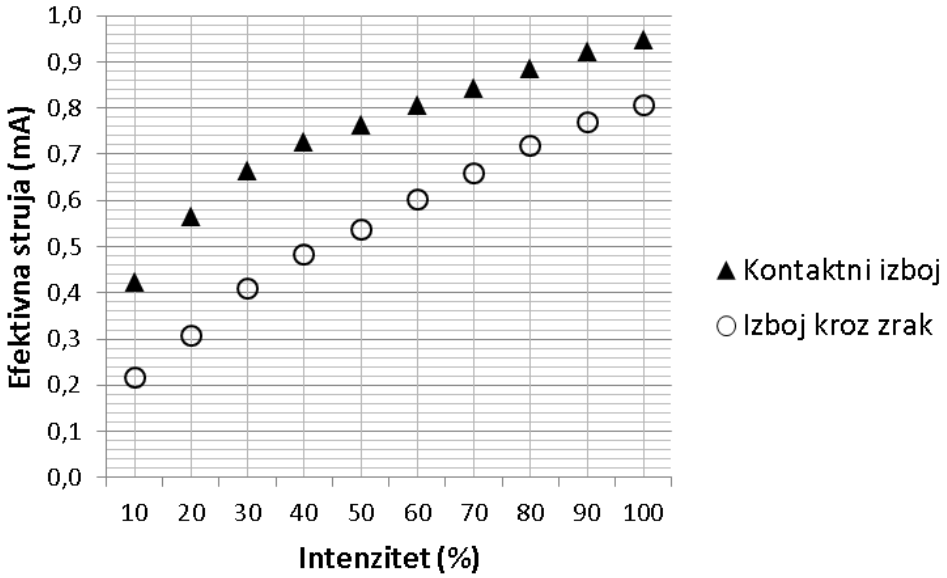
Tablica 19. Vrijednosti zabilježenog efektivnog napona i izračunate vrijednosti efektivne struje na osnovu poznatog otpora mjerne sonde (R_{ul} = 100 Ω) te vrijednosti snage i gustoće struje

Vrijednost		Efektivni napon (mV)		Efektivna struja (mA)		Gustoća struje (μA/mm2)		Snaga (μW)	
Modalitet		Kontakt	Zrak	Kontakt	Zrak	Kontakt	Zrak	Kontakt	Zrak
Intenzitet	10%	42,35	21,65	0,424	0,217	8,47	4,33	17,94	4,687
	20%	56,53	30,70	0,565	0,307	11,31	6,14	31,96	9,428
	30%	66,35	40,95	0,664	0,410	13,27	8,19	44,02	16,771
	40%	72,59	48,33	0,726	0,483	14,52	9,67	52,69	23,357
	50%	76,35	53,83	0,764	0,538	15,27	10,77	58,29	28,973
	60%	80,61	60,08	0,806	0,601	16,12	12,02	64,98	36,095
	70%	84,35	65,86	0,844	0,659	16,87	13,17	71,15	43,379
	80%	88,64	71,83	0,886	0,718	17,73	14,37	78,57	51,595
	90%	92,35	76,83	0,924	0,768	18,47	15,37	85,29	59,033
	100%	94,66	80,64	0,947	0,806	18,93	16,13	89,61	65,031
Mean		**75,48**	**55,07**	**0,75**	**0,55**	**15,10**	**11,01**	**59,45**	**33,83**
SD		**16,60**	**19,74**	**0,17**	**0,20**	**3,32**	**3,95**	**23,27**	**20,79**

Vrijednosti efektivnog napona za intenzitete od 10 do 100% u koracima od 10% te za dva modaliteta primjene (kontaktni izboj i izboj kroz zrak) računate su na osnovu amplituda naponskog vala zabilježenih na osciloskopu. Tako dobivene vrijednosti efektivnog napona veće su u slučaju kontaktnog izboja i iznose od 42,35 mV za najmanji intenzitet (10%) do 94,66 mV za najjači intenzitet (prosječna vrijednost 75,5 ± 16,6 mV) dok u slučaju izboja kroz zrak vrijednosti iznose od 21,65 do 80,64 mV (srednja vrijednost 55,1 ± 19,7 mV) (slika 56). Iz rezultata dobivenih mjerenjem efektivnog napona izračunate su vrijednosti efektivnih struja s obzirom na poznati otpor unutar strujnog kruga (R_{ul} = 100 Ω) te one iznose od 0,42 do 0,95 mA (prosječna vrijednost 0,75 ± 0,17 mA) u slučaju kontaktnog izboja te od 0,22 do 0,81 mA (prosječna vrijednost 0,55 ± 0,2 mA) u slučaju izboja kroz zrak (slika 57).



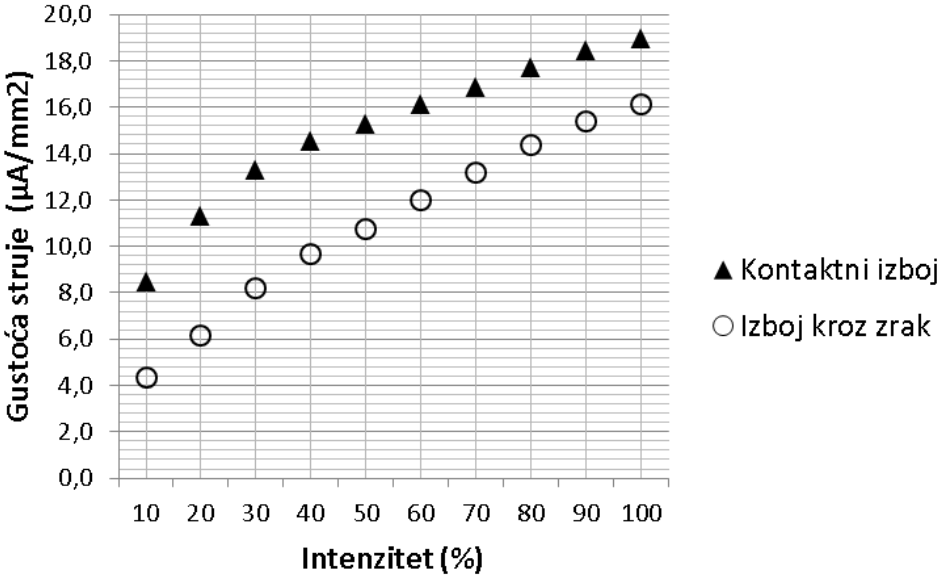
Slika 56. Prikaz vrijednosti efektivnih napona kao funkcije intenziteta za kontaktni izboj i izboj kroz zrak



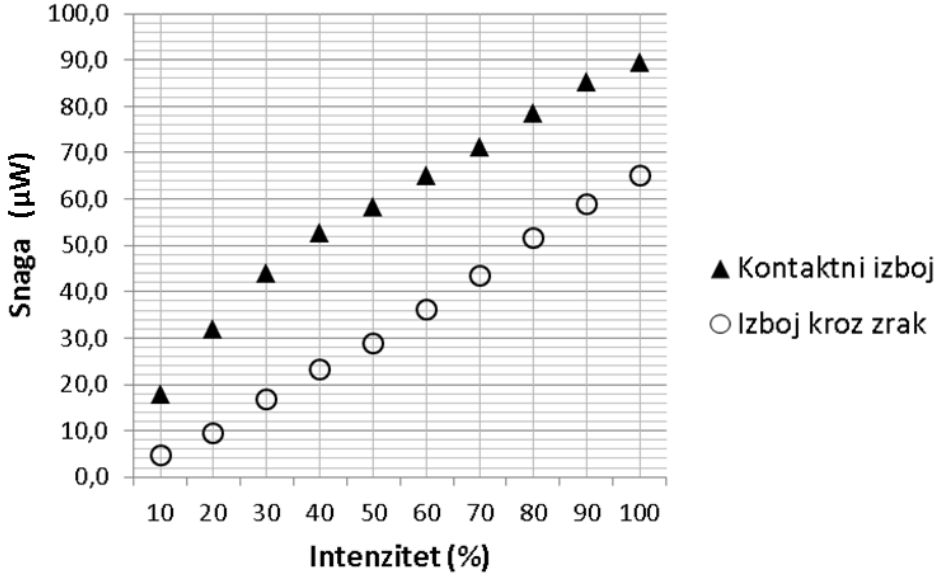
Slika 57. Prikaz vrijednosti efektivnih struja kao funkcije intenziteta za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

Srednje vrijednosti gustoća struje u terapijskom polju s obzirom na procijenjenu površinu blago konveksne kružne elektrode ($\approx 50\ mm^2$) iznose $15{,}01 \pm 3{,}3\ \mu A/mm^2$ pri kontaktnom izboju te $10{,}96 \pm 3{,}93\ \mu A/mm^2$ pri izboju kroz zrak (slika 58). Vrijednosti efektivnog napona i

struje kroz tkivo korištene su za procjenu snage čija prosječna vrijednost iznosi 59,45 ± 23,27 μW pri kontaktnom izboju te 33,83 ± 20,79 μW pri izboju kroz zrak (slika 59).



Slika 58. Vrijednosti gustoće struje kao funkcije intenziteta za slučaj kontaktnog izboja i izboja kroz zrak



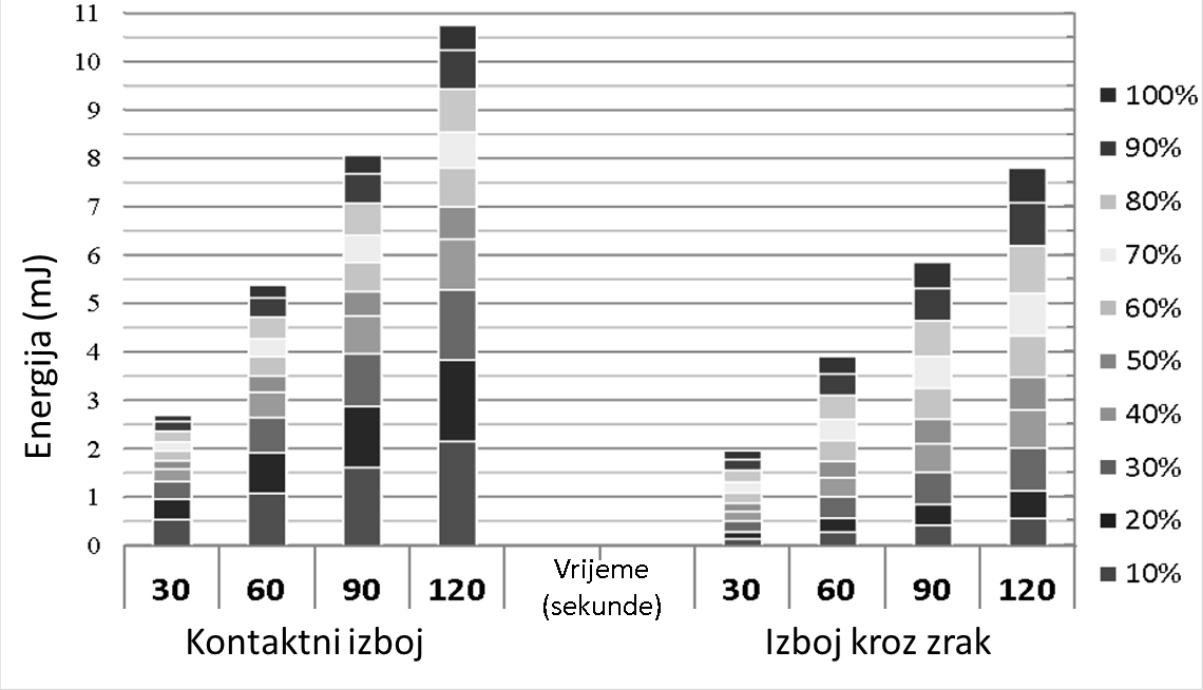
Slika 59. Vrijednosti prosječne snage kao funkcije intenziteta za slučaj kontaktnog izboja i izboja kroz zrak

Na osnovu vrijednosti efektivnog napona i efektivne struje izračunate su vrijednosti predane električne energije s obzirom na R_{ul} od 100 Ω u funkciji odabranog intenziteta i vremena izloženosti (30, 60, 90 i 120 sekundi) (tablica 20 i slika 60).

Tablica 20. Procjena vrijednosti električne energije predane tkivu kao funkcija vremena (30, 60, 90 i 120 sekundi) i odabranog intenziteta (10 do100%) s prikazanim srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama za pojedinačni vremenski interval te ukupnom srednjom vrijednošću za pojedini modalitet

Energija (mJ = mWs)									
Vrijeme		**30 s**		**60 s**		**90 s**		**120 s**	
Modalitet		**Kontakt**	**Zrak**	**Kontakt**	**Zrak**	**Kontakt**	**Zrak**	**Kontakt**	**Zrak**
INTENZITET	10%	0,54	0,14	1,08	0,28	1,61	0,42	2,15	0,56
	20%	0,96	0,28	1,92	0,57	2,88	0,85	3,83	1,13
	30%	1,32	0,50	2,64	1,01	3,96	1,51	5,28	2,01
	40%	1,58	0,70	3,16	1,40	4,74	2,10	6,32	2,80
	50%	1,75	0,87	3,50	1,74	5,25	2,61	7,00	3,48
	60%	1,95	1,08	3,90	2,17	5,85	3,25	7,80	4,33
	70%	2,13	1,30	4,27	2,60	6,40	3,90	8,54	5,21
	80%	2,36	1,55	4,71	3,10	7,07	4,64	9,43	6,19
	90%	2,56	1,77	5,12	3,54	7,68	5,31	10,23	7,08
	100%	2,69	1,95	5,38	3,90	8,06	5,85	10,75	7,80
Mean		1,78	1,02	3,57	2,03	5,35	3,05	7,13	4,06
SD		0,70	0,62	1,40	1,25	2,09	1,87	2,79	2,49

	Kontaktni izboj	**Izboj kroz zrak**
Mean	4,46	2,54
SD	2,30	1,31



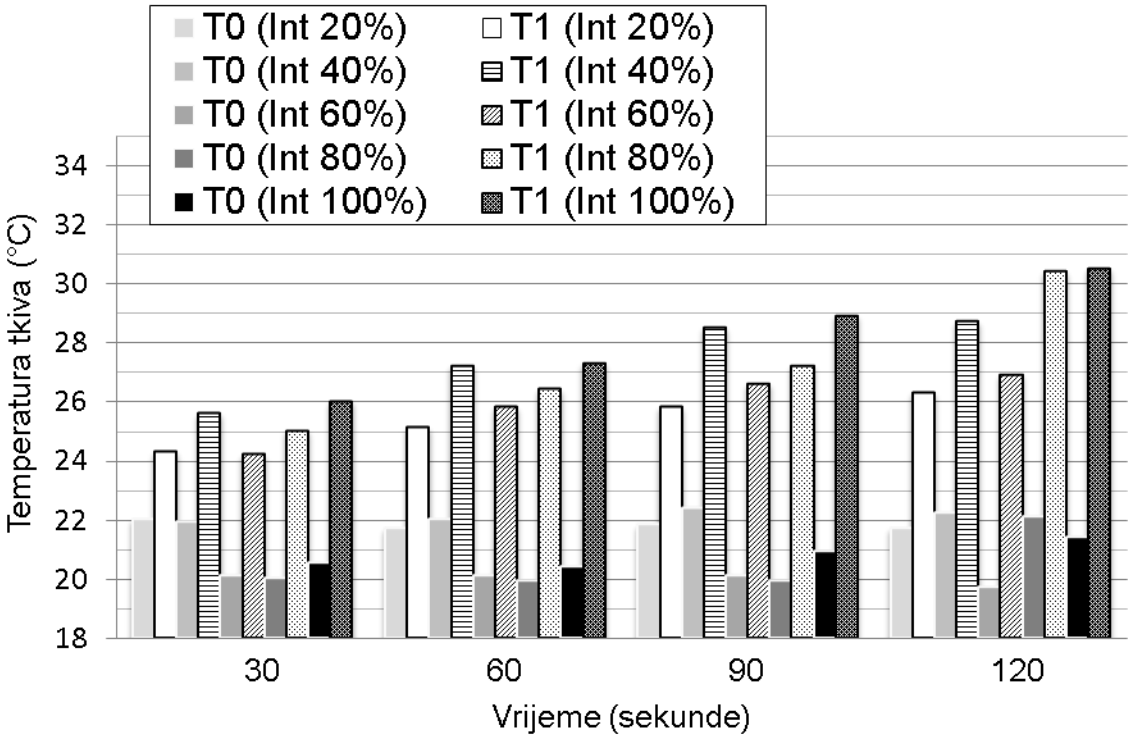
Slika 60. Energije predane tkivu s obzirom na vrijeme izloženosti prikazane kao funkcija intenziteta za slučaj kontaktnog izboja (lijevo) i izboja kroz zrak (desno)

4.3 Promjena temperature na površini uzorka tkiva

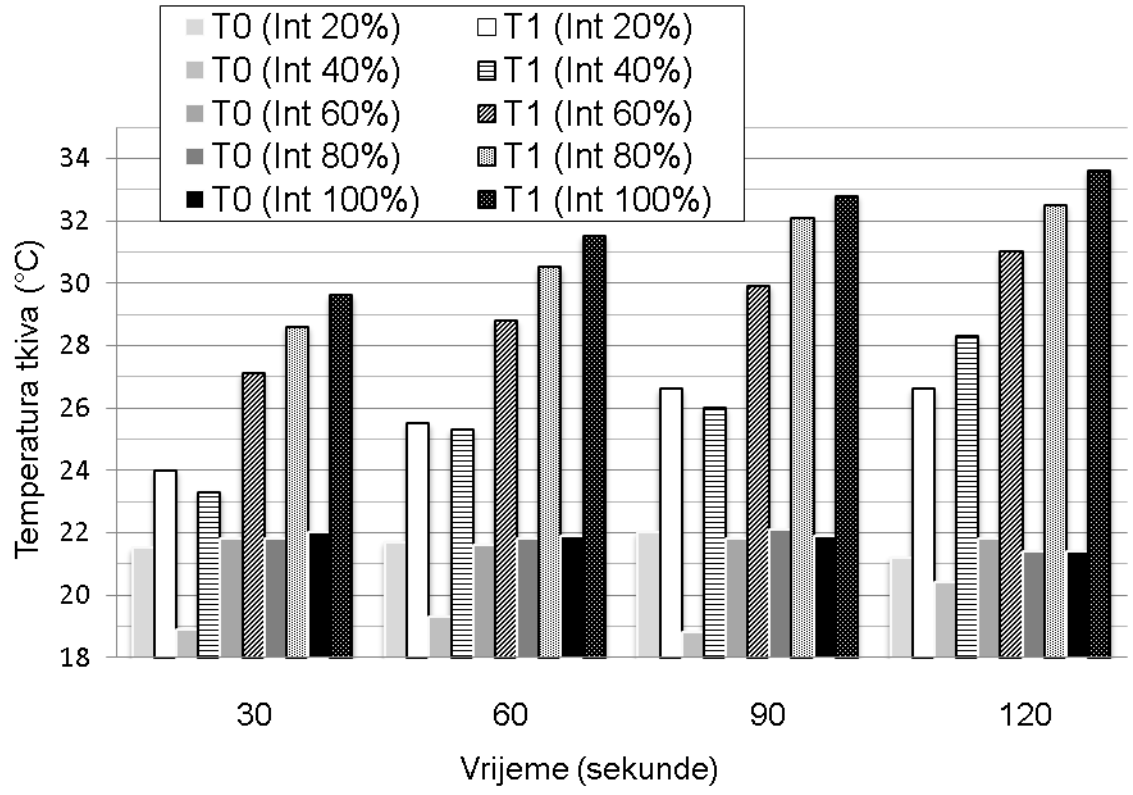
Rezultati mjerenja temperature na površini uzorka tkiva prije (T_0) i neposredno nakon djelovanja (T_1) VFGO-a i pripadajuće elektrode kružne površine (≈ 50 mm^2), kao i razlike u temperaturi ($\Delta T = T_1 - T_0$) pri različitim intenzitetima (20, 40, 60, 80 i 100%) i vremenskim intervalima (30, 60, 90 i 120 sekundi) u slučaju kontaktnog izboja (slika 61) i izboja kroz zrak (slika 62) prikazani su u tablici 21.

