

SINTEZA LUCRĂRII

Programul:	IDEI
Tipul proiectului:	Proiecte de cercetare exploratorie
Cod proiect:	ID_54

CONTRACTOR:

**Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare
pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației**

Contract de finanțare nr. 19 / 28.09.2007

Titlul proiectului:

*“Noi structuri pulsate cu tensiuni înalte,
generatoare de jeturi de plasmă rece la presiunea atmosferei terestre,
cu aplicații bio-medicale”*

Faza 3: 15 septembrie 2009

Obiectivele fazei:

- 1. Caracterizarea fizico-chimică a jetului de plasmă rece pulsată.*
- 2. Studiul efectelor jeturilor de plasmă rece pulsată la presiune atmosferică asupra celulelor vii.*

În ultimul deceniu, mulțimea aplicațiilor posibile a impulsionat puternic cercetările din domeniul plasmelor reci la presiune atmosferică (“atmospheric pressure cold plasmas”). Aceste plasmă sunt sisteme în neechilibru, având temperatura electronică mult mai mare decât cea ionică. Plasma este “rece” (non-termică) la nivel microscopic, având aproximativ temperatura mediului ambiant. Obținerea plasmei reci la presiune atmosferică reprezintă un avantaj hotărâtor de simplitate și de cost, în comparație cu plasmăle obținute la presiuni reduse, în instalații speciale.

Plasma rece este produsă în mediu gazos, prin descărcări în câmpuri electrice sau prin excitație cu câmpuri electromagnetice de radio-frecvență. Pentru obținerea sa cu eficiență maximă, cele mai potrivite medii de lucru sunt gazele inerte : heliu, argon. Din păcate, aceasta intră în contradicție cu necesitatea ca plasma să fie și activă chimic, pentru diversele aplicații avute în vedere. Rezolvarea acestei contradicții constituie cheia succesului în acest domeniu de cercetare.

Prezenta propunere de proiect are în vedere în primul rând aplicații bio-medicale. Este vorba de tratamente pe celule specifice (normale și tumorale). De aceea, proiectul urmărește obținerea de plasmă reci la presiune atmosferică în zone spațiale restrânse. Dimensiunile mici au impus denumirea de “microplasmă”.

În ultimii ani, microplasmă la presiune atmosferică sub formă de micro-sferă (“plasma needle”) sau micro-jet (“plasma pencil”, “plasma plume”) au fost obținute în câmpuri

electromagnetice de radio-frecvență [1, 2] sau de frecvențe relativ joase (zeci de kHz) [3 – 5]. Deși aceste cercetări au condus la multe rezultate valoroase, există totuși o problemă dificil de depășit : menținerea temperaturii macroscopice a plamei în limite acceptabile, în condițiile în care sarcina electrică “văzută” de generatorul de radio-frecvență este variabilă (fiind dependentă de distanța până la obiectul tratat, de starea suprafeței tratate, etc.). O mică abatere a acestei sarcini electrice de la valoarea optimă conduce la dezadaptarea generatorului de radio-frecvență și în consecință la o supraîncălzire nepermisă a microplamei.

Problema enunțată poate fi eliminată printr-o tehnică nouă [6 – 10], care constituie esența prezentei propuneri de proiect: utilizarea, pentru producerea plasmelor reci la presiune atmosferică, a impulsurilor de înaltă tensiune (zeci de kV), scurte (zeci, sute de nano-secunde), repetitive (zeci, sute de impulsuri pe secundă). Impulsurile se aplică între doi electrozi metalici, de diverse forme, separați de o barieră din material dielectric. Are loc o descărcare electrică într-o incintă, prin care circulă un flux de gaz la presiune atmosferică. Incinta are un orificiu (ajutaj) prin care plasma descărcării este expulzată în exterior. În condiții optime, plasma este emisă sub formă de jet, cu lungimi de ordinul centimetrilor, dar cu diametre milimetrice sau sub-milimetrice. Întrucât zona plamei de descărcare este separată spațial de zona de tratament, sarcina electrică pentru generatorul de impulsuri de înaltă tensiune este practic constantă, existând adaptare și transfer energetic maxim posibil.

Ținând seamă de aceste considerații, a fost normal ca primul obiectiv al proiectului să fie *“Realizarea generatorului de impulsuri de înaltă tensiune, care alimentează dispozitivul emițător de jeturi de plasmă rece la presiune atmosferică.”* A fost realizat un generator de impulsuri de înaltă tensiune cu caracteristicile din paragraful anterior.

În faza a doua a proiectului, obiectivele au fost: *“1. Realizarea de diverse structuri geometrice pentru generarea de jeturi de plasmă pulsată rece la presiune atmosferică. 2. Elaborarea de metode de activizare chimică a jeturilor de plasmă pulsată rece la presiune atmosferică.”* Au fost realizate și testate structuri geometrice de tip vârf-plan, vârf-vârf, plan-plan, fir-plan. Cele mai bune performanțe au fost obținute cu structurile: vârf-plan; vârfuri-plan; fir-plan. Pentru activizare chimică, gazul chimic activ introdus în jetul de gaz inert este oxigenul.

Sunt prezentate în continuare cercetările prin care au fost realizate cele două obiective ale prezentei faze de proiect.

1. Caracterizarea fizico-chimică a jetului de plasmă rece pulsată.

Pentru realizarea acestui obiectiv, au fost desfășurate două categorii mari de activități:

1.1. Caracterizarea electrică, spectrală și termică.

1.2. Determinarea compoziției chimice.

Din punct de vedere electric, jetul de plasmă este rezultatul aplicării între electrozi, într-un mediu gazos majoritar inert, a unor impulsuri de tensiune de până la 30 kV amplitudine, cu o durată la semi-înălțime de circa 100 ns și cu frecvențe de repetiție de 50 – 100 pulsuri pe secundă (pps). Există o tensiune minimă necesară pentru apariția jetului de plasmă. Pentru structura vârf-plan din Fig. 1, această tensiune minimă are valoarea de 13 kV.

Lungimea jetului de plasmă crește odată cu amplitudinea tensiunii aplicate. După cum se vede în Fig. 1, la o amplitudine de 20 kV, lungimea jetului de plasmă depășește 4 cm.

La structura fir-plan din Fig. 2, tensiunea minimă pentru apariția „pânzei” de plasmă este de 15 kV. La o amplitudine de 20 kV, „pânza” de plasmă are o lungime de circa 3 cm.

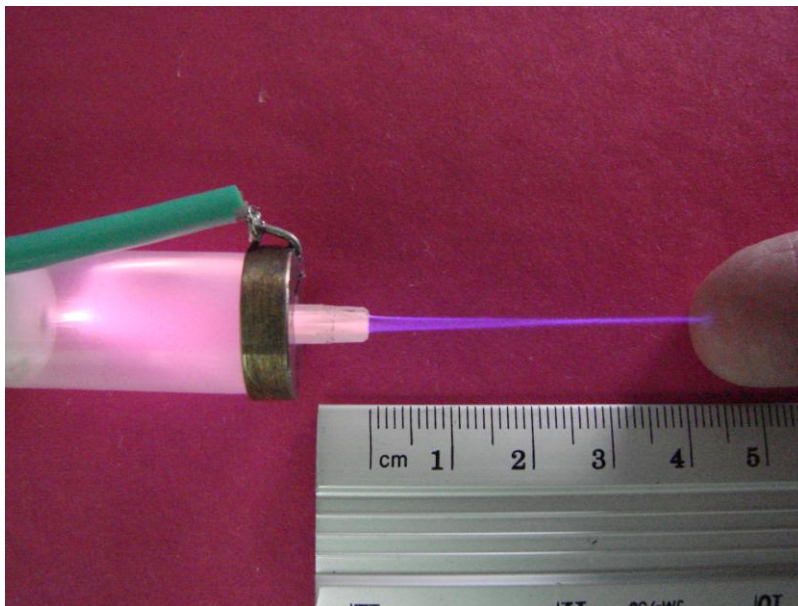


Fig. 1. Generarea unui jet de plasmă non-termică la presiune atmosferică, utilizând o structură vârf-plan.
Impulsul de tensiune dintre electrozi are amplitudinea de 20 kV.
Gaz de lucru: He, 4 l/min.

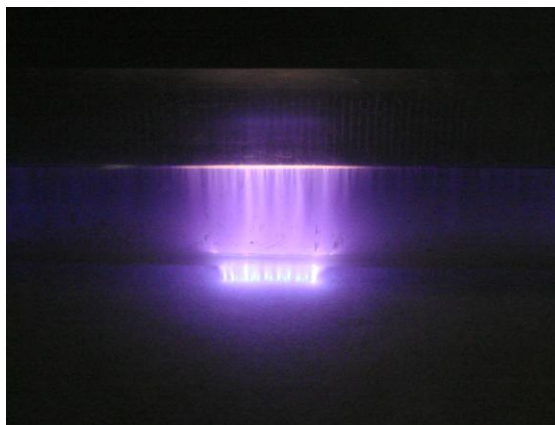


Fig. 2. Generarea de plasmă non-termică pulsată cu o structură fir-plan.
Impulsul de tensiune are amplitudinea de 20 kV.
Gaz de lucru: He, 4 l/min.

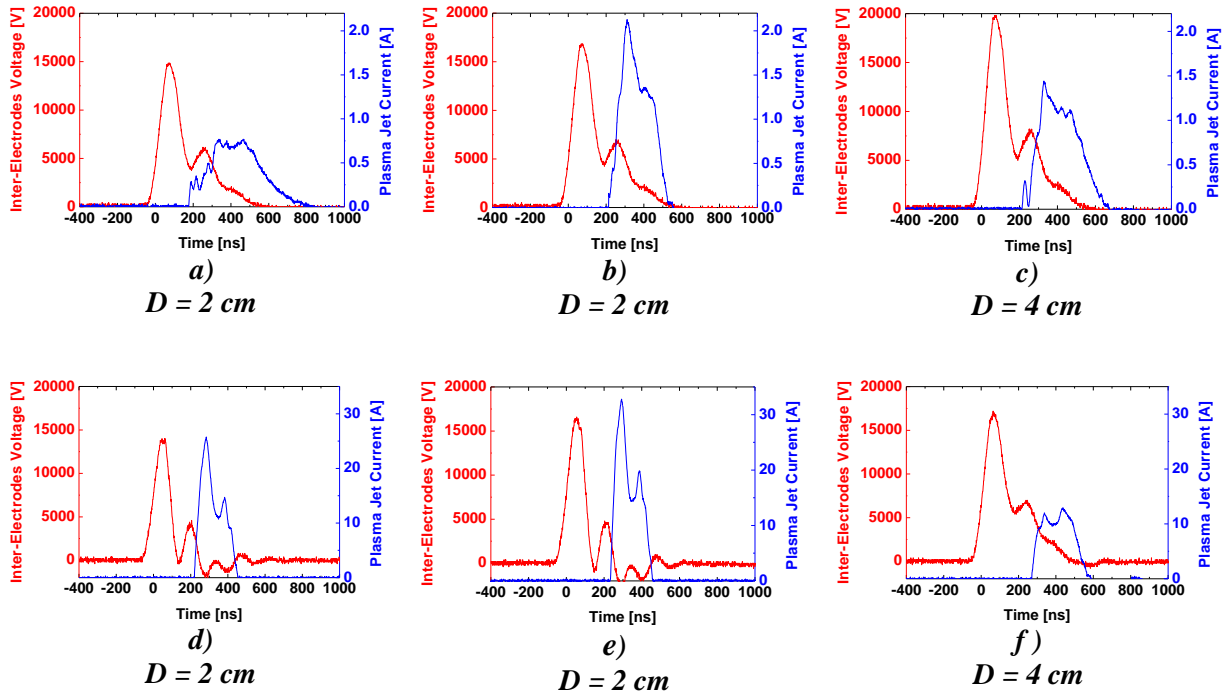


Fig. 3. Caracteristici electrice ale jeturilor de plasmă rece pulsată la presiune atmosferică. Variația temporală a tensiunii dintre electrozi și a curentului jetului de plasmă, măsurat la 2 cm de orificiul de ieșire a plasmei.
 a), b), c) – Gaz de lucru: Heliu, 2 l/min.
 d), e), f) – Gaz de lucru: Argon, 4 l/min.

În faza anterioară (faza 2) au fost prezentate evoluțiile temporale ale curentului jetului de plasmă la diverse distanțe față de orificiul de ieșire a jetului. Curentul jetului de plasmă scade odată cu depărtarea de orificiul de ieșire. În prezenta fază (Fig. 3) prezentăm corelațiile temporale dintre impulsurile de tensiune aplicată între electrozi și impulsurile de curent ale jetului de plasmă. Curentul este măsurat cu o rezistență de 0,5 Ohm, cuplată cu un capăt la masă, celălalt capăt fiind plasat în jetul de plasmă, la o distanță de 2 cm de orificiul de ieșire a jetului. Experimentele au fost efectuate cu structura din Fig. 1.