Tablica 21. Srednje vrijednosti zabilježenih temperatura površine tkiva prije (T_0) i nakon zahvata (T_1) te njihova razlika ΔT (T_1-T_0) sa standardnim devijacijama

		KONTAKTNI IZBOJ					IZBOJ KROZ ZRAK			
Vrijeme		**30 s**	**60 s**	**90 s**	**120 s**		**30 s**	**60 s**	**90 s**	**120 s**
Intenzitet 20%	$T_{0\ k\ 20}$	21,7	21,7	21,8	21,7	$T_{0\ z\ 20}$	21,3	21,7	22	21,2
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1	SD	0	0,1	0	0,1
	$T_{1\ k\ 20}$	24,3	25,2	25,8	26,3	$T_{1\ z\ 20}$	24,2	25,5	26,6	26,6
	SD	0,2	0,3	0,2	0,2	SD	0,3	0,4	0,5	0,7
	$\Delta T_{k\ 20}$	**2,6**	**3,5**	**4**	**4,6**	**$\Delta T_{z\ 20}$**	**2,9**	**3,8**	**4,6**	**5,4**
	SD	0,2	0,3	0,2	0,2	SD σ	0,3	0,4	0,5	0,7
Intenzitet 40%	$T_{0\ k\ 40}$	21,9	22	22,4	22,2	$T_{0\ z\ 40}$	18,9	19,3	18,8	21,2
	SD	0	0,1	0,1	0,1	SD	0	0,1	0,1	0,1
	$T_{1\ k\ 40}$	25,8	27,2	28,5	28,9	$T_{1\ z\ 40}$	23,3	25,3	26	29,1
	SD	0,2	0,2	0,3	0,4	SD	0,2	0,3	0,6	0,9
	$\Delta T_{k\ 40}$	**3,9**	**5,2**	**6,1**	**6,7**	**$\Delta T_{z\ 40}$**	**4,4**	**6**	**7,2**	**7,9**
	SD	0,2	0,2	0,3	0,4	SD	0,2	0,3	0,6	0,9
Intenzitet 60%	$T_{0\ k\ 60}$	20,1	20	20,1	19,7	$T_{0\ z\ 60}$	21,6	21,3	21,4	21,8
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1	SD	0,1	0	0,1	0
	$T_{1\ k\ 60}$	24,7	25,9	27	27,2	$T_{1\ z\ 60}$	27,4	28,9	30,1	31,4
	SD	0,3	0,4	0,6	0,5	SD	0,4	0,6	0,7	1
	$\Delta T_{k\ 60}$	**4,6**	**5,9**	**6,9**	**7,5**	**$\Delta T_{z\ 60}$**	**5,8**	**7,6**	**8,7**	**9,6**
	SD	0,3	0,4	0,6	0,5	SD	0,4	0,6	0,7	1,0
Intenzitet 80%	$T_{0\ k\ 80}$	20	19,9	19,9	22,1	$T_{0\ z\ 80}$	21,8	21,8	22	21,4
	SD	0,1	0,1	0,1	0,1	SD	0,1	0,1	0,1	0,1
	$T_{1\ k\ 80}$	25,1	26,3	27,5	30,3	$T_{1\ z\ 80}$	28,6	30,5	32	32,5
	SD	0,3	0,5	0,7	0,8	SD	0,5	0,7	0,8	1,2
	$\Delta T_{k\ 80}$	**5,1**	**6,4**	**7,6**	**8,2**	**$\Delta T_{z\ 80}$**	**6,8**	**8,7**	**10**	**11,1**
	SD	0,3	0,5	0,7	0,8	SD	0,5	0,7	0,8	1,2
Intenzitet 100%	$T_{0\ k\ 100}$	20,5	20,4	20,5	21,4	$T_{0\ z\ 100}$	22	21,9	21,9	21,4
	SD	0	0,1	0,1	0,1	SD	0,1	0	0,1	0
	$T_{1\ k\ 100}$	26	27,3	28,6	30,3	$T_{1\ z\ 100}$	29,6	31,5	32,8	33,6
	SD	0,5	0,6	0,8	0,8	SD	0,5	0,8	1	1,3
	$\Delta T_{k\ 100}$	**5,5**	**6,9**	**8,1**	**8,9**	**$\Delta T_{z\ 100}$**	**7,6**	**9,6**	**10,9**	**12,2**
	SD	0,5	0,6	0,8	0,8	SD	0,5	0,8	1,0	1,3



Slika 61. Temperatura ciljne površine na tkivu u slučaju kontaktnog izboja prije (T_0) i nakon zahvata (T_1) u ovisnosti o intenzitetu i vremenu izloženosti



Slika 62. Temperatura ciljne površine na tkivu u slučaju izboja kroz zrak prije (T_0) i nakon zahvata (T_1) u ovisnosti o intenzitetu i vremenu izloženosti

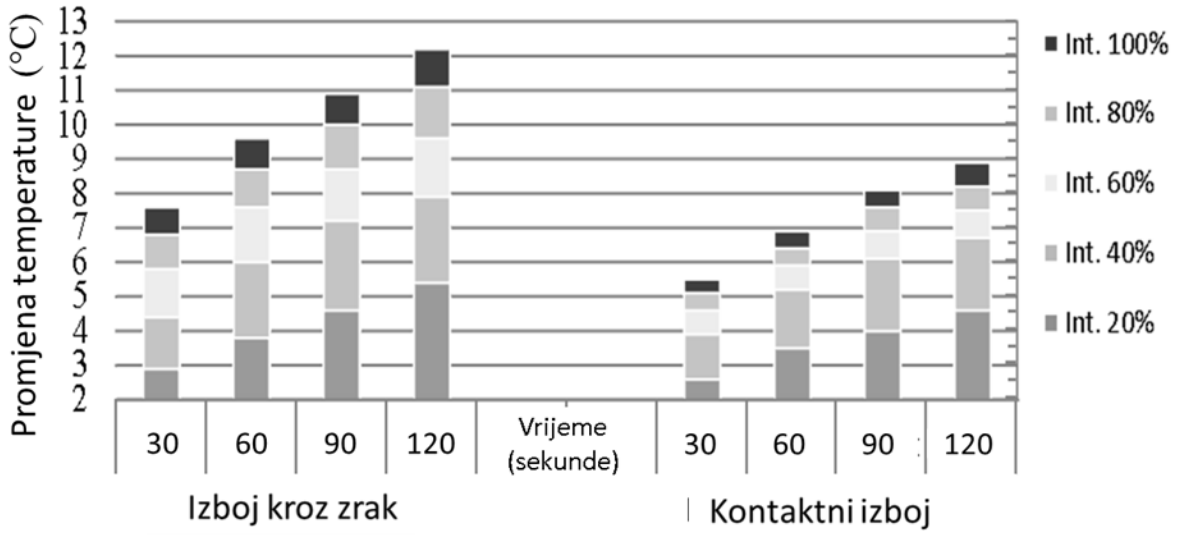
Zabilježene temperature površine tkiva prije djelovanja elektrode na tkivo (T_0) iznosile su od 18,8 ± 0,1 do 22,4 ± 0,1 °C dok su temperature neposredno nakon djelovanja elektrode (T_1) iznosile od 24,3 ± 0,2 do 33,6 ± 1,3 °C (tablica 21). Ukupna srednja vrijednost razlika u temperaturi površine tkiva iznosi 5,9 ± 1,7°C u slučaju kontaktnog izboja te 7,5 ± 2,6°C u slučaju izboja kroz zrak. Razlike u temperaturi površine tkiva pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak prikazane su u tablici 22 i 23 te na slici 63.

Tablica 22. Razlika temperature (ΔT) za pojedini intenzitet i trajanje zahvata u slučaju kontaktnog izboja prikazane s ukupnim srednjim vrijednostima te srednjim vrijednostima za pojedini intenzitet, kao i vrijeme izloženosti

ΔT(Int) / Vrijeme	**30 s**	**60 s**	**90 s**	**120 s**	**Mean (Int)**	**SD**
ΔT (20%)	2,6	3,5	4,0	4,6	**3,7**	0,8
ΔT (40%)	3,9	5,2	6,1	6,7	**5,5**	1,2
ΔT (60%)	4,6	5,9	6,9	7,5	**6,2**	1,3
ΔT (80%)	5,1	6,4	7,6	8,2	**6,8**	1,4
ΔT (100%)	5,5	6,9	8,1	8,9	**7,4**	1,5
Mean (vrijeme)	**4,3**	**5,6**	**6,5**	**7,2**		
SD	1,1	1,3	1,6	1,7		
Mean (ukupno)	**5,9**					
SD	**1,7**					

Tablica 23. Razlika temperature (ΔT) za pojedini intenzitet i trajanje zahvata u slučaju izboja kroz zrak prikazane s ukupnim srednjim vrijednostima te srednjim vrijednostima za pojedini intenzitet, kao i vrijeme izloženosti

ΔT(Int) / Vrijeme	**30 s**	**60 s**	**90 s**	**120 s**	**Mean (Int)**	**SD**
ΔT (20%)	2,9	3,8	4,6	5,4	**4,2**	1,1
ΔT (40%)	4,4	6,0	7,2	7,9	**6,4**	1,5
ΔT (60%)	5,8	7,6	8,7	9,6	**7,9**	1,6
ΔT (80%)	6,8	8,7	10,0	11,1	**9,2**	1,8
ΔT (100%)	7,6	9,6	10,9	12,2	**10,1**	2,0
Mean (vrijeme)	**5,5**	**7,1**	**8,3**	**9,2**		
SD	1,9	2,3	2,5	2,7		
Mean (ukupno)	**7,5**					
SD	**2,6**					



Slika 63. Promjena temperature (ΔT = T1 – T0) za pojedini intenzitet (20, 40, 60, 80 i 100%) i vrijeme izloženosti (30, 60, 90 i 120 sekundi) ukazuje na značajno veće povečanje temeperature na površini tkiva pri izboju kroz zrak u odnosu na kontakntni izboj.

4.4 Statistička analiza

4.4.1 Razlika fizičkih veličina prema vrsti izboja

Rezultati analize razlika temperatura i elektromagnetskih veličina prisutnih u terapijskom polju prema vrsti izboja, dobiveni pomoću t-testa za nezavisne uzorke, navedeni su tablici 21. Polazna hipoteza (nul-hipoteza) je za sve varijable jednakost njihovih aritmetičkih sredina kontaktnog izboja i izboja kroz zrak, tj. da se rezultati ta dva pokusa ne razlikuju statistički značajno. Temperatura neposredno prije djelovanja, kao i njihove varijance, su izjednačene. Nakon djelovanja prosječna temperatura je statistički značajno veća u slučaju izboja kroz zrak (28,8°C). Posljedica toga je da je prosječna promjena temperature veća u pokusu s izbojem kroz zrak od istog prosjeka u pokusu s kontaktnim izbojem (7,54 °C u odnosu na 5,91°C). Elektromagnetske varijable efektivni napon i struja, gustoća struje i predana energija bilježe statistički značajno veće vrijednosti u slučaju kontaktnog izboja dok jakost magnetskog polja, kao i njegova frekvencija bilježe statistički značajno veće vrijednosti u slučaju izboja kroz zrak (tablica 24).

Tablica 24. Razlike temperatura i elektromagnetskih veličina zabilježenih u terapijskom polju prema vrsti izboja – rezultati t-testa

Varijabla	**Vrsta izboja**	**t statistika**					
		n	**M**	**SD**	**t**	**df**	**p**
Temperatura neposredno prije djelovanja (°C)	Kontaktni izboj	20	21,00	0,95	-0,759	38	0,453
	Izboj kroz zrak	20	21,23	1,00			
Temperatura neposredno nakon djelovanja (°C)	Kontaktni izboj	20	26,91	1,72	-2,39	38	**0,022**
	Izboj kroz zrak	20	28,78	3,05			
Promjena temperature (°C)	Kontaktni izboj	20	5,91	1,72	-2,34	38	**0,025**
	Izboj kroz zrak	20	7,54	2,59			
Efektivni napon (mV)	Kontaktni izboj	20	78,61	13,66	4,01	38	**<0,001**
	Izboj kroz zrak	20	58,32	18,04			
Efektivna struja (mA)	Kontaktni izboj	20	0,79	0,14	4,01	38	**<0,001**
	Izboj kroz zrak	20	0,58	0,18			
Gustoća struje ($\mu A/mm^2$)	Kontaktni izboj	20	15,72	2,73	4,01	38	**<0,001**
	Izboj kroz zrak	20	11,63	3,61			
Snaga (μW)	Kontaktni izboj	20	63,56	20,63	4,01	38	**<0,001**
	Izboj kroz zrak	20	37,10	20,24			
Predana energija (mJ)	Kontaktni izboj	20	4,77	2,77	2,56	38	**0,015**
	Izboj kroz zrak	20	2,78	2,10			
Magnetsko polje (μT)	Kontaktni izboj	20	2,53	0,70	-3,77	38	**0,001**
	Izboj kroz zrak	20	3,26	0,51			
Frekvencija M polja (Hz)	Kontaktni izboj	20	31989	815,6	-11,20	38	**<0,001**
	Izboj kroz zrak	20	34397	508,7			

Legenda: n – broj entiteta, M – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija

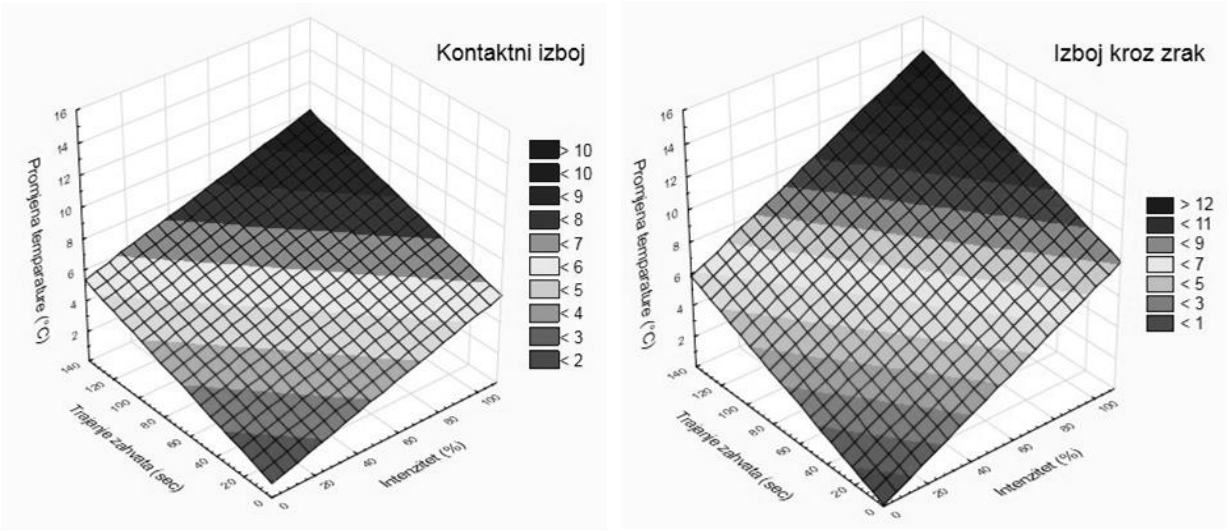
4.4.2 Predikcija promjene temperature intenzitetom i trajanjem zahvata

Promjena temperature statistički značajno zavisi o intenzitetu i trajanju zahvata u oba pokusa. Koeficijenti determinacije su u oba pokusa iznimno visoki: 92,7% u slučaju kontaktnog izboja i 96,0% u slučaju izboja kroz zrak. Intenzitet ima jači utjecaj na promjenu temperature pri kontaktnom izboju (β = 0,742) kao i pri izboju kroz zrak (β = 0,816). Regresijski koeficijent intenziteta veći je u pokusu s izbojem kroz zrak (B = 0,073) nego u onom s kontaktnim izbojem (B = 0,044) što ukazuje na činjenicu da razlika u temperaturi, za jedan postotni porast intenziteta, raste više u pokusu s izbojem kroz zrak. Nagib regresijskih ravnina na slici 64 prikazuje te razlike. Kvadratni modeli na slici 65 jasno ukazuju na utjecaj kvadratnih prediktora, no najviše u području izvan podataka te su oni do dva reda veličina manji od utjecaja linearnih prediktora u oba pokusa.

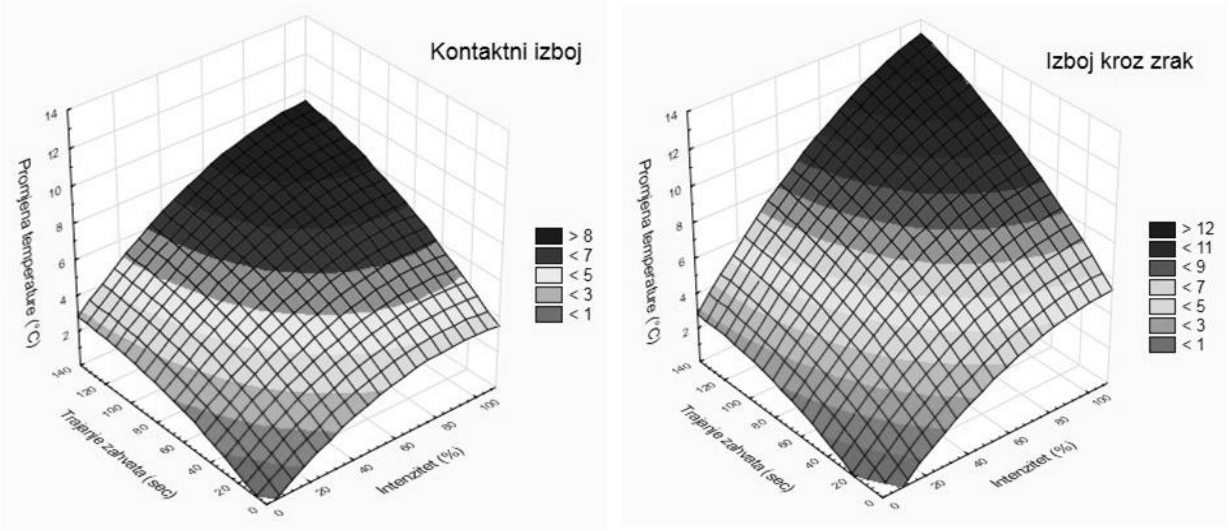
Tablica 25. Predikcija promjene temperature (°C) intenzitetom i trajanjem zahvata linearnim i kvadratnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

Vrsta izboja		**Prediktori**	**B**	**β**	**t**	**p**	**R^2**
Kontaktni izboj	Linearni model	Konstanta	0,930		2,753	**0,014**	**92,7%**
		Intenzitet (%)	**0,044**	**0,742**	**11,803**	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s)	0,032	0,631	10,168	**<0,001**	
	Kvadratni model	Konstanta	-0,3450		-,891	0,388	98,7%
		Intenzitet (%) (X)	0,0876	1,475	9,869	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s) (Y)	0,0456	0,910	5,659	**<0,001**	
		X^2	-0,0005	-0,993	-7,238	**<0,001**	
		XY	0,0002	0,335	3,901	**0,002**	
		Y^2	-0,0002	-0,507	-3,365	**0,005**	
Izboj kroz zrak	Linearni model	Konstanta	0,077			0,207	**96,0%**
		Intenzitet (%)	**0,073**	**0,816**	**17,831**	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s)	0,041	0,547	11,954	**<0,001**	
	Kvadratni model	Konstanta	-1,0025		-3,480	**0,004**	99,7%
		Intenzitet (%) (X)	0,1144	1,280	17,326	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s) (Y)	0,0534	0,709	8,918	**<0,001**	
		X^2	-0,0005	-0,703	-10,366	**<0,001**	
		XY	0,0003	0,326	7,679	**<0,001**	
		Y^2	-0,0002	-0,382	-5,128	**<0,001**	

Legenda: B – regresijski koeficijent, β – standardizirani regresijski koeficijent, t – t vrijednost, R^2 – koeficijent determinacije



Slika 64. Predikcija promjene temperature (°C) intenzitetom i trajanjem zahvata linearnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak



Slika 65. Predikcija promjene temperature (°C) intenzitetom i trajanjem zahvata kvadratnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

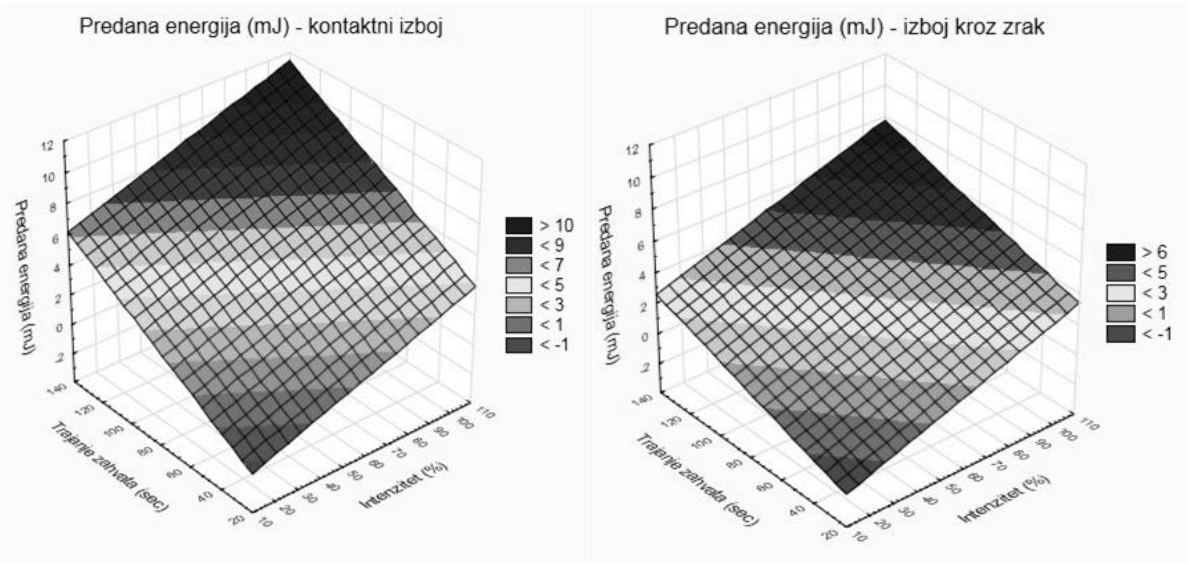
4.4.3 Predikcija predane energije ovisno o intenzitetu i trajanju zahvata

Promjena predane energije statistički značajno zavisi o intenzitetu i trajanju zahvata u oba pokusa. Koeficijenti determinacije iznose: 92,5% u slučaju kontaktnog izboja i 88,2% u slučaju izboja kroz zrak. Pri kontaktnom izboju jači utjecaj na predanu energiju ima trajanje zahvata dok u slučaju pokusa s izbojem kroz zrak jači utjecaj ima intenzitet (β vrijednosti). Regresijski koeficijenti intenziteta imaju podjednake vrijednosti u oba pokusa (B vrijednosti). Trajanje zahvata ima jači utjecaj na predanu energiju u pokusu s kontaktnim izbojem (B = 0,0636) nego u pokusu s izbojem kroz zrak (B = 0,0371). Razlike u nagibu regresijskih ravnina na slici 68 zorno prikazuju te razlike kao i razliku prosječnih vrijednosti predane energije. Kvadrat intenziteta u pokusu s kontaktnim izbojem značajno utječe na predanu energiju (B = -0,0002) kao i produkt intenziteta i trajanja zahvata (B = 0,0007) dok kvadrat trajanja zahvata nema utjecaja. U pokusu s izbojem kroz zrak od kvadratnih prediktora značajniji utjecaj ima samo produkt intenziteta i trajanja zahvata (B = 0,0007) povećavajući njenu vrijednost (slika 69). Utjecaji kvadratnih prediktora su više od sto puta manji od utjecaja linearnih prediktora u oba pokusa.