Distanțele dintre electrozi (D) sunt de 2 cm în Fig. 3 a, b, d, e și de 4 cm în Fig. 3 c, f. Se constată că prin creșterea distanței dintre electrozi, curentul jetului de plasmă se micșorează apreciabil, deși tensiunea dintre electrozi are cele mai mari amplitudini. Concluzia este că distanța optimă dintre electrozi este de 2 cm.

În al doilea rând, în Fig. 3 se observă diferențe mari între curenții de jet de plasmă măsurați cu gaz de lucru heliu (Fig. 3 a, b, c), respectiv argon (Fig. 3 d, e, f). Când gazul de lucru este heliu, descărcarea este difuză și curentul captat de capătul rezistenței de 0,5 Ohm este mult mai mic decât curentul total al jetului. În cazul argonului, fiecare descărcare este filamentară, firul de curent fiind integral captat de rezistența de măsură.

Caracteristicile electrice din Fig. 3 arată de asemenea o întârziere între maximum tensiunii dintre electrozi și maximum curentului de jet de plasmă. Întârzierea este rezultatul propagării jetului de plasmă pe distanța de 2 cm dintre orificiul de ieșire și capătul rezistenței de măsură a curentului. Această întârziere fiind de circa 200 ns, rezultă o viteză de propagare a jetului de plasmă de ordinul a 10^5 m/s.

Pentru determinarea caracteristicilor spectrale ale jeturilor de plasmă și implicit pentru determinarea compoziției chimice, a fost construit dispozitivul din Fig. 4.

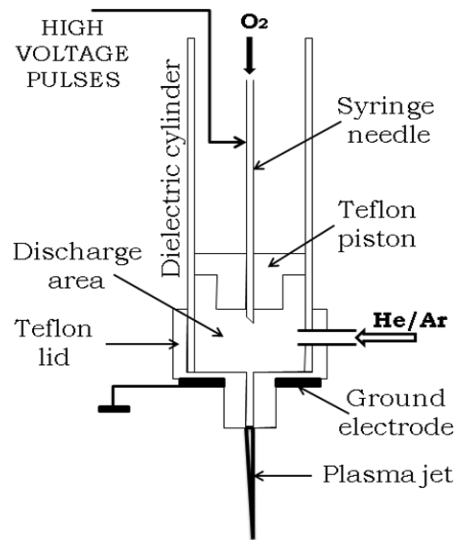


Fig. 4. Schița dispozitivului construit pentru determinarea caracteristicilor spectrale ale jeturilor de plasmă rece pulsată la presiune atmosferică.

Acest dispozitiv înlocuiește vechile dispozitive, realizate cu seringi medicale. Avantajul noii construcții este acela că permite flexibilitate la modificarea diversilor parametri geometrici. Dispozitivul din Fig. 4 este realizat cu un cilindru din material izolant, cu diametrul interior/exterior de 16/18 mm. În interiorul acestui cilindru se află pistonul realizat din teflon. Prin centrul acestui piston trece un ac de seringă medicală, cu diametrul interior/exterior de 0,5/0,8 mm. Acul de seringă constituie electrodul de înaltă tensiune. În același timp, constituie și dispozitivul de introducere a gazului de activizare chimică în spațiul de descărcare. Gazul inert majoritar (He/Ar), care facilitează apariția descărcărilor electrice la presiune atmosferică este introdus printr-un orificiu practicat în peretele lateral al cilindrului dielectric. Capătul inferior al cilindrului dielectric este acoperit cu un capac, realizat din teflon. În centrul acestui capac se află canalul de ieșire al jetului de plasmă. Diametrul interior al canalului de ieșire este de 1,5 mm. Pe fața exterioară a capacului este lipit un inel metalic, care constituie electrodul de masă al dispozitivului. Descărcările din interiorul cilindrului au caracterul unor descărcări cu barieră de dielectric. Fluxul de gaz inert (helium, argon) împinge plasma descărcării în exterior, formând jetul de plasmă.

Pentru activizare chimică, gazul chimic activ introdus în jetul de gaz inert este oxigenul. Introducerea de oxigen are ca efect scăderea curentului plasmei de descărcare. Explicația acestui fenomen constă în faptul că introducerea în gazul inert a unui gaz electronegativ (cum este oxigenul) produce o reducere a densității de electroni și în consecință, o reducere a conductivității electrice. O concentrație prea mare de oxigen duce chiar la stingerea descărcării și la dispariția jetului de plasmă. De aceea, concentrațiile de oxigen din gazul majoritar inert trebuie să fie cel mult de ordinul procentelor.

Din butelia de înaltă presiune, oxigenul trece mai întâi printr-un reductor de presiune. În continuare, debitul este reglat cu un debitmetru („mass flow controller”), în gama 0 – 100 ml/min, sau 0 – 500 ml/min, în funcție de tipul aparatului. Au fost achiziționate debitmetre de la firma Aalborg, SUA. În condițiile în care debitul gazului majoritar inert este de ordinul litrilor pe minut, aceste debitmetre permit un reglaj fin al concentrațiilor de oxigen în gama 0 – 3 %, gamă care acoperă cele mai probabile concentrații optime.

Pentru analizele spectrale a fost utilizat un spectrometru cu fibră optică de înaltă rezoluție (0.75 nm FWHM): HR4000 (Ocean Optics Inc. – USA), cuplat la un calculator echipat cu programul SpectraSuite.

Spectrele optice de emisie ale jeturilor de plasmă corespund zonei aflate la distanța de 1 mm față de orificiul de ieșire.

O primă observație pentru spectrele plasmelor de heliu (Fig. 5) și argon (Fig. 6) este aceea că în gama 200 – 300 nm liniile de emisie sunt foarte slabe. Inseamnă ca fotonii de ultraviolet nu constituie o specie activă în astfel de plasmе.

In Fig. 5 se prezintă spectrele de emisie ale jeturilor de plasmе pulsate atmosferice, cu gaz de lucru heliu, pentru diverse concentrații de oxigen introdus pentru activizarea chimică a plasmеi. Debitul de heliu a fost de 5 l/min, iar amplitudinea tensiunii dintre electrozi a fost de 20 kV. Frecvența de repetiție a impulsurilor a fost de 100 de impulsuri pe secundă.

In toate situațiile din Fig. 5 sunt prezente linia de 587 nm a heliului și linia de 777 nm a oxigenului atomic. La concentrații ale oxigenului de până la 0,5 % sunt evidente, în zona spectrală 300 – 400 nm, liniile azotului din aerul traversat de jetul de plasmă.

In general, creșterea concentrației oxigenului în spațiul de descărcare, conduce la slăbirea intensității liniilor spectrale. Explicația constă în scăderea curentului jetului de plasmă la creșterea concentrației de oxigen.

Din punct de vedere al reactivității chimice a plasmеi, este relevantă intensitatea liniei de 777 nm a oxigenului atomic. In Fig. 5a se observă ca deși nu se introduce oxigen în spațiul de descărcare, totuși intensitatea liniei oxigenului atomic este de 13.000 de unități. Oxigenul atomic se datorează în acest caz interacțiunii electronilor produși de către descărcarea electrică cu aerul traversat de jetul de plasmă. Intensitatea liniei oxigenului atomic crește la 27.500 unități atunci când în spațiul de descărcare este introdusă o concentrație de 0,5 % oxigen (Fig. 5b). In continuare însă, la concentrații de oxigen de 1 / 1,5 / 2 %, intensitățile liniei de 777 nm scad la 14.000, 9.200 și respectiv 5.600 unități.

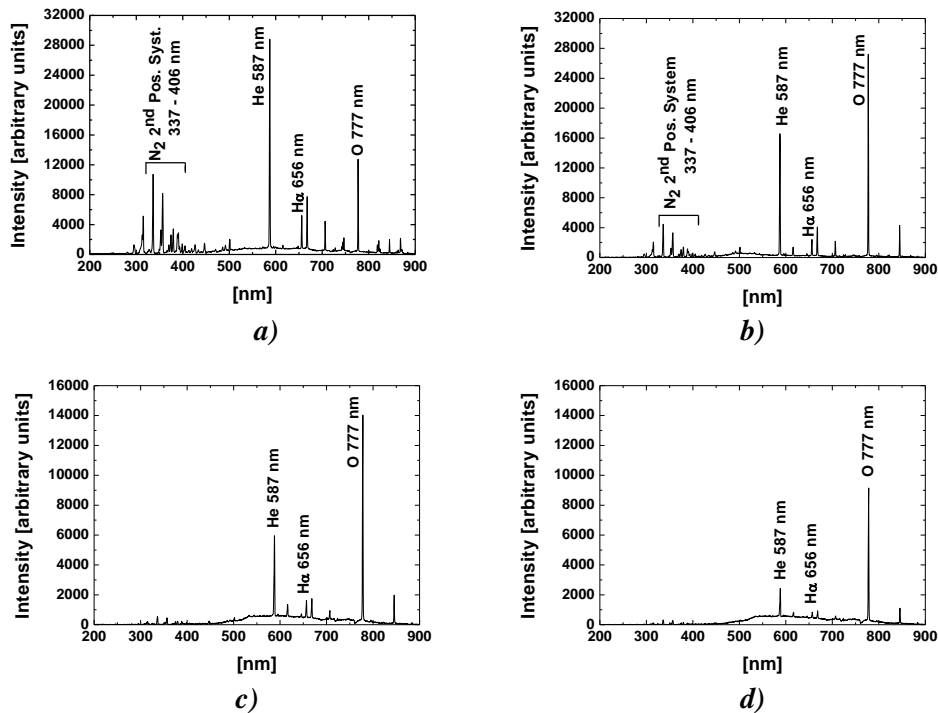
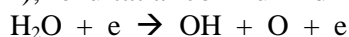


Fig. 5. Spectrele de emisie ale jeturilor de plasmă de heliu (5 l/min), pentru diverse concentrații de oxigen introdus în spațiul de descărcare: a) 0 %; b) 0,5 %; c) 1 %; d) 1,5 %.

Mai este de remarcat, în special în spectrele din Fig. 5a, 5b, prezența liniei H_{α} (656 nm), rezultat al coliziunii dintre moleculele de apă și electroni:



Această linie spectrală demonstrează prezența în jetul de plasmă a radicalilor OH, specie chimică extrem de activă.

Concluzia acestor experimente este că activitatea chimică maximă a jetului de plasmă de heliu se obține la introducerea în spațiul de descărcare a unei concentrații de oxigen de 0,5 %.

Spectrele de emisie ale jeturilor de plasmă de argon (Fig. 6) arată că majoritatea liniilor spectrale aparțin atomilor excitați de argon. Spre deosebire de spectrele plasmelor de heliu, în acest caz liniile azotului din aerul traversat de jetul de plasmă sunt foarte slabe. (De aceea am ales să prezentăm spectrele în zona 650 – 950 nm.) Explicația lipsei unor linii de azot mai intense constă în aceea că majoritatea electronilor din spațiul de descărcare interacționează cu atomii de argon și cu moleculele de oxigen.