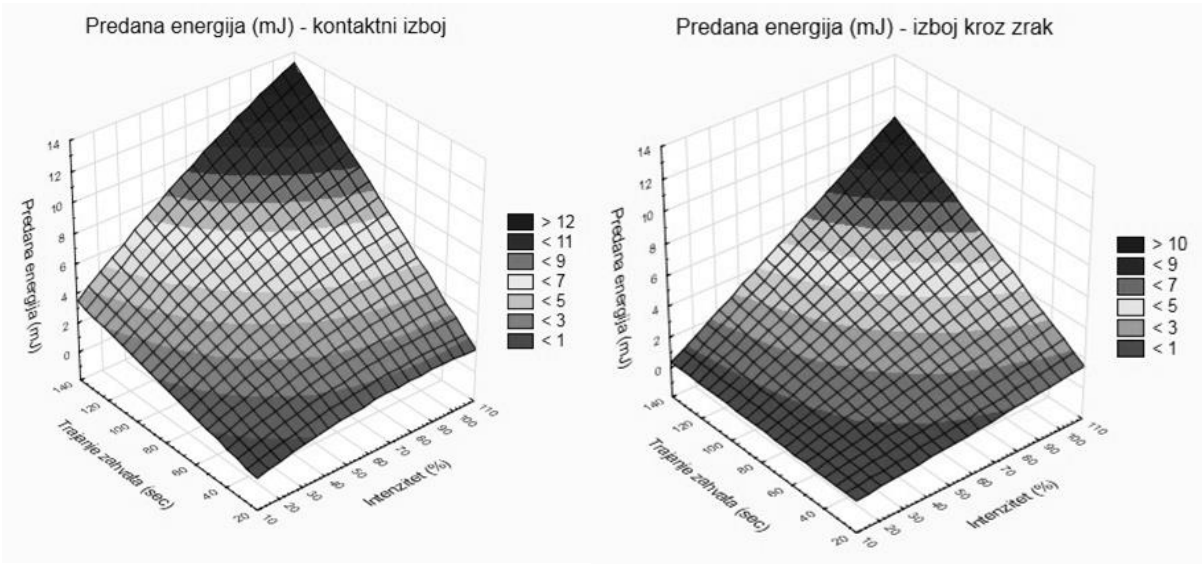
Tablica 27. Predikcija predane energije (mJ) prema intenzitetu i trajanju zahvata linearnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

Vrsta izboja		**Prediktori**	**B**	**β**	**t**	**p**	**R^2**
Kontaktni izboj	Linearni model	Konstanta	-3,1764		-5,784	**<0,001**	92,5%
		Intenzitet (%)	0,0529	0,555	8,835	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s)	**0,0636**	**0,790**	**12,579**	**<0,001**	
	Kvadratni model	Konstanta	-0,6787		-2,513	**0,025**	99,7%
		Intenzitet (%) (X)	0,0291	0,305	4,700	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s) (Y)	0,0212	0,264	3,775	**0,002**	
		X^2	-0,0002	-0,311	-5,219	**<0,001**	
		XY	0,0007	0,804	21,541	**<0,001**	
		Y^2	0,0000	0,000	0,000	1,000	
Izboj kroz zrak	Linearni model	Konstanta	-3,1375		-6,023	**<0,001**	88,2%
		Intenzitet (%)	**0,0523**	**0,724**	**9,200**	**<0,001**	
		Trajanje zahvata (s)	0,0371	0,609	7,740	**<0,001**	
	Kvadratni model	Konstanta	0,0660		0,702	0,494	99,9%
		Intenzitet (%) (X)	-0,0028	-0,039	-1,313	0,210	
		Trajanje zahvata (s) (Y)	-0,0047	-0,078	-2,419	**0,030**	
		X^2	0,0000	0,040	1,458	0,167	
		XY	0,0007	1,049	61,102	**<0,001**	
		Y^2	0,0000	0,000	0,000	1,000	

Legenda: B – regresijski koeficijent, β – standardizirani regresijski koeficijent, t – t vrijednost, R^2 – koeficijent determinacije



Slika 66. Predikcija predane energije (mJ) prema intenzitetu i trajanju zahvata linearnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak



Slika 67. Predikcija predane energije (mJ) prema intenzitetu i trajanju zahvata kvadratnim regresijskim modelom za kontaktni izboj i izboj kroz zrak

Linearni regresijski modeli pokazali su se statistički značajnijima od kvadratnih. Iako kvadratni modeli imaju visoke koeficijente determinacije te su u određenim slučajevima statistički značajni, zbog čega vjernije opisuju trendove, oni su zbog dva reda veličina manjih vrijednosti koeficijenata zanemarivi u usporedbi s linearnim koeficijentima uz intenzitet i trajanje zahvata. Regresijska analiza ukazuje na očiglednu razliku između fizičkih veličina zabilježenih pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak. Modeli također ukazuju na to da postoji značajno odstupanje između zabilježenih vrijednosti temperature tkiva i predane električne energije, gdje pri manjim vrijednostima predane električne energije dolazi do jačeg zagrijavanja tkiva (pri izboju kroz zrak) i obratno. Time se dodatno naglašava važnost zabilježenih razlika veličina magnetskog polja pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak, koje jedine prate opisane trendove porasta temperature tkiva s obzirom na modalitet primjene. Regresijski modeli tek djelomično opisuju trendove iza kojih stoje određeni prirodni zakoni koji se ne mogu opisati primijenjenim modelima, posebice ne na osnovu podataka prikupljenih kroz provedena ispitivanja. Valja naglasiti da su statističke analize i predloženi modeli, kao i njihova interpretativna vrijednost, opterećeni ponajprije veličinom uzorka te značajnim korelacijama elektromagnetskih varijabli. Zbog toga je rezultate provedenog istraživanja potrebno uzeti kao putokaz (tj. rezultate pilot-ispitivanja) za nova opširnija istraživanja na putu k boljem razotkrivanju složene strukture djelovanja elektromagnetskih čimbenika na biološka tkiva, kao i njihovog utjecaja na promjenu temperature tkiva.

5 RASPRAVA

5.1 Emisijski spektar elektrode

Rezultati optičke emisijske spektroskopije pokazali su da aktivna plazma-elektroda emitira svjetlost u području vidljive i infracrvene svjetlosti (valne duljine između 540 i 930 nm) (slika 41 i 42). Zabilježene spektralne linije u svjetlosti elektrode odgovaraju atomskim linijama neona (Ne I) te linijama atoma kisika (O I) prikazanima u tablici 14. Spektralna simulacija spektra neona pokazala je ekscitacijsku temperaturu elektrona između 5800 i 8700 K (0,5 i 0,75 eV). Spektralna simulacija spektra atoma kisika pokazala je ekscitacijsku temperaturu elektrona oko 0,25 eV. Najniža energija ekscitacije atoma neona iznosi 16,6 eV, što ukazuje na to da su u plinu aktivne elektrode prisutni elektroni relativno visoke energije (232). Energija potrebna za disocijaciju veze O = O iznosi 5,15 eV (233).

Spektar elektrode zabilježen je u sva tri mjerna postupka (emisija elektrode, emisija izboja kroz zrak i emisija izboja kroz tekući medij na površini uzorka tkiva). Prilikom izboja kroz zrak uz spektar koji se javlja kao posljedica mikroizboja uvijek se bilježi i spektar elektrode (slika 43 do 46) dok se pri kontaktnom izboju u tekućem mediju, u kojem ne dolazi do pojave mikroizboja, bilježi isključivo spektar plazma-elektrode (slika 47 i 48).

Emisija svjetlosti specifičnih valnih duljina može se pripisati stvaranju tinjavog izboja (eng. *glow discharge*) u lumenu staklene plazma-elektrode koji nastaje pobudom i posljedičnom relaksacijom plemenitog plina neona pod utjecajem elektromagnetskih impulsa uređaja (234). Spektralne linije atoma kisika (O I) na 777 i 844 nm najvjerojatnije su posljedica nečistoća u plemenitom plinu kojim je punjena elektroda, no s obzirom na funkciju uređaja (generator ozona) također postoji mogućnost da na vanjskoj površini aktivne elektrode dolazi do disocijacije molekula kisika. Korištenim mjernom postupkom nije moguće razlučiti njihov stvarni izvor. No, prilikom bilježenja spektra pri kontaktnom izboju u tekućem mediju, pri čemu se ne javljaju mikroizboji u zraku, također su zabilježene spektralne linije atoma kisika što navodi na zaključak da je, u tom slučaju, njihov izvor sigurno tinjavi izboj u plinu elektrode.

S obzirom na navedene rezultate može se zaključiti da su opisani spektri prisutni u terapijskom polju tijekom svih oblika terapijskih postupaka i modaliteta primjene. Ovaj zaključak dodatno potvrđuje makroskopska slika prosvjetljenja translucentnih tkiva narančasto-crvenom svjetlošću elektrode koja se bilježi tijekom zahvata (slika 24). Stoga je opravdano zaključiti da tijekom terapijskog postupka i djelovanja plazma-elektrode VFGO-a dolazi do iradijacije terapijskog polja svjetlošću vidljivog crvenog i bliskog infracrvenog dijela spektra. Kako primjena svjetlosti niskog intenziteta u području bliskog crvenog i

infracrvenog dijela spektra pokazuje brojne terapijske učinke na staničnim i tkivnim razinama, ovaj bi se čimbenik trebao uzeti u obzir kao biološki aktivna komponenta koja čini sastavni dio terapijskog polja visokofrekvencijskog generatora ozona (153 – 168).

5.1.1 Poznati učinci

Passarella i Karu (154) opisuju brojne učinke svjetlosti u području crvenog i bliskog infracrvenog dijela spektra na staničnoj razini (tablica 12, str. 40). Kao osnovne mehanizme opisuju pobudu unutarstaničnih i izvanstaničnih kromofora što apsorbiraju svjetlost specifičnih valnih duljina u crvenom i infracrvenom području. Karu (156) navodi da stimulacija citokrom C oksidaze ovom svjetlošću ubrzava transport elektrona u elektronskom transportnom lancu mitohondrija što dovodi do povećane proizvodnje ATP-a kao i proizvodnje ROS-a u stanici. Time se povećava proizvodnja energije i transdukcija unutarstaničnih signala. Ona također navodi da stanice u aktivnoj proliferaciji i kronično upaljenim tkivima pokazuju pojačanu osjetljivost na ovu vrstu fotostimulacije, kao što je to slučaj u poremećenih oksidacijskih stanja kronično upaljenih zglobova. Ovi mehanizmi objašnjavaju i učinke fotostimulacije navedenom svjetlošću koji se postižu u liječenju poremećaja temporomandibularnog zgloba (162). Upravo bi se ovim mehanizmima mogli objasniti terapijski učinci primjene VFOG-a, zabilježeni prilikom primjene u liječenju temporomandilularnih disfunkcija, a koji se ne mogu objasniti topikalnim djelovanjem ozona.

Pal i sur. (235) dokazali su svjetlom induciranu proliferaciju fibroblasta koja je povezana s prolaznim povećanjem proizvodnje ROS-a. Iradijacija svjetlošću valne duljine u području 620 nm pokazuje pozitivne rezultate u liječenju kroničnih rana uključujući radijacijske ulkuse i dijabetičke neuropatske i mikroangiopatske ulkuse (236,237). König i suradnici (238) navode djelotvornost valne duljine 632,8 nm u redukciji *Prevotella intermedia* do 50% CFU u plaku te eliminaciji bakterija koje prirodno proizvode fluorescentni fotosenzibilizator protoporfirinogen IX kao što su *Actinomyces odontolyticus i Porphyromonas gingivalis*. Navedene valne duljine zabilježene su i u terapijskom polju VFOG-a. Zbog toga se smatra opravdanim pretpostaviti da tijekom zahvata, a posebice u području upalnih procesa gingive i parodonta te postoperativnoj obradi rana u kojima zbog kontaktnog izboja kroz tekućine (slina, eksudat i/ili krvi) ne dolazi do pojave mikroizboja, spektar elektrode može biti uključen u određene mehanizme dezinfekcije i stimulacije regenerativnih procesa. Ovim bi se mehanizmima također mogli objasniti određeni učinci zabilježeni u liječenju kroničnih dijabetičkih ulkusa.

Svjetlost u području crvenog i infracrvenog spektra koristi se u sklopu brojnih fototerapijskih postupaka u liječenju upalnih procesa, kroničnih trigeminalnih neuralgija, cijeljenja koštanog tkiva pri ugradnji implantata, vođene tkivne regeneracije, liječenja parodontnih bolesti, afti, ulkusa, herpetičkih lezija, leukoplakija i verukoznih karcinoma zbog čega svjetlost elektrode valja uzeti kao važan čimbenik koji tijekom zahvata može djelovati u sinergiji s drugim čimbenicima prisutnim u terapijskom polju VFOG-a (239,240).

5.2 Emisijski spektar pri izboju kroz zrak

Prilikom pojave mikroizboja u volumenu između tkiva/objekta i aktivne plazma-elektrode, uz već opisani spektar koji emitira elektroda, prisutan je i onaj u optičkom području od 290 do 440 nm (slika 43), s izraženim linijama u području od 315 do 380 nm, što odgovara UVA spektru. Kao dominantan spektar identificiran je spektar neutralne dušikove molekule (N_2). Spektralna simulacija dušikovog spektra pokazala je ekscitacijsku temperaturu oko 3000 K (0,25 eV). Usporedba simulacije dala je najbolje slaganje za rotacijsku temperaturu 300 K i vibracijsku temperaturu 3400 K. Pritom u volumenu nisu zabilježeni spektri drugih molekula koji bi se mogli očekivati u području od 200 do 500 nm (primjerice, NO i OH), a samo u slučaju kada su mikroizboji bili koncentrirani na malu površinu bakrene žice (0,8 mm^2) zabilježena je spektralna linija N_2^+ iona slabog intenziteta na 391 nm (slika 44). Prilikom pojave mikroizboja također su zabilježene linije u bliskom infracrvenom području na 777, 844 i 926 nm što odgovaraju spektralnim linijama atoma kisika (O I) (slika 45 i 46). Spektralne linije atoma kisika zabilježene su i u spektru elektrode. Eventualne spektralne linije atoma kisika koje bi proizlazile iz samog mikroizboja, a čije se bilježenje očekuje s obzirom na to da uređaj proizvodi ozon nije moguće razlučiti zbog superponiranja spektralnih linija atoma kisika sa spektrom kisika i neona koji emitira elektroda.

Zbog intenzivnog spektra tinjavog izboja elektrode koji je uvijek prisutan u promatranom volumenu nije bilo moguće izolirati i zasebno izmjeriti spektar mikroizboja. Korištenom spektroskopskom tehnikom osim rijetke pojave ioniziranih molekula dušika nisu zabilježeni drugi ioni. Sukladno evidentnoj makroskopskoj slici pojave mikroizboja u volumenu, kao i zabilježenim fizičkim i kemijskim pojavama u zračnom međuprostoru (ekscitacija i ionizacija molekula dušika) može se pretpostaviti da kao posljedica generiranja elektrona, koji su neophodni za odvijanje navedenih reakcija, u terapijskom polju moraju nastajati i druge pobuđene čestice i ioni (2). Ovu pretpostavku opravdava i činjenica da je prilikom pojave

mikroizboja zabilježena prisutnost ekscitiranih ili ioniziranih molekula dušika za čije su nastajanje neophodni elektroni relativno visoke energije. Energija potrebna za disocijaciju veze O = O iznosi 5,15 eV te je gotovo dvostruko manja od one potrebne za ekscitaciju molekule dušika koja iznosi 8,56 eV ili pak njezinu ionizaciju koja iznosi 14,51 eV (233). Sukladno tome može se zaključiti da su u terapijskom polju prisutni elektroni čija je energija zasigurno dovoljna za disocijaciju molekula kisika. Ovu pretpostavku potvrđuju i rezultati ispitivanja u kojima se ovisno o odabranom intenzitetu (za elektrodu kružne aktivne površine ≈ 50 mm^2) bilježi stopa proizvodnje ozona od 1 do 2,1 μg/s (224). Baldus i suradnici (17) navode da je jedna od primarnih reaktivnih čestica u kemijskim reakcijama plazme upravo atomarni kisik koji u daljnjim reakcijama sudjeluje u stvaranju raznovrsnih reaktivnih vrsta. Također navode da atomi kisika u plazmi nastaju disocijacijom molekula kisika prilikom sudara elektrona u električnom polju, a glavnina ovako nastalih atoma reagira s molekularnim kisikom pri čemu nastaje ozon.

Treumann i suradnici (2) navode da se elektroni u mikroizboju raspršuju unutar 40 ns dok se ioni u izbojnoj pukotini zadržavaju nekoliko mikrosekundi. Zbog toga na rezultate dobivene opisanim mjernim postupcima (integracija signala od nekoliko sekundi) valja gledati kao na makroskopsku (pozadinsku) sliku tj. eho vrlo složenih i vrlo brzih reakcija koje se odvijaju u procesu nastanka mikroizboja (24). Produljenim vremenom integracije omogućeno je bilježenje najzastupljenijih spektralnih linija mikroizboja relativno slabog intenziteta (u usporedbi s intenzitetom spektra elektrode) no time je smanjena vremenska rezolucija tj. mogućnost bilježenja spektralnih linija koje se javljaju u vrlo kratkim vremenskim intervalima U svrhu preciznijeg definiranja kemijskih čimbenika prisutnih u terapijskom polju valjalo bi provesti istraživanja naprednijim spektroskopskim tehnikama pri kojima bi vrijeme integracije signala bilo usklađeno s vremenom trajanja mikroizboja (241).

Rezultati ispitivanja optičkom emisijskom spektroskopijom nedvojbeno potvrđuju da se prilikom pojave izboja kroz zrak u terapijskom polju stvara blago ionizirana hladna atmosferska plazma u kojoj su prisutni naboji tj. elektroni i pobuđene i/ili ionizirane molekule dušika te emisija u vidljivom i UV dijelu spektra (290 – 440 nm). Budući da ovi čimbenici pokazuju brojne terapijske učinke na staničnim i tkivnim razinama, trebali bi se uzeti u obzir kao biološki aktivna komponenta terapijskog polja VFGO-a (13, 18, 28, 60 – 63, 244).

5.2.1 Poznati učinci

Mendis i sur. (242) te Laroussi i sur. (243) sugeriraju da nabijene čestice (elektroni i ioni) mogu igrati važnu ulogu u rupturi vanjske membrane bakterija. Pokazali su da elektrostatska sila uzrokovana nakupljanjem naboja na vanjskoj površini stanične membrane može nadjačati vlačnu čvrstoću (eng. *tensile strenght*) membrane i uzrokovati njezinu rupturu. Ova je pojava vjerojatnija u gram-negativnih bakterija zbog njihove nepravilne površine membrane dok se u gram-pozitivnih bakterija, poput *B. subtilis,* ne primjećuju rupture. Fridman i sur. (244) ukazuju na to da nabijene čestice igraju važnu ulogu u sterilizaciji, posebice kada se plazma nalazi u izravnom kontaktu s mikroorganizmima. Opažaju da izravna primjena plazme putem dielektričnog barijernog izboja pokazuje bolje rezultate u sterilizaciji od neizravne primjene (npr. mlazne plazme) te zaključuju da je moguće da mehanizmi inducirani nabijenim česticama pridonose sterilizacijskom procesu pri izravnom izlaganju plazmi. Važnu ulogu nabijenih čestica također potvrđuju Stoffels i suradnici (53) koji navode da nakupljanje elektrona na površini staničnog zida mikroorganizama može uzrokovati neutralizaciju naboja, prirodno negativno nabijenih bakterija, zbog čega dolazi do narušavanja integriteta membrana i posljedičnog istjecanja citoplazme te stanične smrti. Također navode da se ovaj proces ne odvija u eukariotskih stanica koje, zbog složenije građe i reakcija, imaju puno višu toleranciju na električna polja ali i ostale čimbenike prisutne u plazmi, poput topline, UV svjetlosti i reaktivnih kisikovih vrsta te su za postizanje letalnog učinka potrebne puno više doze.

Kratkotrajne izravne interakcije plazme i eukariotskih stanica mogu dovesti do segmentacije stanica (eng. *cell detachment*) uzrokovane nakupljanjem naboja na njihovoj površini ili pak djelovanjem kemijski aktivnih spojeva zbog čega dolazi do privremenih promjena u morfologiji (poprimaju sferičan oblik), sposobnosti adhezije i propusnosti membrane stanica dok pri produljenom djelovanju mogu uzrokovati programiranu smrt (apoptozu) ili nekrozu stanica (53). Fridman i suradnici (245) tako dokazuju da povišene doze uzrokuju nekrozu humanih stanica melanoma dok niže doze (4 J/cm^2) uzrokuju apoptozu, a pritom ne dolazi do oštećenja zdravih stanica. Fridman također opisuje novu metodu koagulacije krvi primjenom dielektričnog barijernog izboja u zraku pri čemu je dokazana koagulacija u velikih krvarećih područja (npr. kirurške rane na ljudskoj slezeni) bez uzrokovanja dodatne nekroze, a ovaj netoplinski učinak na koagulaciju objašnjava se sniženjem pH, putem reakcija izmjene naboja s pozitivnim česticama plazme, zbog čega dolazi do pojačanog oslobađanja kalcijevih kationa (Ca^{2+}) koji induciraju oslobađanje trombina i taloženje fibrina (246). Ovim mehanizmom moglo bi se objasniti brže zaustavljanje krvarenja koje se bilježi primjenom VFGO-a.

Hoffoman i suradnici (28) navode moguću primjenu hladne atmosferske plazme u dentalnoj medicini u svrhu deaktivacije biofilma (*S. mutans, B. cereus, G. sterarothermophilus, L.acidofilus, P. gingivalis, E.coli, L. casei, C. albicans, E. faecalis*), izbjeljivanja, sterilizacije instrumenata kao i pojačanog vezanja adheziva i dentina te pojačane vlačno-smicajne čvrstoće veze (eng. *tensile-shear bond stength*) između nadogradnje i kompozita.

Iako UV zračenje predstavlja vrlo potentan dezinfekcijski agens, njegova uloga u sterilizaciji putem hladne atmosferske plazme smatra se umjerenom, uglavnom zbog slabog intenziteta zračenja (53). Tijekom ispitivanja upravo je intenzitet svjetlosti u optičkom području od 290 do 450 nm predstavljao izazov u pogledu njegovog bilježenja, što na neki način potvrđuje da je on, iako prisutan u terapijskom polju, vrlo slabog intenziteta. Stoga bi se njegovi učinci mogli očekivati na samoj površini ili eventualno vrlo tankom površinskom sloju ciljne površine.