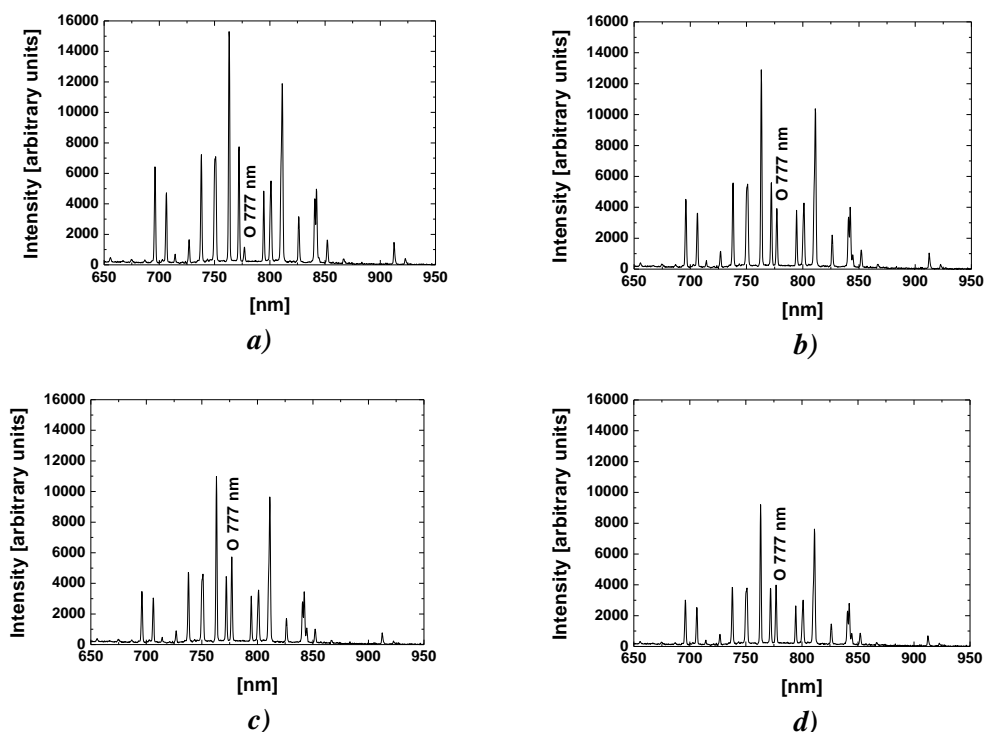


Fig. 6. Spectrele de emisie ale jeturilor de plasmă de argon (2 l/min), pentru diverse concentrații de oxigen introdus în spațiul de descărcare: a) 0 %; b) 0,5 %; c) 1 %; d) 1,5 %.

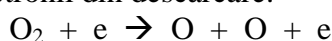
Spectrele de emisie din Fig. 6 sunt obținute cu concentrații de oxigen în argon de 0 / 0,5 / 1 / 1,5 %. Debitul de argon a fost de 2 l/min. Amplitudinea tensiunii dintre electrozi a fost de 20 kV, iar frecvența de repetiție a impulsurilor – 100 de impulsuri pe secundă. Liniile spectrale din gama 650 – 950 nm cuprind practic toate liniile emise în gama UV-vizibil de către jetul de plasmă de argon. Liniile spectrale emise de atomii de argon excitați corespund tranzițiilor $4p - 4s$ și $5p - 4s$ în notația Paschen [11]. Sunt astfel prezente liniile de emisie cu lungimi de undă de: 696,5; 706,7; 714,7; 727,3; 738,4; 750,4; 763,5; 772,4; 794,8; 801,5; 811,5; 826,5; 842,5; 852,1 nm. Cele mai intense sunt liniile de 763,5 nm ($2p_6 - 1s_5$) and 811,5 nm ($2p_9 - 1s_5$).

Spectrele din Fig. 6 cuprind și linia de 777 nm a oxigenului atomic, care evidențiază activitatea chimică a jetului de plasmă. Intensitatea acestei linii este minimă la concentrație zero a oxigenului, ceea ce corespunde teoriei că la jeturile de plasmă de argon, interacțiunea electronilor cu aerul înconjurător este foarte slabă.

Intensitatea liniei de 777 nm a oxigenului atomic este maximă la o concentrație de 1 % a oxigenului în argon. Creșterea în continuare a concentrației de oxigen conduce la scăderea numărului atomilor de oxigen. Rezultă că în condițiile experimentale prezentate, concentrația optimă de oxigen din punct de vedere al activității chimice a plasmei este de 1 %.

Analizele spectrale efectuate arată că cele mai importante reacții chimice din jetul de plasmă sunt următoarele:

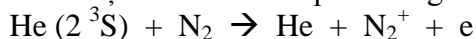
1. Reacția de disociere a moleculelor de oxigen în atomi de oxigen, în urma ciocnirii cu electronii din descărcare:



2. Reacțiile cu molecule de apă/azot din aerul traversat de jetul de plasmă:



3. Reacția de ionizare tip Penning:



4. Reacția de transfer de sarcină:



În urma acestor reacții, cele mai importante specii chimic active din jetul de plasmă sunt: atomii de oxigen; radicalii OH; atomii excitați de azot; atomii excitați de heliu; ionii excitați de azot. În această compoziție chimică, cele mai importante componente, ale căror concentrații trebuie maximizate sunt oxigenul atomic și radicalii OH.

În ceea ce privește caracteristicile termice, temperatura jeturilor de plasmă a fost măsurată cu un termometru de infraroșu de tip Fluke 66.

Pentru toate combinațiile experimentale (gaz de lucru: heliu sau argon; amplitudinea tensiunii dintre electrozi: 15 – 20 kV; frecvența de repetiție a impulsurilor: 50 – 200 impulsuri pe secundă), temperatura jetului de plasmă nu a depășit 32⁰ C. Acesta este un avantaj esențial pentru aplicațiile biomedicale și pentru tratarea alimentelor termosensibile.

2. Studiul efectelor jeturilor de plasmă rece pulsată la presiune atmosferică asupra celulelor vii.

În cadrul acestui obiectiv au fost desfășurate două tipuri de activități:

2.1. Determinarea efectelor pentru diverse tipuri de celule, atât normale cât și tumorale.

2.2. Evidențierea specificității efectelor jeturilor de plasmă relativ la tipul de celule tratate.

Tratamentul cu plasmă rece la presiune atmosferică poate reprezenta o metodă neinvazivă și nedureroasă a cancerului cutanat, ca și al altor tipuri de tumori prezente pe suprafața pielii, această variantă terapeutică putând completa sau chiar înlocui radioterapia. Tratamentul cu jetul de plasmă presupune o acțiune chimică puternică, fără producerea de reziduuri gazoase sau radiații periculoase. În plus, acest dispozitiv oferă avantajul tratamentului țintit, lipsit de efectele secundare importante care rezultă din afectarea inevitabilă a funcționalității și structurii celulelor sănătoase. Durata spitalizării poate fi redusă. Dispozitivele cu jet de plasmă sunt relativ ieftine și ușor de folosit datorită dimensiunilor reduse, putând fi incluse în dotarea oricărui spital în secțiile de oncologie, dermatologie etc.

2.a) Materiale și metode

Linii celulare utilizate

În experimentele noastre am utilizat liniile celulare tumorale B16 (melanom murin), și MDR (COLO320) – linie de cancer de colon uman rezistentă la citostatice, precum și celule normale – linia de macrofage murine RAW264.7.

Analiza morfologică

În scopul evidențierii eventualelor modificări morfologice ale celulelor tratate cu jetul de plasmă, s-au realizat frotiuri care au fost fixate în metanol 5 min. și apoi colorate cu soluție Giemsa (10%) pentru 30 min.

Tratamentul cu jetul de plasmă și studiul apoptozei

Celulele B16, MDR (COLO320) și RAW 264.7 au fost cultivate în mediu complet (mediu de cultură suplimentat cu L-glutamină, antibiotic și ser fetal de vițel). Când celulele au format un monolayer, au fost expuse jetului de plasmă pentru diferite intervale de timp, utilizând diferite combinații ale debitelor de heliu și oxigen. Ulterior, probele au fost analizate prin citometrie în flux, calculându-se procentul de celule apoptotice (utilizând programul WINDMI 2.7) după colorarea cu iodură de propidium în soluție hipotonică, în conformitate cu metoda Nicoletti [12].

Determinarea producției de NO prin metoda colorimetrică Griess.

Metoda se bazează pe faptul că nitriții din supernatantele de cultură reacționează în mediu acid cu un agent de diazotizare – Sulfanylamide (SA) –, rezultând o sare de diazoniu instabilă care, mai departe, reacționează cu un agent de cuplare – N-naphthyl-ethylenediamine (NED) – formând un compus stabil. Producția de NO este măsurată indirect prin cuantificarea cantității de nitrit în probă, știut fiind că NO se transformă spontan în nitrit sau nitrat care, de asemenea este transformat în nitrit. Metoda [13] este caracterizată printr-o sensibilitate crescută. Absorbanța la 540 nm prezintă o dependență liniară de concentrația de nitrit din probă. Valorile obținute au fost raportate la curba standard de nitrit ($R^2 > 0.96$).

2.b) Rezultate și concluzii

2.b.1) Celule tumorale

Apoptoza celulelor B16 indusă prin acțiunea jetului de plasmă cu heliu a fost analizată prin citometrie în flux. Rezultatele arată că tratamentul cu heliu (fără oxigen) nu induce apoptoza (Fig. 7a). Dar analiza microscopică evidențiază detașarea celulelor de substrat (Fig. 7b), în acord cu datele din literatură [14], care susțin că interacția dintre radicalii liberi din plasmă și moleculele de adeziune de pe suprafața celulelor este urmată de desprinderea temporară a celulelor de substrat (celulele detașate pot fi înlăturate, readerate sau transferate), fenomen ce justifică aplicabilitatea plasmelor la presiune atmosferică în chirurgia de mare finețe.

Tratamentul celulelor cu heliu+oxigen induce apoptoza în celulele tumorale B16 proporțional cu durata tratamentului (Fig. 8a). În Fig. 8b sunt prezentate modificări morfologice ale celulelor: pierderea integrității membranare, condensarea cromatinei, corpi apoptotici și fragmentarea ADN.

Colorația Giemsa a evidențiat de asemenea modificări morfologice caracteristice celulelor în apoptoză (Fig. 9).

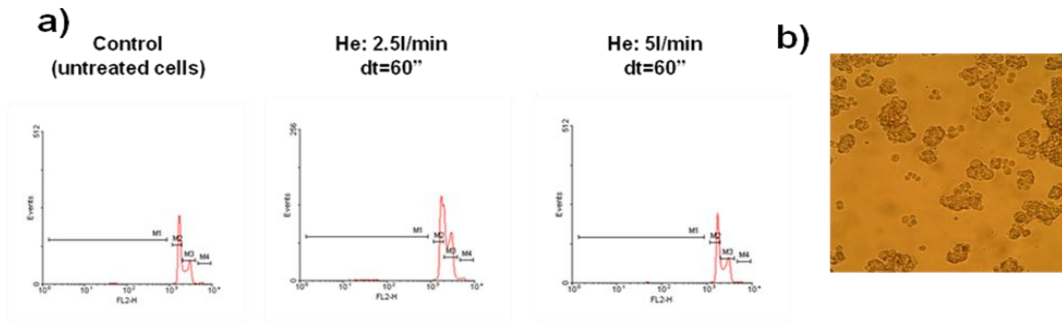


Fig. 7. a) *Tratamentul celulelor cu heliu (fără oxigen) nu induce apoptoza;*
 b) *Detășarea celulelor de substrat.*
 Distanța dintre jetul de plasmă și monostratul celular = 10mm; Durata tratamentului = 60 s.

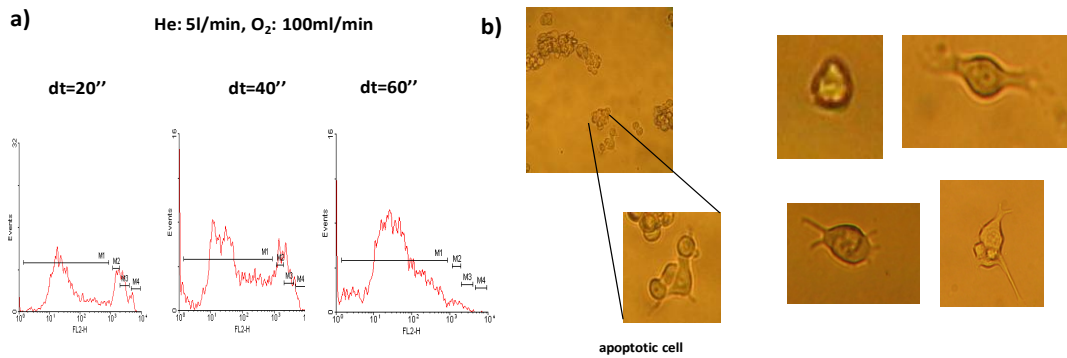


Fig. 8. a) *Tratamentul cu heliu+oxigen (He – 5l/min, O₂ – 100ml/min) induce apoptoza în celulele tumorale B16;*
 b) *Modificări morfologice.*
 Distanța dintre jetul de plasmă și monostratul celular = 10 mm;
 Durata tratamentului = 20, 40, respectiv 60 secunde.