Guffey i suradnici (247) u *in vitro* ispitivanjima svjetlosti u spektralnom području od 405 od 470 nm potvrđuju njeno baktericidno djelovanje na *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus.* S baktericidnom aktivnošću UVA svjetlosti u određenih bakterija povezuju se porfirini koji apsorbiraju svjetlost ovom dijelu spektra (165). Fotoaktivni porfirini učinkovito stvaraju reaktivne kisikove vrste (posebice superoksid) putem prijenosa energije na kisik (166). Zbog toga se u biomedicinske svrhe koriste kao senzibilizatori u fotodinamičkoj terapiji malignih tumora te pri razlaganju plakova i liječenja psorijatičnih lezija (167). U sklopu istraživanja u području genske terapije dokazano je da UVA svjetlost (320 – 400 nm) slabog intenziteta ne uzrokuje mutacije DNK te pri nižim dozama ne pokazuje značajne citotoksične učinke već inducira transdukciju gena aktivacijom DNK polimeraze, koja je povezana s prolaznim povećanjem unutarstaničnog ROS-a (164).

Stoffels i suradnici (53) navode da otapanje ozona (koji nastaje u hladnoj atmosferskoj plazmi) u vodenim otopinama u okolini bakterija može uzrokovati izmjene naboja s organskim anionima na površini mikroorganizama i dovesti do neutralizacije naboja staničnog zida, stoga reaktivne kisikove vrste smatraju glavnim dezinfekcijskim agensom prisutnim u hladnoj atmosferskoj plazmi (53). Antibakterijski učinci pripisuju se kemijskoj eroziji staničnog zida ili ovojnica spora mikroorganizama pri čemu dolazi do karakterističnih promjena na staničnom zidu, u vidu njegovog „otapanja“, koje su nešto jače izražene u gram-negativnih bakterija (54). Svi virusi osjetljivi su na ozon dok virusi s lipidnom ovojnicom pokazuju posebnu osjetljivost, a analiza virusnih komponenti dokazala je i oštećenja na virusnom RNK-u, polipeptidnim lancima i proteinima ovojnice, čime se onemogućava

njihovu sposobnost adherencije (60). Ozon također inhibira određene stadije staničnog rasta gljivica i protozoa (61). Uspješno se koristi kao antibaktericidno sredstvo u liječenju oralnih infekcija koje uzrokuju *Actinomyces naeslundii, Lactobacilli casei* i *Streptococcus mutans* (62). Ovim mehanizmima mogu se objasniti dezinfekcijski učinci koji se bilježe u primjeni VFGO-a.

Ozon (O_3) koji u hladnoj atmosferskoj plazmi nastaje spajanjem atoma kisika (O) i molekula kisika (O_2), kao prekursor reaktivnih kisikovih vrsta i lipidnih oksidacijskih produkata, pokazuje brojne učinke na metabolizam eukariotskih stanica (48 – 71). Dosad se u stomatologiji primjena ozona uglavnom svodila na dezinfekciju kaviteta i korijenskih kanala, no novije znanstvene spoznaje ukazuju na mogućnost primjene ozona u liječenju alveolitisa, avaskularne nekroze čeljusti kao i herpesa (68). Ozon smanjuje stvaranje plaka te se može koristiti kao dodatna terapija nakon parodontoloških i kirurških zahvata (69). Novija *in vitro* i *in vivo* istraživanja dokazuju učinke ozona na eritrocite i cirkulaciju, trombocite, imuni odgovor kao i njegovu potencijalnu primjenu u liječenju kroničnih rana, teških virusnih oboljenja kao i malignih i benignih tumorskih bolesti (49).

Iz navedenog se može zaključiti da hladna atmosferska plazma, a time i ozon čija je prisutnost dokazana u ranijim ispitivanjima, imaju važnu ulogu u mehanizmu djelovanja ove vrste terapijskog zahvata (224). U terapijskom polju se hladna atmosferska plazma i reaktivne čestice, u najvećoj mjeri, mogu stvarati pri izboju kroz zrak no stopa njihove proizvodnje može se drastično smanjiti ili u potpunosti izostati pri kontaktnom izboju, posebice u slučaju izboja u tekućem mediju. U modalitetima primjene u kojima su osigurani uvjeti za stvaranje mikroizboja (postojanje zračnog međuprostora) hladna atmosferska plazma i reaktivne čestice zasigurno imaju ulogu važnog terapijskog čimbenika, no u slučaju kontaktnog izboja, posebice pri izboju u tekućem mediju, gdje elektroda dolazi u izravan kontakt sa slinom, krvlju i/ili drugim tjelesnim tekućinama, terapijski učinci se sigurno ne mogu pripisivati hladnoj atmosferskoj plazmi, a time ni ozonu, jer se pri kontaktu elektrode i tekućine ne stvaraju mikroizboji (slike 47 i 48).

Sa stajališta dentalne medicine načelo dielektričnog barijernog izboja i nastanak hladne atmosferske plazme u terapijskom polju tijekom primjene VFOG-a može objasniti pozitivne terapijske učinke u liječenju brojnih bolesti usne šupljine uzrokovanih bakterijskim, virusnim i gljivičnim infekcijama, zaustavljanju krvarenja i ubrzanom cijeljenju rana te redukciji boli i postoperativnih komplikacija, dok najnovije znanstvene spoznaje o mogućoj primjeni hladne atmosferske plazme u obradi površina, liječenja kroničnih rana i određenih karcinomskih

bolesti predstavljaju osnovu za proširenje kliničkih ispitivanja učinaka ove vrste terapije. (13, 28, 245)

Fizički i kemijski čimbenici zabilježeni prilikom formiranja mikroizboja u dielektričnom barijernom izboju visokofrekvencijskog generatora ozona potvrđuju da je u terapijskom polju prisutna blago ionizirana hladna atmosferska plazma. Elektroni koji uzrokuju ekscitaciju i ionizaciju molekula dušika te imaju dovoljnu energiju za disocijaciju molekula kisika i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, a koji zbog načela nastanka dolaze u kontakt s ciljnom površinom, također se moraju uzeti u obzir kao djelotvorno sredstvo tijekom terapijskog postupka. Emisija u UV spektru koja je zabilježena prilikom formiranja mikroizboja, iako slabog intenziteta i lokalizirana, idući je fizički čimbenik koji može djelovati na mikroorganizme i eukariotske stanice tijekom terapijskog zahvata, posebice na samoj površini tkiva ili objekta. Prisutnost bliske crvene i infracrvene svjetlosti, koja se u terapijskom polju VFGO-a javlja prilikom svih modaliteta primjene, može objasniti određene terapijske učinke koji se zapažaju u liječenju primjerice temporomandibularnih disfunkcija i trigeminalnih neuralgija, a koji se ne mogu objasniti mehanizmom topikalnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta i ozona, dok u aftoznih ulkusa, herpetičnih lezija, cijeljenja postoperativnih rana te liječenja parodontnih bolesti ova svjetlost predstavlja dodatni čimbenik, što može djelovati u sinergiji s drugim čimbenicima prisutnima u terapijskom polju.

5.3 Elektromagnetske veličine

U mjerenjima elektromagnetskih veličina zabilježeni su osnovni elektromagnetski impulsi koje proizvodi VFGO. Frekvencija impulsa iznosi 1052 Hz (impulsi se javljaju u intervalima od 950 μs). Interval impulsa iznosi oko 150 μs te se bilježi da njegovo trajanje ovisi o intenzitetu i modalitetu primjene. Impuls se može opisati eksponencijalno prigušenom sinusoidom čija frekvencija u području oko 34 kHz također varira s obzirom na odabrani intenzitet kao i modalitet primjene. Amplituda i frekvencija prigušene sinusoide ovisna je o odabranom intenzitetu kao i modalitetu primjene.

S obzirom na specifičan oblik zabilježenih valnih oblika pri računanju jakosti električnog polja uzeta je u obzir maksimalna vrijednost prve poluperiode eksponencijalno prigušene sinusoide čije trajanje u prosjeku iznosi 15 μs. Time su definirane vrijednosti polja prisutnog u terapijskom polju unutar vrlo kratkog razdoblja (oko 1,6% ukupnog vremena). Pri računanju jakosti magnetskog polja korištena je amplitudno-frekvencijska karakteristika napona izmjerenog na *loop* anteni, tj. amplitude harmonika na frekvencijama od interesa.

S obzirom na eksponencijalno prigušeni sinusni oblik vala ovako zabilježene vrijednosti će se unutar intervala impulsa (150 μs) smanjivati do nule. Ostatak vremena tj. do pojave novog impulsa u terapijskom polju nije prisutno električno ni magnetsko polje. Iz navedenog se može zaključiti da su elektromagnetske veličine zabilježene u terapijskom polju impulsnog karaktera te su u terapijskom polju prisutne samo određeni dio vremena ukupnog trajanja zahvata (oko 16% ukupnog vremena). Sukladno navedenom, električno i magnetsko polje VFGO-a moglo bi se svrstati u skupinu impulsnih elektromagnetskih polja.

Zbog same konstrukcije VFGO-a, gdje se u neposrednoj blizini elektrode nalazi Teslin transformator (u aplikatoru uređaja), pri mjerenjima nije bilo moguće izolirati elektromagnetska polja elektrode od polja koja se stvaraju u samom transformatoru. Zbog toga je opravdano pretpostaviti moguće superponiranje navedenih elektromagnetskih polja. No, rezultati mjerenja kvantificiraju stvarno stanje u neposrednoj blizini elektrode bez obzira na njihov izvor.

5.3.1 Električno polje elektrode

Rezultati mjerenja električnog polja elektrode potvrđuju da je ono u terapijskom polju prisutno čak i u slučaju kada se elektroda i ciljna površina nalaze na udaljenostima pri kojima ne dolazi do izboja. Vrijednost tako izmjerenog električnog polja za intenzitete od 10% do 100% pri najmanjoj udaljenosti na kojoj je provedeno mjerenje (10 mm) iznosi od 248 do 586 V/m (srednja vrijednost izmjerenog električnog polja iznosi 451 V/m) (tablica 15 i slika 50). Srednja frekvencija izmjerenog električnog polja iznosi 34226 Hz.

S obzirom na makroskopsku sliku pojave mikroizboja u zračnom međuprostoru između elektrode i ciljne površine smatra se opravdanim pretpostaviti da bi električno polje u neposrednoj blizini površine elektrode zasigurno trebalo biti veće ili jednako dielektričnoj čvrstoći zraka koja iznosi 3×10^6 V/m (20). Ovu pretpostavku potvrđuju i rezultati optičke emisijske spektroskopije koji tijekom pojave mikroizboja potvrđuju prisutnost elektrona relativno velike energije (8 – 14 eV) što uzrokuju ekscitaciju i ionizaciju molekula dušika. Xiao (20) navodi da će pojava proboja u zračnom međuprostoru osim o jakosti električnog polja i udaljenosti elektroda ovisiti i o brojnim drugim faktorima poput oblika elektrode, uniformnosti električnog polja te brzine promjene napona (eng. *raise time*) što dodatno otežava preciznu procjenu električnog polja u neposrednoj blizini elektrode.

Iako na osnovu dobivenih rezultata nije bilo moguće odrediti točnu funkciju jakosti polja, s obzirom na udaljenost između aktivne površine elektrode i antene, trend naglog povećanja jakosti polja je očigledan i proporcionalan smanjenju udaljenosti. Ovaj trend, iako ne u potpunosti, mogao bi se opisati funkcijom $E(d) = E/d$ gdje je E jakost električnog polja, a d udaljenost od površine elektrode. Iz pojednostavljene funkcije vidljivo je da bi jakost električnog polja koja je izmjerena na 10 mm (primjerice, 451 V/m) bila 10 puta veća na udaljenosti od 1 mm (4510 V/m) ili pak 10.000 puta veća na udaljenosti od 1 μm ($4{,}51 \times 10^6$ V/m). Iako su ovako dobivene vrijednosti sukladne pretpostavci da u neposrednoj blizini elektrode jakost polja doseže vrijednost $\geq 3 \times 10^6$ V/m, procesi koji se događaju na manjim udaljenostima, posebice pri pojavi mikroizboja na površini elektrode, previše su složeni da bi se mogli opisati jednostavnim matematičkim izrazima (4,20). To potvrđuju i brojni korekcijski faktori koji su definirani ranije navedenim čimbenicima, a treba ih uzeti u obzir prilikom ekstrapolacije jakosti električnog polja (20).

Valja posebno naglasiti da su na ovaj način izmjerene jakosti električnog polja realne isključivo do trenutka (tj. pri udaljenosti elektrode od površine tkiva/objekta) u kojem još ne dolazi do pojave izboja. Pri pojavi izboja (bilo kontaktnog ili kroz zrak) zbog protoka

električne struje kroz sustav (plazma-elektroda – zrak ciljna površina i tkivo – referentna elektroda) mogu se očekivati značajne promjene elektromagnetskih veličina (20).

Tijekom dielektričnog izboja u zraku dolazi do električnog proboja u kojem se drastično smanjuje otpor zraka te povećava protok struje zbog čega dolazi do složenih fluktuacija u električnom polju (24). Pri kontaktnom izboju s tkivom jakost električnog polja (u dubinu tkiva), osim o udaljenosti od izvora električnog polja, dodatno će ovisiti o frekvenciji električnog polja, morfološkim karakteristikama tkiva (vrsta i slojevitost tkiva) te specifičnoj otpornosti tkiva, impedanciji, specifičnoj stopi apsorpcije, načinu propagacije kroz tkivo kao i temperaturi. Ovi čimbenici ovise o složenim interakcijama elektromagnetske energije i tkiva koji se ne mogu opisati jednostavnim matematičkim modelima (77 – 81, 108,109).

Primjerice, uz pretpostavku idealnih uvjeta (stalni napon i struja te idealni otpornik) jakost električnog polja mogla bi se računati korištenjem matematičkog izraza $E = \rho \times J$ gdje je ρ specifična otpornost tkiva a J gustoća struje (izvedeno iz izraza 3, str. 34). No biološko tkivo ne zadovoljava uvjete idealnog otpornika pa bi u tom pogledu procjena jakosti električnog polja bila opterećena velikom nesigurnošću. K tome, u dostupnoj literaturi pronađene su različite vrijednosti specifične otpornosti tkiva koje ovisno o frekvenciji variraju od svega nekoliko pa do 10^6 Ωm (108,109). Primjera radi, uzme li se u obzir specifična otpornost *stratum corneuma* koju navode Pliquett i suradnici (85) (ρ = 1 x10^6 Ωm) te gustoća struje pri maksimalnom intenzitetu zabilježena pri kontaktnom izboju (J = 18,93 μA/mm^2), vrijednost električnog polja (pri idealnim uvjetima) u vrlo tankom sloju *stratuma* (oko 20 μm) iznosila bi oko 1,89 x 10^7 V/m. Faes i suradnici (108), s druge strane, za specifičnu otpornost *stratuma* pri frekvenciji od oko 10 kHz navode vrijednost od oko 1 x 10^4 Ωm. Istom matematičkom operacijom, korištenom u ranijem primjeru, dolazi se do jakosti električnog polja koja je dva reda veličina manja (1,89 x 10^4 V/m).

Nadalje, pri procjeni jakosti električnog polja unutar tkiva valja uzeti u obzir slojevitost i različite morfološke karakteristike i dielektrična svojstva svakog pojedinog sloja kao važne čimbenike koji utječu na propagaciju električnog polja kroz tkivo. Uzme li se u obzir nagli pad otpornosti tkiva koja se nalaze neposredno ispod *stratuma basale* (ρ(dermis)=150 Ωm, ρ (tkivne tekućine) = 0,72 Ωm), može se pretpostaviti da će već u prvom sloju dermisa doći do naglog smanjenja jakosti električnog polja (82). Korištenjem ranije opisanog matematičkog izraza, dobivaju se vrijednosti za jakost električnog polja u dermisu oko 2800 V/m te u tkivnim tekućinama svega 13 V/m. Ove vrijednosti sukladno funkciji $E(d)=E/d$ dodatno se smanjuju s udaljenošću od izvora električnog polja.

Ovi su primjeri dani isključivo kako bi se na jednostavnom modelu prikazala složenost i moguća odstupanja prilikom procjene jakosti električnog polja u tkivu. Ovako beskrajno pojednostavljen model može poslužiti isključivo kao putokaz u donošenju određenih pretpostavki no ne i čvrstih tvrdnji u pitanju realne jakosti električnog polja u tkivu.

S obzirom na vrlo pojednostavnjeni model isključivo se može pretpostaviti da će prilikom kontakta elektrode i tkiva jakost polja na mjestu kontakta u manjoj mjeri ovisiti o odabranom intenzitetu dok će u najvećoj mjeri ovisiti o vrsti tkiva s kojim elektroda dolazi u kontakt. Jakost polja će u tom slučaju s obzirom na intenzitet varirati unutar reda veličina dok će s obzirom na vrstu tkiva (specifičnu otpornost) varirati i do nekoliko redova veličina. S obzirom na impulsni karakter električnog polja ($T/2 = 1,5 \times 10^{-5}$ s) može se pretpostaviti da će električno polje na samoj površini tkiva s velikom električnom otpornošću (primjerice *stratum corneum* ili tvrdo zubno tkivo) dostizati vrijednosti čiji bi učinci prema Wangu (77) mogli varirati u širokom rasponu od unutarstanične manipulacije preko dostave lijeka u stanicu i dekontaminacije bakterija te elektroporacije (slika 12, str. 32). No ovi se učinci mogu očekivati u vrlo tankom površinskom sloju tkiva čija je specifična električna otpornost visoka dok se u tkivima koja imaju malu otpornost i/ili se nalaze u dubljim slojevima tkiva (primjerice, dermis, krv, slina ili međustanična tekućina) može očekivati znatno smanjenje jakosti polja čije se vrijednosti nalaze ispod probojnog napona membrane (77). U tom slučaju postoji mogućnost da bi električno polje moglo imati određeni dielektroforetski i/ili polarizacijski učinak na stanice ili pak utjecaj na ionsku izmjenu (eng. *ion efflux*) putem ionskih (naponskih) transmembranskih kanala koji su osjetljivi na vanjska oscilirajuća električna polja (77). O složenosti interakcija električnih i magnetskih polja s biološkim sustavima svjedoče i eksperimentalni rezultati najnovijih istraživanja koji se teoretski objašnjavaju modelima kvantne elektrodinamike i koherentnih domena vode, ionske ciklotronske i parametrijske rezonancije, polarizacije elektronskog spina slobodnih radikala i biokemijske amplifikacije (80). Zbog navedenih je razloga, na osnovu zabilježenih vrijednosti električnog polja vrlo teško donijeti konkretne zaključke o mogućim interakcijama s biološkim tkivom. U svrhu boljeg razumijevanja mehanizama vezanih uz utjecaj električnih polja na tkiva i stanice kao i njegovu „sudbinu“ u tkivu, valjalo bi provesti dodatna istraživanja u kojima bi se paralelno pratila dinamika svih elektromagnetskih veličina u terapijskom polju.

5.3.2 Magnetsko polje

Rezultati mjerenja magnetskog polja pokazali su da je tijekom oba modaliteta primjene u terapijskom polju VFGO-a prisutno magnetsko polje.

Rezultati mjerenja magnetskog polja pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak kao funkcije odabranog intenziteta ukazuju na značajnu razliku u pojavnosti kao i jakosti magnetskog polja s obzirom na modalitet primjene (tablica 17, str. 99). Tijekom kontaktnog izboja kao i izboja kroz zrak u terapijskom polju se bilježi osnovni signal magnetskog polja u području oko 33 kHz. Srednja vrijednost jakosti (H) i frekvencije (f) magnetskog polja kao i gustoće magnetskog toka (B) zabilježene pri kontaktnom izboju iznose: H (1,93 ± 0,59 A/m), B (2,43 ± 0,75 μT), f (32151 ± 985 Hz); dok pri izboju kroz zrak iznose: H (2,5 ± 0,52 A/m), B (3,14 ± 0,65 μT), f (34526 ± 833 Hz). Izmjerene veličine su statistički značajno veće u slučaju izboja kroz zrak (tablica 24, str. 112). Navedeni rezultati ukazuju na to da je magnetsko polje jedina među zabilježenim elektromagnetskim veličinama koja je pri izboju kroz zrak veća nego pri kontaktnom izboju te predstavlja značajnu komponentu u terapijskom polju kojom se može objasniti paradoks jačeg zagrijavanja tkiva pri manjoj predanoj energiji putem električne struje. Naime, pri izboju kroz zrak bilježe se značajno veće vrijednosti temperature na površini tkiva u usporedbi s kontaktnim izbojem, no efektivne vrijednosti struja a time i predane energije su značajno manje. Značajno veće vrijednosti temperature tkiva pri izboju kroz zrak mogu se objasniti dodatnim toplinskim učinkom putem magnetske indukcije. Vremenski promjenjivo magnetsko polje, koje uzrokuje orijentaciju postojećih električnih dipola u tkivu, polarizacijom atoma i molekula koji stvaraju električne dipole te djelovanjem na provodne elektrone, uzrokuje stvaranje vrtložnih struja koje teku kroz tkiva pri čemu, zbog električnog otpora tkiva, tj. sudaranja elektrona s molekulama i atomima, dolazi do njegovog zagrijavanja (79). Stoga je opravdano pretpostaviti da magnetsko polje ima značajan utjecaj na promjenu temperature koja je zabilježena na površini tkiva te je glavni čimbenik koji utječe na razliku u temperaturi površine tkiva s obzirom na modalitet primjene (tablica 29, str. 123). Rezultati mjerenja magnetskog polja ukazuju i na varijabilnost njegove frekvencije s obzirom na intenzitet (smanjuje se s povećanjem intenziteta) te s obzirom na modalitet primjene (veće vrijednosti se bilježe pri izboju kroz zrak).