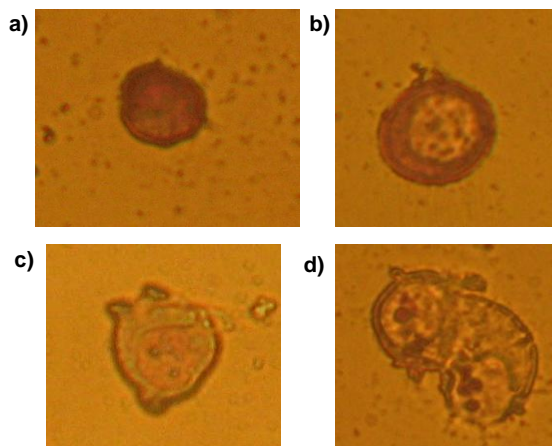


Fig. 9. *Modificări morfologice ale celulelor B16 tratate cu jetul de plasmă la presiune atmosferică (He – 5 l/min, O₂ – 100 ml/min) – colorație Giemsa: a) celula normală; b), c), d) celule apoptotice; Obiectiv 20X.*

În ceea ce privește efectul jetului de plasmă la presiune atmosferică asupra celulelor MDR, rezultatele indică o apoptoză marcată. În plus, în cazul unui debit de heliu de 5 l/min se observă o dezorganizare mai accentuată a ciclului celular (Fig. 10).

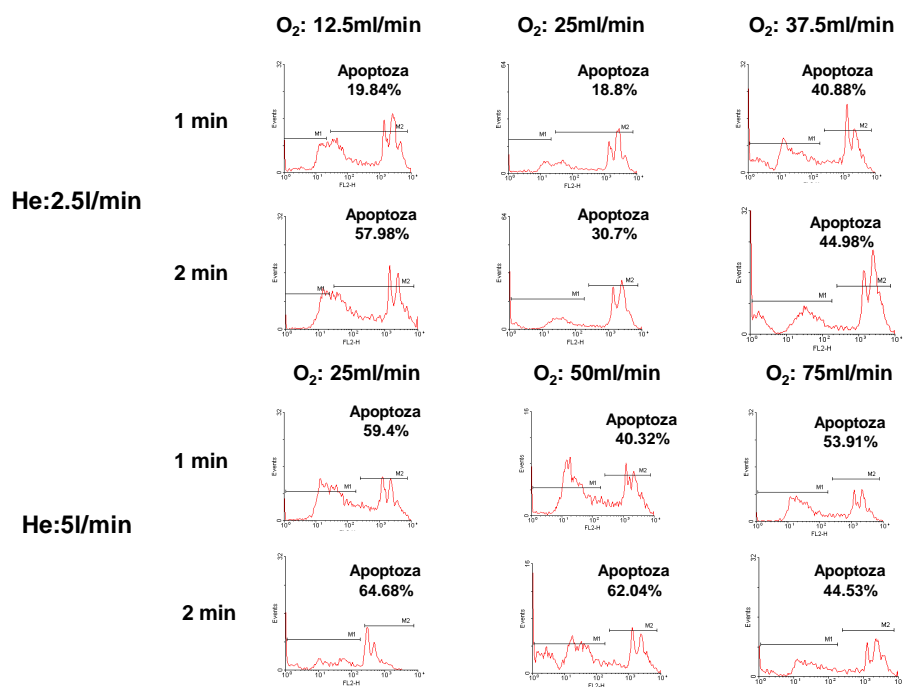


Fig. 10. Efectul jetului de plasmă la presiune atmosferică asupra celulelor tumorale MDR (COLO320).

Datele de mai sus sunt susținute și de imaginile obținute prin colorația Giemsa (Fig. 11).

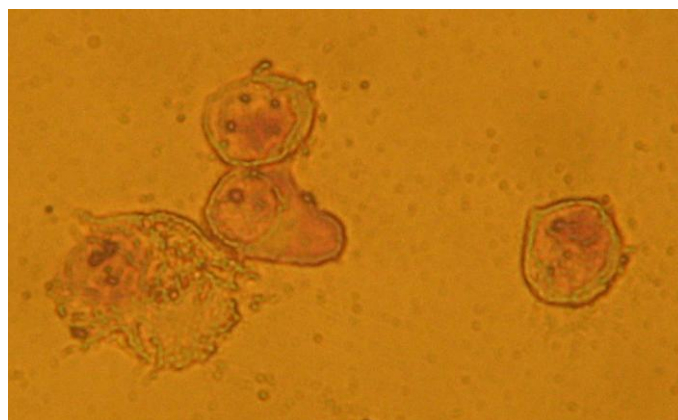


Fig. 11. Celule MDR apoptotice obținute în urma tratamentului cu jetul de plasmă (He – 5 l/min; O₂ – 50 ml/min). Obiectiv 20X.

În studiile noastre anterioare [15] privind efectul acului cu plasmă asupra celulelor tumorale (liniile celulare BrSk și B16) am demonstrat că procentul de celule apoptotice obținut a fost sub 50%. Acul cu plasmă nu a produs o necroză mai mare de 7%. Aceste date sunt importante, știut fiind că necroza este însoțită de fenomene inflamatorii, iar inflamația cronică este asociată cu tumorigeneza [16, 17].

2.b.2) Celule normale

Tratamentul macrofagelor murine RAW 264.7 cu jetul de plasmă nu este urmat de inducerea apoptozei (Fig. 12).

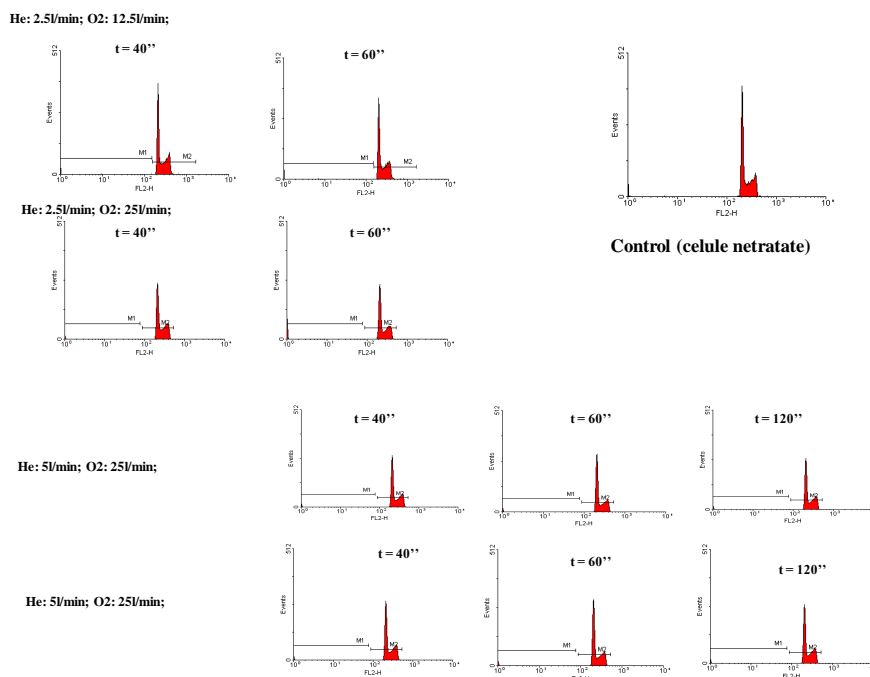


Fig. 12. Efectul jetului de plasmă la presiune atmosferică asupra macrofagelor murine RAW 264.7

Producția de oxid nitric în macrofage este un indicator al gradului de activare a acestor celule. O primă testare a macrofagelor tratate cu plasmă, utilizând metoda colorimetrică Griess, indică o activare puternică în urma tratamentului. Aceste date necesită însă verificări ulterioare pentru a stabili dacă avem de-a face într-adevăr cu o activare celulară, sau valorile obținute reflectă modificarea concentrației de nitriți din mediul de cultură sub acțiunea jetului de plasmă, fără implicare celulară. Este necesară deci efectuarea tehnicii Griess atât în sistem celular, cât și în sistem acelular, respectând aceiași parametri ai tratamentului cu plasmă.

Jetul cu plasmă la presiune atmosferică nu induce apoptoza în macrofagele murine RAW 264.7 (celule normale) nici după două minute de tratament, interval de timp după care s-a obținut o apoptoză mai mare de 30% în cazul celulelor tumorale MDR(COLO 320).

Tumorile umane sunt în general infiltrate cu celule inflamatorii. Aceste infiltrate celulare diferă ca mărime și compoziție de la un tip tumoral la altul, prezența lor fiind o dovadă că organismul gazdă reacționează față de prezența tumorii, sau mai exact că interferează cu dezvoltarea tumorii, proces cunoscut ca supraveghere imună. În acest context infiltratele inflamatorii la nivel tumoral sunt considerate o încercare de detecție și eliminare a celulelor tumorale emergente. Celulele imune prezente în tumora includ atât celule ale imunității adaptative (limfocite T, celule dendritice și ocazional limfocite B), ca și efectori ai imunității înnascute – macrofage, PMN, leucocite și rare celule NK (Natural Killer) [16,17]. În acest context, activarea macrofagelor în stadiile incipiente ale tumorii, contribuie la eliminarea celulelor tumorale adiacente.

În concluzie, tratamentul cu jet de plasmă pulsată la presiune atmosferică a evidențiat rezistența la apoptoză a macrofagelor (celule normale) și probabila lor activare. Pe de altă parte, s-a demonstrat inducerea apoptozei în celulele tumorale. Aceste rezultate sunt deosebit de interesante și deschid noi oportunități terapeutice pentru cancerul cutanat.

BIBLIOGRAFIE

- [1] S Reuter, K Niemi, V Schulz-von der Gathen, and H F Dobe, Generation of atomic oxygen in the effluent of an atmospheric pressure plasma jet, *Plasma Sources Sci. Technol.* **18** 015006 (9pp) (2009)
- [2] E R Ionita, M D Ionita, E C Stancu, M Teodorescu, G Dinescu, Small size plasma tools for material processing at atmospheric pressure, *Applied Surface Science* **255** 5448–5452 (2009)
- [3] Xianhui Zhang, Jun Huang, Xiaodi Liu, Lei Peng, Lihong Guo, Guohua Lv, Wei Chen, Kecheng Feng, and Si-ze Yang, Treatment of *Streptococcus mutans* bacteria by a plasma needle, *J. Appl. Phys.* **105** 063302 (2009)
- [4] A Shashurin, M N Shneider, A Dogariu, R B Miles, and M. Keidar, Temporal behavior of cold atmospheric plasma jet, *Appl. Phys. Lett.* **94** 231504 (2009)
- [5] Z Cao, J L Walsh, and M G Kong, Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment, *Appl. Phys. Lett.* **94** 021501 (2009)
- [6] H Ayan, D Staack, G Fridman, A Gutsol, Y Mukhin, A Starikovskii, A Fridman, and G Friedman, Application of nanosecond-pulsed dielectric barrier discharge for biomedical treatment of topographically non-uniform surfaces, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 125202 (5pp) (2009)
- [7] N Mericam-Bourdet, M Laroussi, A Begum, and E Karakas, Experimental investigations of plasma bullets, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 055207 (7pp) (2009)
- [8] M Kuchenbecker, N Bibinov, A Kaemling, D Wandke, P Awakowicz, and W Viol, Characterization of DBD plasma source for biomedical applications, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42** 045212 (10pp) (2009)
- [9] X Lu, Q Xiong, Z Xiong, J Hu, F Zhou, W Gong, Y Xian, C Zou, Z Tang, Z Jiang, and Y Pan, Propagation of an atmospheric pressure plasma plume, *J. Appl. Phys.* **105** 043304 (2009)
- [10] N Georgescu, High voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets: electrical characterization, *Romanian Reports in Physics* **60** 4 1025 – 1032 (2008)
- [11] V Leveille and A Coulombe, Design and preliminary characterization of a miniature pulsed RF APGD torch with downstream injection of the source of reactive species, *Plasma Sources Sci. Technol.* **14** 467–476 (2005)
- [12] I Nicoletti, G Migliorati, M C Pagliacci, F Grignani and C Riccardi, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* **139** 2 271 – 179 (1991)
- [13] Sung Hee Lee, Geom Seog Seo, Dong Hwan Sohn, Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by butein in RAW 264.7 cells, *Biochem.Biophys.Comm.* **323** 125-132 (2004)
- [14] E Stoffels, I E Kieft, R E J Sladek, L J M van den Bedem, E P van der Laan, M Steinbuch, Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives, *Plasma Sources Sci. Technol* **15** S169-S180 (2006)
- [15] A Calugaru, L Cremer, A Herold, A Lupu, G Szegli, C Lungu, A Lungu, N Georgescu, The effect of the plasma needle on tumoral cell lines apoptosis, *Arch. Roum. Microbiol. Immunol.* **64** 1–4 57 – 64 (2005)
- [16] T L Whiteside, The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth, *Oncogene* **27** 5904 – 5912 (2008)
- [17] T J Stewart and S I Abrams, How tumor escape mass destruction, *Oncogene* **27** 5894 – 5903 (2008)

Director Proiect,

Dr. Ing. Nicolae GEORGESCU