Prilikom izboja kroz zrak u frekvencijskom području od 40 do više od 400 MHz bilježi se prisutnost dodatne komponente magnetskog polja. Veličina magnetskog polja na frekvenciji 41,5 MHz iznosi H (32 ± 14 mA/m); B (40 ± 17 nT). Iako nekoliko redova veličina manjih vrijednosti u usporedbi s poljem zabilježenim u području 33 kHz, ovo polje predstavlja

značajnu komponentu otkrivenu u terapijskom polju tijekom pojave mikroizboja u zračnom međuprostoru. Prije svega ona je svojevrsna zabilježba brzine odvijanja određenih procesa tijekom nastanka mikroizboja. S obzirom na to da je magnetsko polje uzrokovano kretanjem naboja, u ovom slučaju elektrona kroz zrak, u zračnom međuprostoru terapijskog polja frekvencija magnetskog polja mikroizboja koja se bilježi u području od 40 do iznad 400 MHz ukazuje na to da su u vremenskoj domeni zabilježeni događaji u trajanju od $2{,}5 \times 10^{-8}$ do $2{,}5 \times 10^{-9}$ sekundi ili 25 do 2,5 nanosekundi. Chirokov i suradnici (24) navode da se u procesu nastanka plazma-filamenata i mikroizboja elektroni u vodljivom kanalu raspršuju iz procijepa unutar 40 ns. Također navode trajanje lavine elektrona oko 10 ns, katodno usmjerenog filamenta (eng. *streamer*) 1 ns, plazma-kanala 30 ns te mikroizbojnog ostatka (eng. *remnant*) 1 ms. Stoga je opravdano pretpostaviti da je prisutnost magnetskog polja u MHz području prilikom izboja kroz zrak, kao i njegova odsutnost prilikom kontaktnog izboja, dokaz kretanja naboja (elektrona) u procesu nastanka mikroizboja i hladne atmosferske plazme. Iako relativno niske energije, u usporedbi s poljem u području 30 kHz, zbog visokih frekvencija magnetskog polja (iznad 41 MHz) ovu komponentu elektromagnetskih veličina valja gledati kao jedan od mogućih uzroka pojačanog zagrijavanja površine uzorka tkiva (tablica 24, str. 112) ali i mogući izvor stimulacije tkiva na puno višim frekvencijama od prirodne frekvencije VFGO-a (248). Ovaj nalaz na određeni način opravdava i naziv ispitivanog uređaja, kao i starijih navoda koji kao osnovno terapijsko sredstvo ove vrste uređaja ističu upravo Tesline oscilirajuće struje visokih frekvencija (7 – 9).

Iz navedenog se može zaključiti da magnetsko polje čini sastavni dio terapijskog polja VFGO-a, a kvantitativne i kvalitativne karakteristike polja značajno ovise o primijenjenom intenzitetu te modalitetu primjene te su statistički značajno veće pri izboju kroz zrak.

5.3.3 Električne veličine prisutne u terapijskom polju

Rezultati mjerenja efektivnih vrijednosti napona i struje na uzorku tkiva (svinjske kože) ukazuju na to da prilikom djelovanja aktivne plazma-elektrode VFGO-a kroz tkivo teče električna struja u području mikroampera pri čemu dolazi do predaje električne energije između elektrode i tkiva. Efektivne vrijednosti struje korištene su za procjenu ukupne predane energije u određenom trajanju zahvata. One su definirane za otpor od 100 Ω koji ujedno predstavlja iznos impedancije volumena tijela (115,116). Stoga se može pretpostaviti da je energija predana mjernom otporniku prema iznosu približno jednaka onoj predanoj volumenu tijela. Time je definiran energetski učinak (toplinski, mehanički, kemijski) koji struje mogu proizvesti u tkivu.

Izmjerene vrijednosti efektivnog napona, ovisno o odabranom intenzitetu u slučaju kontaktnog izboja, iznose od 42,35 do 94,66 mV (srednja vrijednost 75,5 ± 16,6 mV) dok u slučaju izboja kroz zrak iznose od 21,65 do 80,64 mV (srednja vrijednost 55,1 ± 19,7 mV) (slika 56, str. 104). Vrijednosti efektivne struje (pri otporu od 100 Ω) iznose od 0,42 do 0,95 mA (srednja vrijednost 0,75 ± 0,17 mA) u slučaju kontaktnog izboja te od 0,22 do 0,81 mA (srednja vrijednost 0,55 ± 0,2 mA) u slučaju izboja kroz zrak (slika 57, str. 104).

Vrijednosti efektivnog napona i struje kroz tkivo (a time i svih drugih električnih veličina) ovisne su o odabranom intenzitetu, ali i modalitetu primjene. Statistički su značajno veće u slučaju kontaktnog izboja (tablica 24, str. 112). Ovaj odnos očuvan je i pri vrijednosti gustoće struje i srednje vrijednosti snage (produkt napona i struje), a time i predane energije (produkt snage i vremena izloženosti).

Pri izboju kroz zrak primjećuje se pojava kratkih (nekoliko desetaka nanosekundi) izbojnih šiljaka koji se javljaju na vršnim dijelovima (maksimum napona) pojedinačnih perioda naponskog vala (slika 53, str. 102). Njihova pojavnost, kao i broj perioda na kojima se javljaju, nakon inicijalnog impulsa, u tom slučaju ovisi o amplitudi svake pojedine periode. Ovi se izbojni šiljci mogu povezati s nastankom mikroizboja pri čemu dolazi do vrlo brzih (vremenski i prostorno lokaliziranih) protoka struje u zračnom međuprostoru. Pritom dolazi do intenzivnog protoka struje elektrona kroz vodljivi kanal prema anodi sve dok ne dođe do kolapsa lokalnog električnog polja koje nastaje zbog nakupljanja naboja na površini anode te ionskog naboja u prostoru između elektrode i ciljne površine, što potvrđuje i pojava magnetskog polja u frekvencijskom području iznad 40 MHz (24). S padom amplitude napona nanosekundni šiljci se gube tj. vjerojatno sam napon (pri stalnoj udaljenosti elektrode od površine tkiva) nije dovoljan da izazove nove i/ili održi postojeće mikroizboje.

Kada je elektroda dovoljno blizu površini tkiva (udaljenost ovisi o naponu tj. odabranom intenzitetu) ili je u izravnom kontaktu s njom, uspostavlja se strujni krug (plazma-elektroda – ciljno tkivo tj. u praksi pacijent – referentna elektroda). Pritom dolazi do prijenosa električne energije kroz tkivo koje se nalazi između plazma-elektrode i referentne elektrode. Ovaj je proces moguć zbog kapacitivnog prijenosa struje na/kroz tkivo koji bi se elektronički mogao prikazati modelom kondenzatora u kojem pobuđeni plin elektrode čini jednu ploču kondenzatora dok tkivo koje se nalazi ispod površinskog sloja epitela (vodljiva međustanična tekućina) čini drugu ploču kondenzatora. Staklena stijenka elektrode, zrak između elektrode i tkiva te površinski sloj epitela u tom modelu čine dijelove slojevitog dielektrika.

Protok struje kroz tkivo u tom slučaju pri stalnom naponu uvelike će ovisiti o impedanciji samog kondenzatora tj. svojstvima dielektrika (stijenka elektrode, zrak i površinski sloj epitela tj. tkiva). Pritom se može pretpostaviti da relativno velika kontaktna površina između referentne elektrode i kože uzorka tj. pacijenta (u usporedbi s aktivnom površinom elektrode) te njihov izravni kontakt značajno smanjuju impedanciju kapacitivne sprege zbog čega utjecaj ovog dijela strujnog kruga ne bi trebao imati značajan utjecaj na vrijednosti efektivnih struja kroz tkivo, barem ne u pogledu promjena njihovih vrijednosti tijekom provedbe zahvata. Valja naglasiti da unutar ovako opisanog strujnog kruga postoje i dodatni čimbenici poput parazitnih kapaciteta i drugih gubitaka koji nastaju u sustavu, a mogu utjecati na krajnju vrijednost efektivne struje.

Staklena stijenka elektrode u oba modaliteta primjene uvijek čini konstantni dio dielektrika zbog svoje konstantne debljine, površine i dielektrične konstante. Drugi dio dielektrika je zbog mogućih razlika u udaljenosti elektrode od tkiva te vrsti ciljne površine i podliježućih tkiva varijabilan. Pri kontaktnom izboju drugi dio dielektrika čini površina tkiva (npr. koža, sluznica, tvrdo zubno tkivo kost ili rana) dok pri izboju kroz zrak zrak čini i dodatni, treći dio dielektrika. Stoga se može zaključiti da će vrijednost efektivnih struja koje prolaze kroz tkivo pri konstantnim vrijednostima napona i frekvencije ovisiti, u najvećoj mjeri, o impedanciji (specifičnom otporu) samog tkiva u slučaju kontaktnog izboja te dodatno o debljini zračnog međuprostora pri izboju kroz zrak (20, 108 – 110). Stoga je opravdano pretpostaviti da će s povećanjem impedancije tkiva ili zračnog međuprostora doći do povećanja otpora, a time i do smanjenog protoka struje kroz sustav (20, 108 – 110). U konfiguraciji korištenoj za mjerenje napona upotrijebljen je otpornik od 100 Ω te je taj iznos korišten u računanju i procjeni i vrijednosti efektivnih struja, a u literaturi se navodi kao unutarnji otpor volumena tijela (zbog male impedancije međustaničnih tekućina koje s lakoćom provode struju) (115, 116). Iz

navedenog se razloga može pretpostaviti da zabilježene vrijednosti električnih veličina (posebno energija predana uzorku tkiva) opisuju realne i vjerojatno najveće efektivne vrijednosti struja koje tijekom zahvata mogu teći ciljnim tkivom. Stoga se može pretpostaviti da stvarne vrijednosti efektivnih struja pri stalnom naponu i frekvenciji tijekom terapijskog zahvata, s obzirom na modalitet primjene i vrstu ciljnog tkiva, mogu biti približno jednake izmjerenim vrijednostima (npr. pri primjeni na otvorenoj rani) ili od nekoliko puta manje (primjena na sluznici usne šupljine) do nekoliko redova veličina manje (npr. pri primjeni na intaktnom zubu) (prema izrazu 13 na str. 80 i tablici 10 na str. 37).

Ovim modelom mogla bi se objasniti i statistički značajna razlika u vrijednostima efektivnih struja pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak (tablica 24, str. 112). Naime, u slučaju izravnog kontakta elektrode i tkiva dolazi do kapacitivnog prijenosa električne struje cijelom površinom aktivne plazme elektrode i tkiva ($A \approx 50\ \mathrm{mm}^2$) gdje je njihov razmak minimalan ($l \approx 0$) zbog čega je i vrijednost kapaciteta velika. U slučaju primjene na kožu dielektrik je, osim od staklene stijenke elektrode, sastavljen i od tankog sloj *stratuma corneuma* ($l \approx 20\ \mu\mathrm{m}$) zbog čega je i vrijednost kapaciteta (C) ovako opisanog kondenzatora velika. Posljedično se smanjuje vrijednost impedancije (Z) što omogućava veći protok struje (I) kroz kondenzator odnosno opisani strujni krug (izrazi 4 i 5 na stranici 35 te izraz 13 na str. 80). Valja napomenuti da se prilikom izravne primjene na vodljiva tkiva (primjerice, otvorena rana, slina, krv) dielektrik može svesti isključivo na stijenku elektrode zbog čega se može očekivati i veće vrijednosti kapaciteta a time i veći protok struje. Time se dodatno opravdava provođenje mjerenja pri otporu od 100 Ω, koji odgovara otporu volumena tijela koji se može očekivati upravo u ovakvim slučajevima (115, 116).

U slučaju izboja kroz zrak dolazi do vremenski i prostorno lokaliziranog kapacitivnog prijenosa koji se odvija kroz određeni dodatni sloj zraka (ovisno o udaljenosti elektrode od površine tkiva) uz formiranje mikroizboja. S povećanjem zračnog međuprostora (primjerice, $l \geq 500\ \mu\mathrm{m}$) i paralelnim smanjenjem površine ($A << 50\ \mathrm{mm}^2$ – jer u tom slučaju površinu kondenzatora predstavlja isključivo dio površine elektrode i tkiva na kojoj se pojavljuju mikroizboji) znatno se smanjuje vrijednost kapaciteta (C) te povećava impedancija (Z) što za posljedicu ima manji protok struje (I). U navedenom slučaju dio energije dodatno se troši i u procesu lavine elektrona i ionizacije molekula zraka te za održavanje mikroizboja, tj. „strujnog puta“ između elektrode i površine tkiva (14).

U opisanom modelu struja teče cijelim volumenom tkiva, tj. kroz tkivo, sve do referentne elektrode. Zbog navedenog se razloga može zaključiti da do prijenosa energija, a time i

njenog eventualnog učinka, dolazi čitavim „strujnim putem“ kroz tkivo. Također treba istaknuti da čak i u slučaju da referentna elektroda nije u kontaktu s tkivom (pacijentom) ipak dolazi do protoka struje. Ovo je moguće zbog stalne kapacitivne veze tkiva (tijela pacijenta) i zemlje, zbog čega je ono, osim u rijetkim slučajevima, uvijek na neki način uzemljeno.

S obzirom na frekvenciju struje (33 kH ili pak iznad 40 MHz) opravdano je pretpostaviti da će dio struje osim međustaničnom tekućinom teći kapacitivnim putem kroz stanice koje se nalaze na strujnom putu (110). Zato je opravdano pretpostaviti da bi se određeni energetski učinci struja mogli manifestirati u međustaničnom prostoru, kao i unutar samih stanica.

Ovim se modelom također može objasniti i veća vrijednost standardne devijacije koja se primjećuje pri iskazivanju srednjih vrijednosti temperature na promatranoj površini uzorka tkiva (tablica 24, str. 112). Naime, zbog makroskopskih i/ili mikroskopskih neravnina na površini tkiva, ali i same elektrode (blago konveksni oblik), pri izboju kroz zrak su u opisanom „kondenzatoru“ prisutne različite vrijednosti udaljenosti između elektrode i površine tkiva (l). Na mjestima gdje je udaljenost (l) manja i impedancija je manja u odnosu na okolni volumen zraka te će na tom mjestu struja, koja uvijek teče putem najmanjeg otpora, biti najjača, a time i veće gustoće (76). Stoga se može pretpostaviti da zbog ovako opisane neravnomjerne raspodjele u protoku struja dolazi i do neravnomjerne raspodjele energije, tj. topline na površini tkiva zbog čega se i bilježe veća odstupanja od srednje vrijednosti ukupne zabilježene temperature na promatranoj površini uzorka tkiva. U slučaju kontaktnog izboja uzrok neravnomjernom zagrijavanju može ležati ili u nejednakoj debljini staklene stijenke ili pak u nejednakoj debljini stratuma corneuma (tj. različitim svojstvima tkiva koja se nalaze neposredno ispod elektrode).

Ovakav nalaz ukazuje na to da se modalitetom primjene mogu znatno mijenjati električne veličine, a time i učinci na ciljnoj površini. Lokalizirano zagrijavanje tkiva moglo bi se izbjeći stalnim mijenjanjem prostornog odnosa, odnosno pomicanjem elektrode u odnosu na ciljnu površinu. No, u slučaju kliničke primjene apsolutno nepomično držanje elektrode na jednom mjestu (kao što je to bio slučaj u postupcima mjerenja) je praktično gotovo nemoguće stoga se pretpostavlja da su ovi uvjeti zadovoljeni zbog same prirode primjene. Zbog stalnih promjena u prostornom odnosu elektrode i ciljne površine mogu se pretpostaviti i stalne promjene u lokalizaciji i količini protoka struje, a time i podjednaka razdioba energije ciljnom površinom.

S obzirom na niže vrijednosti efektivnog napona i struje pri izboju kroz zrak niže su i vrijednosti snage (njihov produkt), a time i predane energije (produkt snage i vremena izloženosti). Ukupna srednja vrijednost procijenjene električne energije predane tkivu

(s obzirom na otpor od 100 Ω za sve intenzitete i vremena izloženosti) u slučaju kontaktnog izboja iznosi 4,46 ± 2,3 mJ te pri izboju kroz zrak 2,54 ± 1,3 mJ (tablica 20, str. 106).

Becker i suradnici (83) navode da se većina topline koja se stvara protokom struje kroz kožu oslobađa u njezinom površinskom sloju (*stratum corneum*) te se s tog mjesta u manjoj mjeri odvodi kondukcijom u okolno površinsko tkivo, a u većoj mjeri konvekcijom na krv putem kapilara gornjeg sloja *dermisa* te zračenjem topline u okolinu. Budući da različite vrste tkiva, ovisno o svojim morfološkim i anatomskim karakteristikama, pokazuju različitosti specifičnog otpora tkiva (slika 13, str. 34) kao i u načinu rasapa topline (tablica 6, str. 30), opravdano je pretpostaviti da će realne vrijednosti oslobođene energije (prvenstveno topline) prilikom provedbe zahvata vjerojatno varirati s obzirom na vrstu tkiva, kao i oblik i veličinu aktivne površine elektrode koja se na njega primjenjuje (80 – 83, 109). Smanjenjem površine elektrode, a time i tkiva, povećava se količina struje po jedinici površine (gustoća) zbog čega se može pretpostaviti da će pri primjeni elektroda manje površine (u usporedbi s ispitivanom elektrodom) pri istom intenzitetu zagrijavanje tkiva biti veće dok će u elektroda s većom površinom ono biti manje (80 – 83, 109).

Ovdje valja spomenuti da su ispitivanja provedena *ex vivo* na uzorcima svinjske kože gdje nisu prisutni uvjeti u kojima bi se toplina putem konvekcije na krv odvodila s mjesta primjene zbog čega se također može očekivati da bi vrijednosti u *in vivo* uvjetima mogle biti niže od rezultata dobivenih ovim ispitivanjem (83).

Složeni električni procesi koji se odvijaju prilikom primjene elektrode na ciljnu površinu ne dopuštaju potpunu raščlambu s obzirom na opisane fluktuacije u sustavu stoga se oni samo načelno mogu raščlaniti s obzirom na odnos elektrode i ciljne površine, što opisuje sam naziv izboja (kontaktni ili kroz zrak). Pritom se pri kontaktnom izboju, zbog većih vrijednosti struje, mogu pretpostaviti veći energetski učinci duž „strujnog puta“ kroz tkivo. Prilikom izboja kroz zrak mogu se pretpostaviti nešto slabiji učinci u samom „strujnom putu“ kroz tkiva jer dolazi do manjeg protoka struje te se dio energije troši na održavanje „strujnog puta“ kroz zrak (mikroizboja). Iz navedenog se može pretpostaviti da će najznačajniji učinci pri izboju kroz zrak u najvećoj mjeri biti lokalizirani na ciljnoj površini što potvrđuje i pojačano zagrijavanje površine tkiva. Na taj je način istom elektrodom, istim odabranim intenzitetom pri istom trajanju zahvata i u istom periodu moguće postići relativno različite energetske učinke isključivo na osnovu manipulacije elektrodom. Pri terapijskim zahvatima koji zbog prirode indikacije zahtijevaju površinsko djelovanje (primjerice dezinfekcija površine tkiva) održavanje razmaka između elektrode i pojava mikroizboja i hladne atmosferske plazme u

zračnom međuprostoru moglo bi imati značajnu ulogu u postizanju željenog učinka dok bi pak u zahvata koji su usmjereni k stimulaciji dubljih struktura tkiva (primjerice, temporomandibularni zglob ili *nervus trigeminus*) prisni kontakt elektrode i kože mogao imati značajniji utjecaj zbog veće količine struje i energije koja teče ciljnim tkivom.

Rezultati ispitivanja ukazuju na to da tijekom terapijskog zahvata, bez obzira nalazi li se aktivna plazma-elektroda u izravnom kontaktu s ciljanim tkivom ili je od njegove površine udaljena ≈ 0,5 mm, postoji stalan protok oscilirajuće električne struje u rasponu od 217 do 945 μA koja teče između aktivne plazma-elektrode i referentne elektrode. Ovi rezultati dokaz su da su tkivo, kao i tijelo pacijenta (koje zatvara strujni krug između aktivne plazma-elektrode i referentne elektrode), izloženi struji u frekvencijskom području oko 33 kHz. Zbog navedenog bi se razloga struje u području μA, čija je prisutnost zabilježena u terapijskom polju VFGO-a, trebale uzeti u obzir kao jedan od važnih čimbenika čije bi djelovanje moglo imati određene terapijske učinke, posebice u slučajevima stimulacije regenerativnih procesa, inhibicije rasta patogena, protuupalnog učinka i redukcije bolova (122 – 151).

5.3.4 Poznati učinci

Iz svih rezultata mjerenja elektromagnetskih veličina može se zaključiti da su u terapijskom polju ispitivanog visokofrekvencijskog generatora ozona prisutni električno i magnetsko polje te struje u području mikroampera (μA). Budući da svi od navedenih elektromagnetskih čimbenika pokazuju brojne terapijske učinke na staničnim i tkivnim razinama, trebali bi se uzeti u obzir kao biološki aktivne komponente koje čine sastavni dio terapijskog polja visokofrekvencijskog generatora ozona (77 – 151).

Foster (248) tako uz toplinske učinke navodi ekscitaciju membrane i električni lom (elektroporaciju) membrane kao dva osnovna mehanizma učinaka električnih polja na biološka tkiva. Dok je ekscitacija membrana relativno spor proces (odgovor naponskih ionskih kanala je u području 0,1 – 1 ms), elektroporacija se odvija brzo te je zabilježena pri impulsima koji traju svega desetak nanosekundi. Prag za postizanje elektroporacije sukladan je induciranom naponu stanične membrane od 1 V. On navodi da bi za ovaj učinak jakost polja izvan stanice trebala biti u području od oko 50.000 V/m u vremenu od 1 μs.

Kumaran i Watson (91) u svom preglednom radu o terapijskim učincima radiofrekvencijskih elektromagnetskih polja (30 kHz – 30 MHz) navode brojne studije koje potvrđuju pozitivne učinke u eliminaciji boli, edema, eritema, upalnih procesa, stimulaciji cijeljenja i ponovne uspostave funkcije, smanjenju potrebe za uzimanjem analgetika te skraćenog vremena hospitalizacije. Shupak i suradnici (249) navode brojne radove koji dokazuju terapijske učinke impulsnih magnetskih polja. S obzirom na jakost magnetskog polja i trajanje impulsa učinci su zabilježeni u području od svega nekoliko μT do nekoliko stotina mT, trajanjima impulsa od svega nekoliko do nekoliko stotina μs, frekvencijama od 1 Hz do nekoliko MHz, te vremenima izloženosti od nekoliko sekundi do nekoliko sati. Najznačajniji terapijski učinci impulsnih magnetskih polja zabilježeni su u cijeljenju fraktura, mekih tkiva i živaca te redukciji bolova. Neki od dokazanih učinaka elektromagnetskih polja na staničnoj razini prikazani su u tablici 9 (str. 33).

Poltawski i Watson (117) navode da ionski kanali na staničnim membranama mogu migrirati pod utjecajem elektromagnetskih polja i struja u području mikroampera, zbog čega dolazi do modifikacije citoskeleta, uključujući stvaranje membranskih izdanaka koji omogućavaju stanično kretanje (117). Također postoje dokazi da primjena struja u području mikroampera na tkiva povećava broj staničnih organela odgovornih za aktivnost stanica kao i proizvodnju ATP-a (117). Cheng i suradnici (121) navode da struje do 1 mA povećavaju proizvodnju ATP-a do 500% te pospješuju transport aminokiselina kroz staničnu membranu i sintezu

proteina u stanicama kože štakora. Khan i Arany (250) navode da prilikom ozljede tkiva dolazi do smanjenja razine ATP-a zbog poremećaja u radu Na/K pumpe što dovodi do povećanja specifičnog otpora i smanjenja kapaciteta epitelnih stanica zbog čega se mijenja i transepitelni potencijal (TEP), a primjena egzogenih električnih podražaja u obliku struja u području mikroampera može povećati kapacitet stanica te ponovno uspostaviti TEP potičući time cijeljenje rana. Navode da struje induciraju polariziranu signalizaciju epitelnog faktora rasta, integrina, fosfoinositidin 3 kinaze/fosfataze što dovodi do bioloških odgovora poput pojačane diobe stanica, sekrecije faktora rasta, ATP sinteze i poticanja reepitelizacije rane. Zuim i suradnici (120) navode da stimulacija živaca mikrostrujama dovodi do smanjenja bolova u pacijenata s temporomandibularnim disfunkcijama. Istraživanja ukazuju na to da stimulacija strujama u području mikroampera iz vanjskog izvora može uzrokovati: migraciju fibroblasta i epitelnih stanica u područje rane, povećano stvaranje faktora rasta i kolagena u tkivima, povećanu sintezu DNK-a i proteina, ubrzano cijeljenje rana i ulkusa i fraktura, ubrzanu regeneraciju oštećenog živčanog tkiva, redukciju postoperativnih bolova i edema, skraćeno vrijeme cijeljenja u oštećenja mekih tkiva, inhibiciju rasta raznih patogena, redukciju bolova sa znatnim smanjenjem serumske razine upalnih citokina IL-1, IL-6, TNF-X i neuropeptida P te povećano otpuštanje endrofina i erumskog kortizola, znatno smanjenje bolova i povećanu mobilnost u kroničnih bolova kralješnice, sindroma karpalnog tunela i artritisa, smanjenje bolova u degenerativnih bolesti temporomandibularnog zgloba, dugotrajnu redukciju mijofacijalnih bolova vrata, glave i lica, redukciju bolova i povećanu mobilnost u peritendinitisa (122 – 151).

S obzirom na impulsni i oscilirajući karakter struja VFGO-a te kratkotrajnu primjenu (najviše 120 sekundi) može se pretpostaviti da će određeni učinci koji se postižu dugotrajnijom primjenom (i do nekoliko sati) istosmjernih struja u području μA najvjerojatnije izostati, dok bi se mogli očekivati u području povećanja kapaciteta stanice, stimulacije i pojačane aktivnosti stanične membrane i naponskih kanala koji reagiraju na promjene električnih polja.

5.4 Promjena temperature na površini uzorka tkiva

Na površini uzoraka tkiva koji su bili izloženi djelovanju VFGO-a i plazma-elektrode zabilježen je značajan porast temperature (tablica 21, str. 108). Temperature su neposredno

prije djelovanja, kao i njihove varijance, izjednačene. Nakon djelovanja prosječna temperatura je statistički značajno veća u slučaju izboja kroz zrak. Posljedica toga je da je prosječna promjena temperature veća u pokusu s izbojem kroz zrak od istog prosjeka u pokusu s kontaktnim izbojem (7,54 °C u odnosu na 5,91°C). Primjećuje se trend porasta vrijednosti standardne devijacije s porastom intenziteta i vremenskog intervala, što se na snimcima očituje neravnomjernim zagrijavanjem promatrane površine u oba modaliteta primjene, čime se može objasniti veća raspršenost podataka u skupu, a prosječno odstupanje od prosjeka vrijednosti temperature naglašenije je u slučaju izboja kroz zrak (tablica 24, str. 112). Također se može primijetiti da bez obzira na razlike u vrijednosti početne temperature na površini tkiva (T_0), koja je u nekim slučajevima značajno niža od prosjeka, zbog čega je i vrijednost krajnje temperature (T_1) niža, razlika temperature (ΔT) pokazuje linearan porast s obzirom na povećanje intenziteta i vremenskog intervala (tablica 22 i 23, slika 61 – 63, str. 109 – 111).

Promjena temperature statistički značajno zavisi o intenzitetu i trajanju zahvata u oba pokusa. Regresijski modeli pokazuju da intenzitet ima jači utjecaj na promjenu temperature u slučaju oba modaliteta primjene. Regresijski koeficijenti intenziteta veći su u pokusu s izbojem kroz zrak (B = 0,073) nego u onome s kontaktnim izbojem (B = 0,044) što ukazuje na činjenicu da razlika u temperaturi, za jedan postotni porast intenziteta, raste više u pokusu s izbojem kroz zrak (tablica 25 i slika 64, str. 113).

Iz rezultata ispitivanja opravdano je zaključiti da se većina oslobođene topline na površini uzorka tkiva može pripisati ranije opisanoj interakciji struja i elektromagnetskog polja s ciljnom površinom i tkivom. Mogu se objasniti konverzijom elektromagnetske u toplinsku energiju koja se oslobađa u procesima rezistivnog i indukcijskog zagrijavanja (77, 81, 83).

Prema izrazu $E = I^2 \times R \times t$ (izvedeno iz izraza 16 na str. 79) vidljivo je da će energija predana električnom strujom (tj. oslobođena toplina) ovisiti o odabranom intenzitetu (jakost struje) i vremenu izloženosti, kao i o otporu tkiva. Becker i suradnici (83) navode da se većina topline koja se stvara protokom struje kroz kožu oslobađa u njezinom površinskom sloju (*stratum corneum*). U slučaju isključivo rezistivnog zagrijavanja, zbog veće vrijednosti struje, povećanje temperature na površini tkiva trebalo bi biti naglašenije pri kontaktnom izboju. No termografska ispitivanja ukazuju na veće zagrijavanje tkiva pri izboju kroz zrak, bilježe se manje vrijednosti struja, zbog čega se može zaključiti da značajan dio topline proizlazi iz interakcije magnetskog polja s tkivom, a čije su vrijednosti veće pri izboju kroz zrak. Ovaj se učinak može objasniti vremenski promjenjivim magnetskim poljem što uzrokuje stvaranje vrtložnih struja koje dodatno pojačavaju učinak zagrijavanja, što potvrđuju i navedene razlike

u izmjerenim temperaturama na površini tkiva u slučaju izboja kroz zrak gdje su vrijednosti magnetskog polja statistički značajno veće od onih pri kontaktnom izboju (79). Dodatna komponenta magnetskog polja u frekvencijskom području iznad 40 MHz koja je tijekom ispitivanja otkrivena pri pojavi mikroizboja govori tome u prilog.

Na osnovu navedenog može se zaključiti da će toplinski učinci pri istom intenzitetu i vremenu izloženosti ovisiti prvenstveno o modalitetu primjene i vrsti tkiva na koje se primjenjuje elektroda. S povećanjem specifičnog otpora, pri istoj vrijednosti struje, može se očekivati i veći stupanj zagrijavanja tkiva. Također valja naglasiti da se pri promjeni specifičnog otpora tkiva ili općenito bilo kojeg parametra u ranije opisanom strujnom krugu mogu očekivati značajne razlike u vrijednostima elektromagnetskih veličina u terapijskom polju, a time i oslobođenoj toplini.

Iako elektromagnetsko polje i struje vjerojatno imaju najznačajniju ulogu u zagrijavanju tkiva, ne treba zanemariti činjenicu da su u terapijskom polju zabilježena i dva dodatna čimbenika koja mogu uzrokovati toplinske učinke. To su neionizirajuće zračenje, prvenstveno u infracrvenom području, te hladna atmosferska plazma koja se stvara prilikom pojave mikroizboja. Iako su toplinski učinci s obzirom na njihov slabi intenzitet vjerojatno zanemarivi u usporedbi s onima elektromagnetskog polja i struja, ipak ih ne bi trebalo izostaviti kao moguće uzroke zagrijavanja tkiva. Posebice zato jer se zračenje u infracrvenom A spektru (780 – 1400 nm), zbog visokog stupnja apsorpcije i penetracije od nekoliko milimetara u dubinu kože, koristi kao jedna od terapijskih metoda zagrijavanja tkiva (251). Iako pojam hladne atmosferske plazme može navesti na krivi zaključak da je doslovce hladna, valja naglasiti da, zbog električnog ili elektromagnetskog načela nastanka, nosi određenu količinu energije koja u interakciji sa zrakom i ciljnom površinom gotovo uvijek oslobađa toplinu. Zbog toga se toplina često navodi kao osnovna sastavnica hladne atmosferske plazme (13, 18).

Ovdje valja navesti da su rezultati ispitivanja dobiveni djelovanjem svih intenziteta u vremenskom rasponu od 30 do 120 sekundi, dok primjerice u terapijskim protokolima koje preporučuje proizvođač maksimalno trajanje zahvata pri najvećem intenzitetu iznosi najviše 40 sekundi, i to pri primjeni u korijenskom kanalu ili kruni avitalnih zuba (tablica 13, str. 65). Uspoređujući vrijeme trajanja zahvata navedeno uz preporučeni intenzitet s rezultatima ispitivanja u slučaju korištenja ispitivane elektrode, najveće povećanje temperature na tkivnom uzorku moglo bi se očekivati u 100% intenziteta pri izboju kroz zrak (oko 8°C) i kontaktnom izboju (oko 6°C) dok je ukupna srednja vrijednost temperature koja bi se mogla

očekivati tijekom svih navedenih protokola iz tablice 13 oko 6 ± 1°C. S obzirom na to da se primjena intenziteta 100% preporuča isključivo u svrhu dezinfekcije korijenskih kanala i kruna avitalnih zuba, na osnovu zabilježenih rezultata nije moguće procijeniti temperature koje bi se u tom slučaju mogle očekivati u terapijskom polju. Prilikom primjene ostalih intenziteta (20 – 80%) na koži te eventualno suhoj sluznici rezultati ispitivanja bi mogli poslužiti kao smjernica u pogledu najvećih vrijednosti temperature koje se mogu očekivati u terapijskom polju. Ovdje ponovno valja spomenuti da su ispitivanja provedena *ex vivo* na uzorcima svinjske kože bez krvne perfuzije, gdje nisu prisutni uvjeti u kojima bi se toplina putem konvekcije odvodila s mjesta primjene zbog čega se može očekivati da bi vrijednosti u *in vivo* uvjetima mogle biti niže od ovako zabilježenih rezultata (83). Uz pretpostavku da je temperatura kože i do nekoliko stupnjeva niža od unutarnje temperature tijela koja iznosi oko 37°C može se pretpostaviti da se toplinski učinci u slučaju primjene navedene elektrode i preporučenih protokola mogu opisati dijatermijom i eventualno blagom hipertermijom (83). Kratko vrijeme trajanja zahvata u tom slučaju smanjuje mogućnost prekomjernog zagrijavanja koje bi moglo uzrokovati nepoželjne učinke. Naime, do ireverzibilnih oštećenja stanica pri zagrijavanju tkiva u području s više od 46 do 48°C dolazi nakon 45 minuta izlaganja (83,84). Napominjemo pritom da se s obzirom na vrstu tkiva, a posebice vrstu primijenjene elektrode, mogu očekivati znatna odstupanja od ovako zabilježenih vrijednosti.

Za pouzdanije rezultate od ovih, dobivenih indirektnom tehnikom mjerenja temperature tkiva u *in vitro* uvjetima, trebalo bi provesti mjerenja jednom od direktnih termometrijskih tehnika u kojima su mjerni uređaji bili ugrađeni u tkivo Na taj bi se način dobili podaci ne samo o temperaturi površine kože, što je slučaj u ovom ispitivanju, već bi se moglo utvrditi stupanj disipacije u potkožno tkivo. U *in vivo* uvjetima dobivene vrijednosti porasta temperature tkiva mogle bi značajno varirati (biti manje) od ovako dobivenih rezultata zbog disipacije topline, prvenstveno konvekcijom putem krvožilnog sustava (83).

S obzirom na to da je tijekom terapijskog zahvata zabilježeno umjereno povećanje temperature na površini uzorka tkiva može se smatrati da toplina, koja se oslobađa interakcijom fizičkih čimbenika zabilježenih u terapijskom polju, zasigurno predstavlja jedan od važnih čimbenika koji može imati određene biološke učinke na ciljnu površinu i tkiva.

5.4.1 Poznati učinci

Brzina metaboličkih procesa neophodnih za život, poput diobe stanice i enzimskih reakcija, ovisi o temperaturi te se njezine promjene od samo nekoliko stupnjeva mogu očitovati

promjenama u brzini odvijanja metaboličkih reakcija. U biološkim sustavima umjereno povećanje temperature dovodi do ubrzanja metaboličkih reakcija dok znatno povećanje temperature može dovesti do gubitka funkcije i oštećenja organizma (168).

Povećanje temperature tkiva uzrokuje vazodilataciju, a time i povećanu dostavu kisika i hranjivih tvari te eliminaciju ugljikovog dioksida i nusprodukata metaboličkih reakcija (252). Toplina se kao terapijsko sredstvo koristi u liječenju brojnih poremećaja poput mišićnih spazama i kontraktura, mijalgija, fibromijalgija, burzitisa i hematoma ali i u kombinaciji s drugim postupcima u liječenju bolnih sindroma te karcinoma (252,253). Sheppard i suradnici (254) tako navode da elektromagnetska polja i struje mogu uzrokovati promjene u brzini kemijskih reakcija te povećanje entropije u tkivima na koja djeluju putem dielektričnog ili rezistivnog zagrijavanja.

5.5 Opće razmatranje

Živi organizmi održavaju svoj unutarnji red koristeći slobodnu energiju iz okoline u obliku hranjivih tvari ili sunčeve svijetlosti, vraćajući u nju istu količinu energije u obliku topline i entropije. Time su toplina i entropija najčešće posljedica određenog rada koji je izvršen u nekom sustavu. Doslovce sve pretvorbe energije u stanici mogu se pratiti kroz protok elektrona s jedne molekule na drugu u silaznoj putanji s višeg k nižem elektrokemijskom potencijalu, što je analogno protoku elektrona u baterijski pogonjenom električnom krugu (255). Sve redoks reakcije uključuju protok elektrona gdje se jedan reaktant oksidira (gubi elektrone) dok se drugi reducira (dobiva elektrone). Brojne biokemijske reakcije koje za svoje odvijanje zahtijevaju potrošnju energije spregnute su s drugim reakcijama koje oslobađaju energiju, poput reakcija razgradnje ATP-a. No, izvor slobodne energije može biti i elektromagnetska energija (primjerice, elektromagnetsko zračenje Sunca) što se najbolje očituje u procesu fotosinteze (255). Važnost elektromagnetske energije za biološke sustave potvrđuje i činjenica da je sav život na Zemlji održan izravnim ili neizravnim iskorištavanjem elektromagnetske energije Sunca (255). Stoga ne čudi da primjena različitih oblika elektromagnetske energije u liječenju, kao izvorne/osnovne energije svih živih organizama, pokazuje tako širok spektar učinaka na biološke sustave (168,255).

Iako je većina mehanizama kojima elektromagnetska energija djeluje na biološke sustave danas još uvijek poprilično nejasna, terapijski okviri su, kao i učinci koji se postižu primjenom elektromagnetske energije u raznim područjima liječenja, kvalitetno dokumentirani i nepobitni (91,117, 121, 249).

Jedno od vrlo pojednostavnjenih objašnjenja tako širokog spektra bioloških učinaka, kao i kliničkih rezultata u liječenju oboljenja s različitim patofiziološkim ishodištima, koji se postižu primjenom različitih oblika elektromagnetske energije, moglo bi ležati u činjenici i da se u podlozi velikog broja poremećaja u funkciji organizma često nalaze poremećaji u metabolizmu stanica, tj. njihovoj energetici. Ovo potvrđuju nalazi koji kao ishodište brojnih patofizioloških procesa navode određene metaboličke poremećaje u proizvodnji ATP-a i reaktivnih kisikovih vrsta, kao i poremećaje u transmembranskom potencijalu, transportu i ionskoj izmjeni (50, 152 – 154, 173, 174).

Većina navedenih procesa usko je vezana uz funkciju i metaboličke procese mitohondrija, posebice elektronskog transportnog lanca (173). S druge strane, za većinu čimbenika koji su zabilježeni u terapijskom polju VFGO-a (crvena i infracrvena svjetlost, hladna atmosferska plazma uključujući ROS i ozon, elektromagnetska polja te struje u području mikroampera)

dokazani su određeni stimulativni učinci upravo na metaboličkoj razini, posebice s povećanom aktivnošću mitohondrija i elektronskog transportnog lanca i posljedičnim povećanjem proizvodnje ATP-a (121,156,174). Oni se također često dovode u vezu s pojačanom aktivnošću stanica, proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta, ionskom izmjenom te općenitom stimulacijom reparativnih procesa, što potvrđuje da elektromagnetska energija zasigurno ima određenu terapijsku ulogu (91,117, 121, 249).

Čini se da bi se stimulacija navedenih procesa kao i općenito povećanje energije koje se postiže prijenosom elektromagnetskih impulsa na i kroz tkivo mogli dovesti u vezu s određenim terapijskim učincima ove vrste zahvata. Titrajni (oscilirajući) strujni krug koji se prilikom terapijskog zahvata zatvara s tkivom (tijelom pacijenta) ukazuje na to da prilikom provedbe zahvata ne dolazi isključivo do lokalnog djelovanja na površini tkiva već se on prostire čitavim „strujnim putem“ kroz tkivo (tijelo). Iz navedenog se može zaključiti da će i određeni energetski učinci ove vrste zahvata biti prisutni duž cijelog „strujnog puta“, što dodatno proširuje spektar mogućih učinaka na šire područje tijela tj. organizma. S obzirom na relativno niske vrijednosti elektromagnetskih veličina i oslobođene topline koje su zabilježene u terapijskom polju (u usporedbi s drugim elektromagnetskim terapijskim postupcima), kao i kratko trajanje zahvata, opravdano je pretpostaviti da će i učinci u tom pogledu biti blage prirode no, gledano kroz prizmu postignutih kliničkih rezultata, dovoljni za pokretanje određenih procesa koji vode k uspostavi metaboličke ravnoteže te promicanju procesa cijeljenja u oboljelom ili oštećenom tkivu (91, 117, 249).

Zagrijavanje tkiva koje se bilježi tijekom djelovanja VFGO-a također ukazuje na činjenicu da elektromagnetska energija na atomskoj i molekularnoj razini putem djelovanja na naboje uzrokuje povećanje ukupne energije u ciljnom tkivu zbog čega se može pretpostaviti da u njihovoj interakciji dolazi do određene vrste pobude. Pobuda se u tom slučaju, vrlo pojednostavnjeno, može opisati povećanjem energije koja omogućava odvijanje brojnih metaboličkih reakcija. U tom slučaju sustav treba. promatrati i kroz prizmu vremena jer povećanjem energije dolazi do bržeg odvijanja metaboličkih reakcija što se u kliničkoj praksi može očitovati kao ubrzano cijeljenje oštećenih dijelova tkiva. No, složeno načelo rada tehnologije kao i međusobne interakcije pojedinačnih čimbenika te široki spektar mogućih interakcija s biološkim sustavima, koje je gotovo nemoguće izdvojiti i/ili izuzeti iz cjelokupne slike terapijskog postupka, nalaže potrebu za proširenjem istraživanja na multidisciplinarnu i interdisciplinarnu razinu sa svrhom cjelovitijeg razjašnjavanja mehanizama kojima se postižu dosad prepoznati terapijski učinci.

Ideja, kao i tehnološka platforma liječenja oscilirajućim strujama visokih frekvencija, predstavlja jednu od najstarijih tehnologija liječenja modernog doba medicine. Klinička primjena ove vrste terapijskog zahvata može se pratiti tijekom jednog cijelog stoljeća. Tijekom tog vremena pokazala se djelotvornom i prije svega sigurnom metodom, no usprkos tome i dalje predstavlja izvor brojnih pitanja u pogledu mehanizma postizanja terapijskih učinaka što je na neki način potvrda napredne ideje njezinog tvorca.

U tom pogledu ovaj rad je skroman doprinos autora i svojevrsna osnova za buduća istraživanja ove, medicinski gledano, vrlo intrigantne i multipotentne terapijske metode i tehnologije čiji su nastanak, prije više od stotinu godina, omogućili Nikola Tesla ali i brojni kasniji istraživači koju su podržali i razvijali ideju medicinske primjene Teslinih oscilirajućih struja.

6 ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja fizikalnih i kemijskih čimbenika prisutnih u terapijskom polju visokofrekvencijskog generatora ozona potvrđuju:

1. U terapijskom polju visokofrekvencijskog generatora ozona su, uz ozon, prisutni i drugi fizički i kemijski čimbenici koji mogu imati određene učinke na ciljno tkivo.
2. U terapijskom polju prilikom izboja kroz zrak prisutna je blago ionizirana hladna atmosferska plazma u kojoj su prisutni elektroni te pobuđene i/ili ionizirane molekule dušika (N_2, i N_2^+).
3. U terapijskom polju pri kontaktnom izboju i izboju kroz zrak prisutno je neionizirajuće elektromagnetsko zračenje u vidljivom te bliskom infracrvenom dijelu spektra (540 – 940 nm), a prilikom izboja kroz zrak u kojem nastaju mikroizboji i u UV dijelu spektra (290 – 440 nm)
4. U terapijskom polju prisutno je električno polje (248 – 586 V/m na 10 mm udaljenosti od plazma-elektrode, procijenjena jakost polja u blizini aktivne površine elektrode $\geq 3 \times 10^6$ V/m)
5. U terapijskom polju , pri izboju kroz zrak i kontaktom izboju, prisutno je magnetsko polje u frekvencijskom području 33 KHz (1,2 – 3,8 μT) dok se pri pojavi mikroizboja u zračnom međuprostoru bilježi dodatna komponenta magnetskog polja u frekvencijskom području iznad 40 MHz (na 41,5 MHz 40 ± 17 nT)
6. Tijekom zahvata kroz terapijsko polje teku struje efektivne vrijednosti od 0,22 do 0,95 mA
7. Tijekom zahvata dolazi do umjerenog zagrijavanja površine tkiva (2,6 – 12,2°C)
8. Učinci ove vrste terapijskog zahvata se ne mogu pripisati samo djelovanju ozona već bi se trebali pripisati kumulativnom učinku:
    - elektromagnetske energije koja uključuje djelovanje neionizirajućeg elektromagnetskog zračenja, električnog i magnetskog polja te električne struje
    - hladne atmosferske plazme koja uz ozon sadrži elektrone i druge kemijske konstituente poput pobuđenih i/ili ioniziranih molekula i atoma
    - topline koja se oslobađa kao posljedica interakcije navedenih čimbenika s ciljnim tkivom

7 LITERATURA

1. Tesla N. Moji pronalasci: autobiografija Nikole Tesle. Zagreb: Znanje; 2015.
2. Treumann RA, Klos Z, Parrot M. Physics of electric discharges in atmospheric gases: An informal introduction. Planetary Atmospheric Electricity. Springer; 2008: 133 – 48
3. Mattox DM, Mattox VH. Vacuum coating technology. Springer; 2003: 1-7
4. Drummond JE. Plasma physics. Courier Corporation; 2013: 1 – 10
5. Tesla N. High Frequency Oscillators For Electro-Therapeutic And Other Purposes. American Electro-Therapeutic Association proceedings; 1898; 25
6. Tesla N. Apparatus for producing ozone. US 568177 A; 1896.
7. Strong FF. High Frequency currents. Remban Company, New York; 1908.
8. Eberhart NM. A working manual of high frequency currents. New medicine publishing Company; 1911.
9. Sinclair T. Medical Electricity and Rontgen Rays, with a Practical Chapter on Phototherapy. W. B. Saunders; 1916.
10. Kolischer G. Further consideration on diathermy and malignancy. Archives of physical therapy, X-ray, Radium. 1932; 13: 780 – 1
11. Bárdos L, Baránková H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. Thin Solid Films. Elsevier; 2010; 518: 6705 – 13
12. Nehra V, Kumar A, Dwivedi H. Atmospheric non-thermal plasma sources. Int J Eng. 2008; 2: 53 – 68
13. Graves DB. Low temperature plasma biomedicine: A tutorial review. Physics of Plasmas (1994-present). AIP Publishing; 2014; 21: 080901
14. Grzegorzewski F. Influence of non-thermal plasma species on the structure and functionality of isolated and plant-based 1, 4-benzopyrone derivatives and phenolic acids. Berlin, Technische Universtität Berlin, Diss., 2010.
15. Meichsner J, Schmidt M, Schneider R, Wagner H-E. Nonthermal plasma chemistry and physics. CRC Press; 2012.
16. Mathew T, Datta R, Dierkes W, Noordermeer J, Van Ooij W. Mechanistic investigations of surface modification of carbon black and silica by plasma polymerisation. Plasma Chemistry and Plasma Processing. Springer; 2008; 28: 273 – 87
17. Baldus S, Schröder D, Bibinov N, Gathen V Schulz-von der, Awakowicz P. Atomic oxygen dynamics in an air dielectric barrier discharge: a combined diagnostic and modeling approach. Journal of Physics D: Applied Physics. IOP Publishing; 2015; 48: 275203
18. Babaeva NY, Tian W, Kushner MJ. The interaction between plasma filaments in dielectric barrier discharges and liquid covered wounds: electric fields delivered to model platelets and cells. Journal of Physics D: Applied Physics. IOP Publishing; 2014; 47: 235201
19. Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. Plasma chemistry and plasma processing. Springer; 2003; 23: 1 – 46
20. Xiao D. Dielectric Strength of Atmosphere Air. Gas Discharge and Gas Insulation. Springer; 2016. p. 149 – 194.

21. Knight DW. Available from: http://www.g3ynh.info/index.html

22. Shanga J., Huang P. Modeling of ac dielectric barrier discharge. Journal of applied physics. 2010; 107: 113302

23. Smirnov BM. Theory of Gas Discharge Plasma. Springer; 2015.

24. Chirokov A, Gutsol A, Fridman A, Sieber K, Grace J, Robinson K. Analysis of two-dimensional microdischarge distribution in dielectric-barrier discharges. Plasma Sources Science and Technology. IOP Publishing; 2004; 13: 623

25. Kim J, Kim Y, Choi Y, Choe W, Choi J, Hwang Y. Optical measurements of gas temperatures in atmospheric pressure RF cold plasmas. Surface and Coatings technology. Elsevier; 2002; 171: 211 – 5.

26. Seidler V, Linetskiy I, Hubálková H, Stankova H, Smucler R, Mazánek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. Prague Med Rep. 2008; 109: 5 – 13

27. Bocci V, Zanardi I, Valacchi G, Borrelli E, Travagli V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. Cardiovascular & hematological disorders drug targets. 2015.

28. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. Med Gas Res. 2013; 3: 21.

29. Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012; 16: 1741 – 7

30. Pavelić B, Prebeg D, Jurmanović D, Brailo V, Vidović Juras D, Puhar I, et al. Atmospheric plasma clinical application in dentistry. Medix.; 2015; 21; 274 – 80

31. Cehreli SB, Yalcinkaya Z, Guven-Polat G, Çehreli ZC. Effect of ozone pretreatment on the microleakage of pit and fissure sealants. Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2010; 35: 187 – 90

32. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. International journal of oral and maxillofacial surgery. Elsevier; 2014; 43: 777 – 83

33. Filipović-Zore I, Divić Z, Duski R, Gnjatović N, Galić N, Prebeg D. Impact of ozone on healing after alveolectomy of impacted lower third molars. Saudi medical journal. 2011; 32: 642 – 4

34. Giuroiu C, Dragomir R, Hamburda T, Sălceanu M, Aminov L, Melian A, et al. The role of ozonated water in the success of therapy of chronic apical periodontitis: case report. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. 2014; 6: 71 – 5

35. Gürsoy H, Çakar G, pçi SD, Kuru B, Yilmaz S. In vitro evaluation of the effects of different treatment procedures on dentine tubules. Photomedicine and laser surgery. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2012; 30: 695 – 8

36. Kaptan F, Kazandag MK, Iseri U. Treatment of bisphosphonate related osteonecrosis following root canal therapy at the 1-year follow-up: report of two cases. Therapeutics and clinical risk management. Dove Press; 2013; 9: 477

37. Katalinić I, Glockner K, Anić I. Influence of several root canal disinfection methods on pushout bond strength of self-etch post and core systems. International endodontic journal. Wiley Online Library; 2014; 47: 140 – 6

38. Kazancioglu H, Kurklu E, Ezirganli S. Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. International journal of oral and maxillofacial surgery. Elsevier; 2014; 43: 644 – 8

39. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects. Journal of Craniofacial Surgery. LWW; 2013; 24: 2141 – 6

40. Pavelić B, Prebeg D, Jurmanović D, Brailo V, Vidović Juras D, Puhar I, et al. Atmospheric plasma – clinical application in dentistry Medix.; 2015; 21; 275 – 80

41. Ozdemir H, Toker H, Balcı H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. Journal of periodontal research. Wiley Online Library; 2013; 48: 722 – 6

42. Pavelić B. Successful use of high frequency ozone generator and bio-oxidative therapy in endo-restorative treatment. 15th Biennial Congress of the European Society of Endodontology. Hrvatska znanstvena bibliografija i MZOS-Svibor; 2011.

43. Pavelić B, Katanec D, Šegovi S, Gali N, Ani I. Garres osteomyelitis resolved by endodontic treatment and use of ozone therapy: a case report. 14th Biennial Congress of ESE. 2009.

44. Pavelić B, Plančak D. Primjena biooksidacijske terapije u liječenju periimplantitisa. 4. Međunarodni kongres za dentalnu implantologiju; 2011.

45. Pavelić B, Prebeg D, Šaban A, Paveli B, Bilandžija V, Šegovi S, et al. Basic theory and therapeutic possibilities of applying plasma therapy in dentistry. Medix; 2014; 20

46. Tuncer D, Yazici AR, Ayturan S, Ozgunaltay G, Dayangac B. Antimicrobial Effect of Ozone on Cariogenic Microorganisms In Vitro. Ozone: Science & Engineering. Taylor & Francis; 2013; 35: 456 – 64

47. Wilczyska-Borawska M, Leszczyska K, Nowosielski C, Stokowska W. Ozone in dentistry: microbiological effects of gas action depending on the method and the time of application using the ozonytron device. Experimental study. Annales Academiae Medicae Stetinensis. 2010. p. 99 – 103

48. Schwartz A, Sánchez GM. Ozone therapy and its Scientific Foundations. Revista Española de Ozonoterapia. 2012; 2: 199 – 232

49. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Archives of medical research. Elsevier; 2006; 37: 425 – 35

50. Spickett CM, Fedorova M, Hoffmann R, Forman HJ. An Introduction to Redox Balance and Lipid Oxidation. Lipid Oxidation in Health and Disease. CRC Press; 2015; 1 – 16

51. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress. Med Gas Res. 2011; 1: 29

52. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. Mediators of inflammation. Hindawi Publishing Corporation; 2007.

53. Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. Plasma Science. IEEE; 2008; 36: 1441 – 57

54. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia L. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. International journal of Pharmaceutics. Elsevier; 2001; 226: 1 – 21

55. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. J Transl Med. 2011; 9: 1 – 11

56. German I, Rodrigues A, Andreo J, Pomini K, Ahmed F. Ozone therapy in dentistry : A systematic review. Int J Odontostomatology. 2013; 7: 267 – 78

57. Sawadaishi K, Miura K, Ohtsuka E, Ueda T, Ishizaki K, Shinriki N. Ozonolysis of supercoiled pBR322 DNA resulting in strand scission to open circular DNA1. Nucleic acids research. Oxford Univ Press; 1985; 13: 7183 – 94

58. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. The Journal of general and applied microbiology. 2002; 48: 193 – 9

59. Young S, Setlow P. Mechanisms of killing of Bacillus subtilis spores by Decon and OxoneTM, two general decontaminants for biological agents. Journal of applied microbiology. Wiley Online Library; 2004; 96: 289 – 301

60. Manjunath R, Singla D, Singh A. Ozone Revisited. Journal of Advanced Oral Research. 2015; 6: 39 – 43

61. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Archives of medical research. Elsevier; 2006; 37: 425 – 35

62. Johansson E, Claesson R, Van Dijken J. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. Journal of dentistry. Elsevier; 2009; 37: 449 – 53

63. Costanzo M, Cisterna B, Vella A, Cestari T, Covi V, Tabaracci G, et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. European Journal of Histochemistry. 2015; 59: 129 – 35

64. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. Mediators of inflammation. Hindawi Publishing Corporation; 1999; 8: 205 – 9

65. Bocci V DSP10:110-116. Valacchi G Rossi R Giustarini D Paccagnini E Pucci AM. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets,.Platelets. 1999; 10: 110 – 6

66. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. Journal of Korean medical science. 2009; 24: 368 – 74

67. Re L, Sanchez GM, Mawsouf N. Clinical evidence of ozone interaction with pain mediators. Saudi medical journal. 2010; 31: 1363 – 7

68. Kaul R, Shilpa P. Multifaceted ozone and its application in dentistry. Universal Research Journal of Dentistry. 2014; 4: 139 – 44

69. Gupta G MB. Ozone therapy in periodontics. J Med Life. Carol Davila-University Press; 2012; 5(1): 59 – 67

70. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques J. Ozone therapy in medicine and dentistry. J Contemp Dent Pract. 2008; 9: 75 – 84

71. Bocci V. The Potential Toxicity of Ozone: Side Effects and Contraindications of Ozonetherapy. Ozone. Springer; 2011. p. 75 – 84

72. WHO. Air Quality Guidelines: Global Update 2005. Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide. World Health Organization; 2006.

73. Sagai M BV. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? Med Gas Res. 2011; 1: 29

74. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences; 1997; 94: 514 – 9

75. Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. Toxicology in vitro. Elsevier; 2005; 19: 55 – 61

76. Purcell EM, Morin DJ. Electricity and magnetism. Cambridge University Press; 2013.

77. Wang Z. Electromagnetic Field Interaction with Biological Tissues and Cells. University of London Queen Mary; 2009.

78. Guo L, Kubat NJ, Isenberg RA. Pulsed radio frequency energy (PRFE) use in human medical applications. Electromagnetic biology and medicine. Informa Healthcare New York; 2011; 30: 21 – 45

79. Zohdi T. Modeling electrical power absorption and thermally-induced biological tissue damage. Biomechanics and modeling in mechanobiology. Springer; 2014; 13: 115 – 121

80. Markov MS. Electromagnetic Fields in Biology and Medicine. CRC Press; 2015.

81. Martin GT, Pliquett UF, Weaver JC. Theoretical analysis of localized heating in human skin subjected to high voltage pulses. Bioelectrochemistry. Elsevier; 2002; 57: 55 – 64

82. Pliquett UF, Martin GT, Weaver JC. Kinetics of the temperature rise within human stratum corneum during electroporation and pulsed high-voltage iontophoresis. Bioelectrochemistry. Elsevier; 2002; 57: 65 – 72

83. Becker S, Kuznetsov A. Heat Transfer and Fluid Flow in Biological Processes: Advances and Applications. Academic Press; 2014.

84. Kumar P, Kumar D, Rai K. A numerical study on dual-phase-lag model of bio-heat transfer during hyperthermia treatment. Journal of thermal biology. Elsevier; 2015; 49: 98 – 105

85. Oliveira Guirro EC de, Jesus Guirro RR de, Dibai-Filho AV, Pascote SCS, Rodrigues-Bigaton D. Immediate Effects of Electrical Stimulation, Diathermy, and Physical Exercise on Lower Limb Arterial Blood Flow in Diabetic Women With Peripheral Arterial Disease: A Randomized Crossover Trial. Journal of manipulative and physiological therapeutics. Elsevier; 2015; 38: 195 – 202

86. Giuliani L, Soffritti M. Non-thermal effects and mechanisms of interaction between electromagnetic fields and living matter. National Institute for the Study and Control of Cancer and Enviromental Diseases" Bernardino Ramazzini; 2010.

87. Morgan H, Green N. Dielectrophoresis. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics. Springer; 2015; 563 – 72

88. Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: a review. Bioelectrochemistry and bioenergetics. Elsevier; 1996; 41: 135 – 60

89. Gulbins E, Coggeshall KM, Brenner B, Schlottmann K, Linderkamp O, Lang F. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. Journal of Biological Chemistry. ASBMB; 1996; 271: 26389 – 94

90. Watson T. Electrotherapy : Evidence Based Practice. Edinburgh, Churchill Livingstone - Elsevier. 2008.

91. Kumaran B, Watson T. Radiofrequency-based treatment in therapy-related clinical practice-a narrative review. Part I: acute conditions. Physical Therapy Reviews. 2015; 20: 241 – 54

92. McLeod KJ, Rubin C. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. The Journal of Bone & Joint Surgery. The Journal of Bone and Joint Surgery, Inc.; 1992; 74: 920 – 9

93. Ryaby JT. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. Clinical orthopaedics and related research. LWW; 1998; 355: 205 – 15

94. Cicekcibasi AE, Celik I, Salbacak A, Ozkan Y, Okudan N, Buyukmumcu M. Determination of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on the percentages of peripheral blood leukocytes and histology of lymphoid organs of the mouse. Saudi medical journal. 2008; 29: 36 – 41

95. Conti P, Gigante G, Alesse E, Cifone M, Fieschi C, Reale M, et al. A role for Ca 2+ in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. FEBS letters. Elsevier; 1985; 181: 28 – 32

96. Yost M, Liburdy R. Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. FEBS letters. Elsevier; 1992; 296: 117 – 122

97. Lyle DB, Wang X, Ayotte RD, Sheppard AR, Adey WR. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. Bioelectromagnetics. Wiley Online Library; 1991; 12: 145 – 56

98. Byus CV, Kartun K, Pieper S, Adey WR. Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. Cancer research. AACR; 1988; 48: 4222 – 4226

99. Blank M. Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na, K-ATPase? Bioelectromagnetics. Wiley Online Library; 2005; 26: 677 – 83

100. Blank M. Na, K-ATPase function in alternating electric fields. The FASEB journal. FASEB; 1992; 6: 2434 – 8

101. Serpersu E, Tsong TY. Activation of electrogenic Rb+ transport of (Na, K)-ATPase by an electric field. Journal of Biological Chemistry. ASBMB; 1984; 259: 7155 – 62

102. Zhou J, Li C, Yao G, Chiang H, Chang Z. Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz magnetic field. Bioelectromagnetics. Wiley Online Library; 2002; 23: 339 – 46

103. Phillips JL. Effects of electromagnetic field exposure on gene transcription. Journal of cellular biochemistry. Wiley Online Library; 1993; 51: 381 – 6

104. Phillips JL, Haggren W, Thomas WJ, Ishida-Jones T, Adey WR. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. Elsevier; 1992; 1132: 140 – 4

105. Cadossi R, Bersani F, Cossarizza A, Zucchini P, Emilia G, Torelli G, et al. Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. The FASEB journal. FASEB; 1992; 6:2667 –2674

106. Rodemann HP, Bayreuther K, Pfleiderer G. The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields. Experimental cell research. Elsevier; 1989; 182: 610 – 621

107. Beason RC, Semm P. Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus. Neuroscience Letters. Elsevier; 2002; 333: 175 – 8

108. Faes T, Meij H Van der, De Munck J, Heethaar R. The electric resistivity of human tissues (100 Hz-10 MHz): a meta-analysis of review studies. Physiological measurement. IOP Publishing; 1999; 20: R1

109. Gabriel S, Lau R, Gabriel C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. Physics in medicine and biology. IOP Publishing; 1996; 41: 2251

110. Holder D. Electrical impedance tomography: methods, history and applications, Appendix A. Brief introduction to bioimpedance. Electrical Impedance Tomography: Methods, History and Applications. CRC Press; 2004. p. 411 – 422

111. Rosell J, Colominas J, Riu P, Pallas-Areny R, Webster JG. Skin impedance from 1 Hz to 1 MHz. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. IEEE; 1988; 35: 649 – 51

112. Serry A, Adel M, Elden EM. Accuracy of electronic apex locator in relation to the condition of human dental pulp: Histological and histochemical study. J Am Sci. 2012; 8

113. Huysmans M-C, Longbottom C, Pitts N, Los P, Bruce P. Impedance spectroscopy of teeth with and without approximal caries lesions-an in vitro study. Journal of dental research. SAGE Publications; 1996; 75: 1871 – 8

114. Morais AP, Pino AV, Souza MN. Assessment of Tooth Structure using an Alternative Electrical Bioimpedance Spectroscopy Method. Brazilian dental journal. SciELO Brasil; 2014; 25: 146 –52

115. Chinen K, Kinjo I, Zamami A, Irei K, Nagayama K. New equivalent-electrical circuit model and a practical measurement method for human body impedance. Bio-Medical Materials and Engineering. IOS Press; 2015; 26: 779 – 86

116. Dobrev D, Daskalov I. Two-electrode biopotential amplifier with current-driven inputs. Medical and Biological Engineering and Computing. Springer; 2002; 40: 122 – 7

117. Poltawski L, Watson T. Bioelectricity and microcurrent therapy for tissue healing–a narrative review. Physical Therapy Reviews. Maney Publishing; 2009; 14: 104 – 114

118. Smith RB. Microcurrent therapies: emerging theories of physiological information processing. NeuroRehabilitation. IOS Press; 2002;17: 3 – 7

119. Yu C, Hu Z-Q, Peng R-Y. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. Military Medical Research. BioMed Central Ltd; 2014; 1: 24

120. Zuim PRJ, Garcia AR, Turcio KHL, Hamata MM. Evaluation of microcurrent electrical nerve stimulation (MENS) effectiveness on muscle pain in temporomandibular disorders patients. Journal of Applied Oral Science. SciELO Brasil; 2006; 14 :61 – 6

121. Cheng N, Van Hoof H, Bockx E, Hoogmartens MJ, Mulier JC, De Dijcker FJ, et al. The Effects of Electric Currents on ATP Generation, Protein Synthesis, and Membrane Transport in Rat Skin. Clinical Orthopaedics and Related Research. LWW; 1982; 171: 264 – 72

122. Aaron RK, Ciombor DM. Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair. Journal of cellular biochemistry.Wiley Online Library; 1993; 52: 42 – 6

123. Santos VNS, Ferreira LM, Horibe EK, Duarte I da S. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. Acta Cirurgica Brasileira. SciELO Brasil; 2004; 19: 466 – 70

124. Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. Clinical orthopaedics and related research. LWW; 2004; 419: 30 – 7

125. Reger SI, Hyodo A, Negami S, Kambic HE, Sahgal V. Experimental wound healing with electrical stimulation. Artificial organs. Wiley Online Library; 1999; 23: 460 – 462

126. Bourguignon G, Bourguignon L. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. The FASEB Journal. FASEB; 1987; 1: 398 – 402

127. Gardner SE, Frantz RA, Schmidt FL. Effect of electrical stimulation on chronic wound healing: a meta-analysis. Wound Repair and Regeneration. Wiley Online Library; 1999; 7: 495 – 503

128. Korenstein R, Somjen D, Fischler H, Binderman I. Capacitative pulsed electric stimulation of bone cells. Induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. Elsevier; 1984; 803: 302 – 7

129. Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. Journal of Investigative Dermatology. Nature Publishing Group; 1983; 81: 144 – 8

130. Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, Campbell KE, Keast DH, Woodbury MG, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. Physical therapy. American Physical Therapy Association; 2003; 83: 17 – 28

131. Konikoff J. Electrical promotion of soft tissue repairs. Annals of biomedical engineering. Springer; 1976; 4: 1 – 5

132. Otter MW, McLeod KJ, Rubin CT. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. Clinical orthopaedics and related research. LWW; 1998; 355: 90 – 104

133. Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. Journal of Orthopaedic research. Wiley Online Library; 2004; 22: 80 – 4

134. Byers JM, Clark KF, Thompson GC. Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. American Medical Association; 1998; 124: 383 – 9

135. Raji A, Bowden R. Effects of high-peak pulsed electromagnetic field on the degeneration and regeneration of the common peroneal nerve in rats. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery; 1983; 65: 478 – 92

136. Sisken BF, Walker J, Orgel M. Prospects on clinical applications of electrical stimulation for nerve regeneration. Journal of cellular biochemistry. Wiley Online Library; 1993; 51: 404 – 9

137. Pennington G, Danley D, Sumko M, Bucknell A, Nelson J. Pulsed, non-thermal, high-frequency electromagnetic energy (DIAPULSE) in the treatment of grade I and grade II ankle sprains. Military medicine. 1993; 158: 101 – 4

138. Jarit GJ, Mohr KJ, Waller R, Glousman RE. The effects of home interferential therapy on post-operative pain, edema, and range of motion of the knee. Clinical Journal of Sport Medicine. LWW; 2003; 13: 16 – 20

139. Jayakumar K, Rajagopalan T, Sambasivan M, Bai S. Effect of pulsed electromagnetic field (PEMF) in cerebral oedema. Neurol India. 1986; 34: 241 – 7

140. McMakin CR, Gregory WM, Phillips TM. Cytokine changes with microcurrent treatment of fibromyalgia associated with cervical spine trauma. Journal of Bodywork and Movement Therapies. Elsevier; 2005; 9: 169 – 76

141. Simpson CA. Complementary Medicine in Chronic Pain Treatment. Physical medicine and rehabilitation clinics of North America. Elsevier; 2015; 26: 321 – 347

142. Naeser MA, Hahn K-AK, Lieberman BE, Branco KF. Carpal tunnel syndrome pain treated with low-level laser and microamperes transcutaneous electric nerve stimulation: a controlled study. Archives of physical medicine and rehabilitation. Elsevier; 2002; 83: 978 – 88

143. McMakin CR. Microcurrent therapy: A novel treatment method for chronic low back myofascial pain. Journal of Bodywork and Movement Therapies. Elsevier; 2004; 8: 143 – 53

144. Zizic TM, Hoffman KC, He YD, Caldwell JR, Deal C, Holt PA, et al. The treatment of rheumatoid arthritis of the hand with pulsed electrical fields. Electricity and Magnetism in Biology and Medicine. Springer; 1999: 939 – 42

145. Zizic TM, Hoffman KC, Holt PA, Hungerford DS, O'Dell JR, Jacobs MA, et al. The treatment of osteoarthritis of the knee with pulsed electrical stimulation. J Rheumatol. 1995; 22: 1757 – 61

146. Kaada B. Treatment of peritendinitis calcarea of the shoulder by transcutaneous nerve stimulation. Acupunct Electrother Res. 1984; 9: 115 – 25

147. Lee EWC, Maffulli N, Li CK, Chan KM. Pulsed magnetic and electromagnetic fields in experimental achilles tendonitis in the rat: a prospective randomized study. Archives of physical medicine and rehabilitation. Elsevier; 1997; 78: 399 – 404

148. Bertolucci LE, Grey T. Clinical comparative study of microcurrent electrical stimulation to mid-laser and placebo treatment in degenerative joint disease of the

temporomandibular joint. Cranio: the journal of craniomandibular practice. 1995; 13: 116 – 20

149. McMakin C. Microcurrent treatment of myofascial pain in the head, neck, and face. Topics in Clinical Chiropractic. ASPEN PUBLICATION; 1998; 5: 29 – 35
150. Gomes RC, Brandino HE, Sousa NTA de, Santos MF, Martinez R, Jesus Guirro RR de. Polarized currents inhibit In Vitro growth of bacteria colonizing cutaneous ulcers. Wound Repair and Regeneration. Wiley Online Library; 2015
151. Szuminsky NJ, Albers AC, Unger P, Eddy JG. Effect of narrow, pulsed high voltages on bacterial viability. Physical therapy. American Physical Therapy Association; 1994; 74: 660 – 667
152. Funk RH. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. Frontiers in Physiology. Frontiers Media SA; 2015; 6: 143
153. McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. Physiological reviews. Am Physiological Soc; 2005; 85: 943 – 78
154. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 2014; 140: 344 – 58
155. Wang B-G, König K, Halbhuber K-J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. Journal of microscopy. Wiley Online Library; 2010; 238: 1 – 20
156. Karu TI. Cellular mechanisms of photobiomodulation. Lasers in Dentistry: Guide for Clinical Practice. John Wiley & Sons, Inc; 2015; 23 – 6
157. Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: Exploring the role of redox mechanisms. Photomedicine and laser surgery. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801-5215 USA; 2008; 26: 323 – 8
158. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 2005; 81: 98 – 106
159. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 1989; 3: 638
160. Karu T, Tiphlova O, Esenaliev R, Letokhov V. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on Escherichia coli. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 1994; 24: 155 – 61
161. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radical Biology and Medicine. Elsevier; 1995; 18: 775 – 94
162. Çetiner S, Kahraman SA, Yücetas Su. Evaluation of low-level laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders. Photomedicine and Laser Therapy. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA; 2006; 24: 637 – 41
163. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology. Elsevier; 1999; 49: 1 – 17

164. Maloney MD, Goater JJ, Parsons R, Ito H, O'Keefe RJ, Rubery PT, et al. Safety and efficacy of ultraviolet-a light-activated gene transduction for gene therapy of articular cartilage defects. The Journal of Bone & Joint Surgery. The Journal of Bone and Joint Surgery, Inc; 2006; 88: 753 – 61

165. Maclean M, McKenzie K, Anderson J, Gettinby G, MacGregor S. 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. Journal of Hospital Infection. Elsevier; 2014; 88: 1 – 11

166. Ricchelli F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 1995; 29: 109118

167. Ghadamgahi M, Ajloo D. The effects of urea, guanidinium chloride and sorbitol on porphyrin aggregation: Molecular dynamics simulation. Journal of Chemical Sciences. Springer; 2013; 125: 627 – 641

168. Davidovits P. Physics in biology and medicine. Academic press; 2012.

169. Haynie DT. Biological thermodynamics. Cambridge University Press; 2001: 1 – 16

170. Shannon CE. A mathematical theory of communication. ACM Sigmobile Mobile Computing and Communications Review. ACM; 2001; 5: 3 – 55

171. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. science. American Association for the Advancement of Science; 2009; 324: 1029 – 33

172. Rolfe D, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiological reviews. Am Physiological Soc; 1997; 77: 731 – 58

173. Kang J, Pervaiz S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. Biochemistry research international. Hindawi Publishing Corporation; 2012.

174. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. Journal of Physics D: Applied Physics. IOP Publishing; 2012; 45: 263001

175. Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences; 2009; 106: 15651 – 6

176. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. The Journal of general physiology. Rockefeller Univ Press; 1927; 8: 519 – 30

177. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. American Association for the Advancement of Science; 1956; 123: 309 – 14

178. Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, et al. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth Otto Warburg Revisited. Journal of Biological Chemistry. ASBMB; 2006; 281: 977 – 81

179. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. Cancer cell. Elsevier; 2007; 11: 37 – 51

180. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, Koch BJ, et al. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. Neoplasia. Elsevier; 2011; 13: 620 – 32

181. Hensley K, Harris-White ME. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration. Neurobiology of disease. Elsevier; 2015; doi:10.1016/j.nbd.2015.03.002

182. Konradi J, Mollenhauer M, Baldus S, Klinke A. Redox-sensitive mechanisms underlying vascular dysfunction in heart failure. Free radical research. Taylor & Francis; 2015; 1 – 22

183. Kramer PA, Darley-Usmar VM. The Emerging Theme of Redox Bioenergetics in Health and Disease. Biomedical journal. 2015; 10.4103/2319-4170.155591

184. Pedersen PL. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview. Journal of bioenergetics and biomembranes. Springer; 2007; 39: 1 –12

185. Clément M-V, Pervaiz S. Intracellular superoxide and hydrogen peroxide concentrations: a critical balance that determines survival or death. Redox report: communications in free radical research. 2001; 6: 211 – 5

186. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. Archives of Biochemistry and Biophysics. Elsevier; 2004; 423: 12 – 2

187. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. Cell. Elsevier; 2010; 140: 871 – 82

188. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews; 2004; 55: 373 – 99

189. Han D, WILLIAMS E, CADENAS E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem. J. 2001; 353: 411 – 6

190. Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radical Biology and Medicine. Elsevier; 2009; 46: 1283 – 97

191. Piskernik C, Haindl S, Behling T, Gerald Z, Kehrer I, Redl H, et al. Antimycin A and lipopolysaccharide cause the leakage of superoxide radicals from rat liver mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. Elsevier; 2008; 1782: 280 – 5

192. Ježek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. The international journal of biochemistry & cell biology. Elsevier; 2005; 37: 2478 –503

193. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Experimental gerontology. Elsevier; 2010; 45: 466 – 72

194. Lee CR, Patel JC, O'Neill B, Rice ME. Inhibitory and excitatory neuromodulation by hydrogen peroxide: translating energetics to information. The Journal of physiology. Wiley Online Library; 2015; 16:3431 – 46

195. Rakhit RD, Mojet MH, Marber MS, Duchen MR. Mitochondria as targets for nitric oxide–induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. Circulation. Am Heart Assoc; 2001; 103: 2617 – 23

196. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science. American Association for the Advancement of Science; 2003; 299: 896 – 9

197. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. Free Radical Biology and Medicine. Elsevier; 2002; 33: 1451 – 64

198. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation; 2003; 111: 769

199. Levin M. Endogenous bioelectrical networks store non-genetic patterning information during development and regeneration. The Journal of physiology. Wiley Online Library; 2014; 592: 2295 –305

200. Levin M. Morphogenetic fields in embryogenesis, regeneration, and cancer: non-local control of complex patterning. Biosystems. Elsevier; 2012; 109: 243 – 61

201. De Angelis A. Electro-optical pump-probe system suitable for the investigation of electroporated biological cells. Limoges; 2012.

202. Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. Current topics in developmental biology. Elsevier; 2003; 58: 1 – 26

203. Chen C, McCabe R, Grodzinsky A, Vanderby R. Transient and cyclic responses of strain-generated potential in rabbit patellar tendon are frequency and pH dependent. Journal of biomechanical engineering. American Society of Mechanical Engineers; 2000; 122:465 – 70

204. Denning D, Paukshto M, Habelitz S, Rodriguez BJ. Piezoelectric properties of aligned collagen membranes. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. Wiley Online Library; 2014; 102: 284 – 92

205. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. Annual review of cell biology. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1988; 4: 155 – 81

206. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. Trends in biochemical sciences. Elsevier; 2001; 26: 23 – 9

207. Liberman E, Topaly V, Tsofina L, Jasaitis A, Skulachev V. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. Nature Publishing Group; 1969

208. Szent-Györgyi A. The study of energy-levels in biochemistry. Nature. 1941; 148: 157 – 9

209. Cope FW. A review of the applications of solid state physics concepts to biological systems. Journal of Biological Physics. Springer; 1975; 3: 1 – 41

210. Lai WM, Mow VC, Sun DD, Ateshian GA. On the electric potentials inside a charged soft hydrated biological tissue: streaming potential versus diffusion potential. Journal of biomechanical engineering. American Society of Mechanical Engineers; 2000; 122: 336 – 46

211. Kim Y-J, Bonassar LJ, Grodzinsky AJ. The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression. Journal of biomechanics. Elsevier; 1995; 28: 1055 – 1066

212. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. Annals of the New York Academy of Sciences. Wiley Online Library; 2006; 1080: 76 – 84

213. Pullar CE, Baier BS, Kariya Y, Russell AJ, Horst BA, Marinkovich MP, et al. β4 integrin and epidermal growth factor coordinately regulate electric field-mediated directional migration via Rac1. Molecular biology of the cell. Am Soc Cell Biol; 2006; 17: 4925 – 35

214. Olivotto M, Arcangeli A, Carlà M, Wanke E. Electric fields at the plasma membrane level: a neglected element in the mechanisms of cell signalling. Bioessays. Wiley Online Library; 1996; 18: 495 – 504

215. Becker RO, Marino AA. Electron paramagnetic resonance spectra of bone and its major components. Nature. 1966; 210: 583 – 8

216. Fernandez J, Garcia-Aznar J, Martınez R. Piezoelectricity could predict sites of formation/resorption in bone remodelling and modelling. Journal of theoretical biology. Elsevier; 2012; 292: 86 – 92

217. Pokorn J, Hašek J, Jelınek F. Electromagnetic field of microtubules: effects on transfer of mass particles and electrons. Journal of biological physics. Springer; 2005; 31: 501 – 14

218. Gurwitsch A. Versuch einer synthetischen Biologie. Gebrüder Borntraeger Berlin; 1923.

219. Gupta A, Kumar A. Optogenetics: Past, present and future. AIP Conf. Proc. 2013. p. 1221 – 2

220. Valone TF. Bioelectromagnetic healing: a rationale for its use. Integrity Research Institute; 2003.

221. Popp F. Evolution as the expansion of coherent states. Recent Advances in Biophoton Research. 1992; 445 – 6

222. Popp F-A. Biophotons - background, experimental results, theoretical approach and applications. Integrative Biophysics. Springer; 2003. p. 387 – 438

223. Rahnama M, Tuszynski JA, Bokkon I, Cifra M, Sardar P, Salari V. Emission of mitochondrial biophotons and their effect on electrical activity of membrane via microtubules. Journal of integrative neuroscience. World Scientific; 2011; 10: 65 – 88

224. Podaci dobiveni od proizvođača Bizonix GmbH, Muenchen, Deutschland.

225. Stephan AD. Survey of instrumentation and measurement. Wiley-IEEE, New York; 2001: 401

226. Vujević D. Magnetometri. Kiklos-krug knjige; 2012.

227. Novotny M, Sedlacek M. RMS value measurement based on classical and modified digital signal processing algorithms. Measurement. Elsevier; 2008; 41: 236 – 50

228. Galović A. Termodinamika II,. FSB, Zagreb. Fakultet strojarstva i brodogradnje; 2003: 139

229. Soerensen DD, Clausen S, Mercer JB, Pedersen LJ. Determining the emissivity of pig skin for accurate infrared thermography. Computers and Electronics in Agriculture. Elsevier; 2014; 109: 52 – 58

230. Podaci dobiveni od proizvođača, FLIR Systems AB Sweden

231. Božikov J, Ivankovi D, Kern J, Kopjar B, Lukovi G, Vuleti S. Osnove statisticke analize za medicinare. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1991.

232. White R, Robson R, Nicoletopoulos P, Dujko S. Periodic structures in the Franck-Hertz experiment with neon: Boltzmann equation and Monte-Carlo analysis. The European Physical Journal D. Springer; 2012; 66: 1 – 9

233. Linstrom PJ, Mallard W. NIST Chemistry webbook; NIST standard reference database No. 69. 2001

234. Prevosto L, Kelly H, Mancinelli B, Chamorro J, Cejas E. On the physical processes ruling an atmospheric pressure air glow discharge operating in an intermediate current regime. Physics of Plasmas (1994-present). AIP Publishing; 2015;22:023504

235. Pal G, Dutta A, Mitra K, Grace MS, Amat A, Romanczyk TB, et al. Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier; 2007; 86: 252 – 61

236. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. Microvascular Research. Elsevier; 2002; 64: 240 – 6

237. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Kerschan K, Knobler R, Schindl L. Diabetic neuropathic foot ulcer: successful treatment by low-intensity laser therapy. Dermatology (Basel, Switzerland). 1998; 198: 314 – 6

238. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France). 2000; 46: 1297 – 303

239. Nayak S, Dinda A. Lower level laser therapy for pain management: an integrative review. Carib.j.SciTech. 2015; 3: 744 – 51

240. Tunér J, Beck-Kristensen PH, Ross G, Ross A. Photobiomodulation in Dentistry. Principles and Practice of Laser Dentistry. Elsevier Health Sciences; 2015; 251

241. Bruggeman P, Walsh JL, Schram DC, Leys C, Kong MG. Time dependent optical emission spectroscopy of sub-microsecond pulsed plasmas in air with water cathode. Plasma Sources Science and Technology. IOP Publishing; 2009; 18: 045023

242. Mendis D, Rosenberg M, Azam F. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. Plasma Science, IEEE Transactions on. IEEE; 2000; 28: 1304 – 1306

243. Laroussi M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. Plasma Science, IEEE Transactions on. IEEE; 2002; 30: 1409 – 15

244. Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets VN, et al. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. Plasma Processes and Polymers. Wiley Online Library; 2007; 4: 370 – 5

245. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. Plasma Chemistry and Plasma Processing. Springer; 2007; 27: 163 – 76

246. Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. Plasma Chemistry and Plasma Processing. Springer; 2006; 26: 425 – 42

247. Guffey JS, Wilborn J. In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. Photomedicine and Laser Therapy. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA; 2006; 24: 684 – 8

248. Foster KR. Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems. Plasma Science, IEEE Transactions on. IEEE; 2000; 28: 15 – 23

249. Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. Radio Science Bulletin. 2003; 307: 9 – 32

250. Khan I, Arany P. Biophysical Approaches for Oral Wound Healing: Emphasis on Photobiomodulation. Advances in Wound Care. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA

251. Dombrovsky LA, Timchenko V, Pathak C, Piazena H, Müller W, Jackson M. Radiative heating of superficial human tissues with the use of water-filtered infrared-A radiation: A computational modeling. International Journal of Heat and Mass Transfer. Elsevier; 2015; 85: 311 – 20

252. Benzon H, Rathmell JP, Wu CL, Turk DC, Argoff CE. Raj's practical management of pain. Elsevier Health Sciences; 2008: 1 – 46

253. Hancock CP, Burn P, Duff C, Sloan R, White M, Bishop J, et al. A New Wave in Electrosurgery: A Review of Existing and Introduction to New Radio-Frequency and Microwave Therapeutic Systems. Microwave Magazine, IEEE; 2015; 16: 14 – 30

254. Sheppard AR, Swicord ML, Balzano Q. Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. Health physics. LWW; 2008; 95: 365 – 96

255. Haynie DT. Biological thermodynamics. Cambridge University Press; 2008: 1 – 16

8 ŽIVOTOPIS

Domagoj Prebeg rođen je 23. ožujka 1978. godine u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2004. godine. Nakon obaveznog jednogodišnjeg pripravničkog staža provedenog u ordinaciji Dr. Branka Radionova počinje se baviti istraživanjem mogućnosti primjene biooksidacijskih postupaka u medicini i stomatologiji. U sklopu navedenog istraživanja od 2005. godine radi kao stručni suradnik i voditelj razvoja u tvrtki Biozon d.o.o Hrvatska, koju napušta 2010. godine. Iste godine postaje član stručnog odbora za edukaciju i znanost udruženja „*Ozone Academy*“ te predsjednik udruge „*Za život*“ čiju su ciljevi širenje znanja i primjena najnovijih znanstvenih spoznaja sa svrhom očuvanja i unaprjeđenja zdravlja pojedinaca, društva i prirode.

U sklopu poslijediplomskog doktorskog studija, pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Božidara Pavelića (Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) i prof.dr.sc Davora Pavune (Laboratory of Physics of Complex Matter, Lausanne, Switzerland) a uz suradnju s Fakultetom za elektrotehniku i računarstvo Sveučilišta u Zagrebu te Institutom za fiziku u Zagrebu, u razdoblju od 2013-2016 provodi istraživanja fizičkih i kemijskih čimbenika prisutnih u terapijskom polju visokofrekvencijskog generatora ozona.

Autor je i suautor više znanstvenih i stručnih članaka.

Popis radova:

1. **Prebeg D**, Pavelić B, Cirfek M, Milošević S, Krois I, Katunarić M, Šegović S, Koridć M. Analysis of electric field and emission spectrum in the glow discharge of therapeutic plasma electrode. Automatika**.** (zaprimljeno za objavu)
2. **Prebeg, D**, Pavelić B, Šegović S, Katunarić M, Budimir A, Anić I. Antimicrobial effect of cold atmospheric plasma produced by dielectric barrier discharge of high frequency ozone generator against Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Int Endod J (zaprimljeno za objavu)
3. **Prebeg D**, Katunarić M, Budimir A, Pavelic B, Šegović S, Anić I. Antimicrobial effect of ozone made by KP syringe of high-frequency ozon generator, **Acta stomatol Croat**. 2016;50(1):134-42.
4. Pavelić B, **Prebeg D**, Jurmanović D, Brailo V, Vidović Juras D, Puhar I, et al. Atmospheric plasma clinical application in dentistry. Medix.2015;21;274–80
5. Pavelić B, **Prebeg D**, Šaban A, Pavelić B, Bilandžija V, Šegović S, et al. Basic theory and therapeutic possibilities of applying plasma therapy in dentistry. Medix. 2014;20;250–5.
6. Pavuna D, Pavelić B, Pavićević O, **Prebeg D**, Zovak M. The Emergence and Ozone Treatment Studies of Living Cells. In: Brnjas-Kraljević J, Greta Pifat-Mrzljak G, editors. Supramolecular Structure and Function 10. Springer 2011.
7. Filipović-Zore I, Divić Z, Duski R, Gnjatović N, Galić N, **Prebeg D**. Impact of ozone on healing after alveolectomy of impacted lower third molars. Saudi medical journal. 2011; 32: 642 – 4