

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

*DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI" - DEI*

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA ENERGETICA

TESI DI LAUREA

in
Elettrotecnica T

**TRATTAMENTO DI CELLULE CANCEROSE MEDIANTE
PLASMI NON TERMICI**

CANDIDATO:

Ciro Alberghi

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Carlo Angelo Borghi

CORRELATORE:

Prof. Gabriele Neretti

Anno Accademico 2015-2016

Sessione II

Indice

Introduzione.....	2
1. Cenni di fisica del plasma.....	4
1.1. Che cos'è il plasma?	4
1.2. Plasmi termici e non termici	5
1.3. Ionizzazione del gas	6
2. Sorgenti di plasma	10
2.1. Scarica a barriera dielettrica	10
2.2. <i>Plasma jet</i>	17
3. Interazione del plasma con la materia	20
3.1. Agenti inattivanti del plasma	20
3.1.1. Calore	20
3.1.2. Radiazione UV	21
3.1.3. Particelle cariche	23
3.1.4. Specie reattive	23
3.2. Agenti nei trattamenti diretti e indiretti	24
4. Trattamenti su cellule tumorali.....	26
4.1. Le cellule tumorali	26
4.2. I trattamenti	29
4.2.1. Trattamenti <i>in-vitro</i>	30
4.2.2. Trattamenti <i>in-vivo</i>	37
4.2.3. Altri risultati	39
4.3. Nostri trattamenti	40
4.3.1. Layout del reattore	40

4.3.2. Trattamenti su larve di <i>drosophila</i> e risultati	43
Conclusioni.....	46
Bibliografia.....	48

Introduzione

Con lo sviluppo di sorgenti capaci di sostenere scariche di non equilibrio a pressione atmosferica è nato un notevole interesse per le applicazioni biomediche del plasma, data la generazione nella scarica di una varietà di agenti efficaci in più ambiti.

I plasmi di questo tipo, caratterizzati principalmente da una temperatura macroscopica vicina a quella ambiente, sono infatti già utilizzati, ad esempio, per la sterilizzazione, per il trattamento di polimeri per migliorarne la biocompatibilità, e per l'accelerazione del processo di coagulazione del sangue.

In questo lavoro verrà presentata un'altra possibilità applicativa, sempre nel settore della *plasma medicine*, ovvero l'utilizzo dei plasmi per il trattamento di cellule cancerose, che sta avendo un particolare successo a causa dei risultati ottenuti dai vari gruppi di ricerca che sottintendono un suo possibile futuro nel trattamento di neoplasie.

Questi plasmi, oltre ad avere la capacità di uccidere le cellule tumorali, sembrano mostrare una particolare selettività verso le cellule neoplastiche rispetto a quelle normali, e le specie reattive sembrano deregolare dei processi chiave nello sviluppo canceroso e metastatico.

Verrà presentata una breve introduzione alla fisica del plasma, mostrando alcuni parametri che caratterizzano questo stato della materia, concentrandosi in particolare sui plasmi non termici o di non equilibrio, per poi passare al processo di ionizzazione del gas. Nel secondo capitolo sono approfondite due sorgenti per la generazione di plasmi non termici, la scarica a barriera dielettrica e il *plasma jet*, e le loro rispettive caratteristiche che portano i gruppi di ricerca a preferire una tipologia piuttosto che un'altra.

Il terzo capitolo fornisce una preliminare spiegazione degli agenti generati nella scarica e il rapporto che hanno con la materia con cui interagiscono, nell'idea di fornire una base anche biochimica utile alla comprensione dei processi che avvengono nei trattamenti.

L'ultimo capitolo è il fulcro della ricerca, e comprende risultati ottenuti negli ultimi anni da vari gruppi di ricerca di molte nazionalità, e una breve parte riguardante la sperimentazione originale svolta anche in mia presenza dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Ingegneria dell'Energia Elettrica e dell'Informazione "Guglielmo

Marconi”, rappresentato principalmente dal professor Carlo Angelo Borghi e dal professor Gabriele Neretti.

Capitolo 1

Cenni di fisica del plasma

1.1. Che cos'è il plasma?

Il plasma è un gas ionizzato, ovvero un gas in cui una frazione di elettroni è stata strappata dai rispettivi atomi, costituito da un insieme di particelle cariche la cui carica elettrica totale però è nulla; si presenta perciò globalmente neutro.

Viene considerato il quarto stato della materia, poiché cedendo la necessaria energia ad un solido, esso transisce a liquido, poi a gas e finalmente si arriva alla condizione in cui i legami tra elettroni e ioni si rompono e il gas diventa plasma.

Il gas, normalmente dielettrico, grazie alle cariche elettriche libere è invece elettricamente conduttivo e sensibile all'azione di campi elettromagnetici esterni.

Inoltre, a causa delle particelle cariche, i moti del plasma sono principalmente dovuti alle forze elettromagnetiche a lungo raggio prodotte da campi elettrici e magnetici esterni e da quelli generati internamente dalle distribuzioni di carica e corrente dovute al moto delle particelle stesse, che tendono a mantenere il plasma neutro complessivamente.

Questo è un altro comportamento diverso dal caso dei gas ordinari i cui moti delle particelle sono dovuti a forze a corto raggio, cioè le collisioni tra particelle che interagiscono con quelle a loro adiacenti, che per il plasma assumono una minore rilevanza.

In natura la presenza dei plasmi è tutt'altro che rara, infatti oltre il 90% dell'universo è formato da plasma (stelle, nebulose, spazio interstellare), mentre sulla terra abbiamo, ad esempio, i fulmini.

I plasmi in natura si distinguono da quelli artificiali in varie caratteristiche (come la dimensione e la temperatura) e l'interesse per i plasmi prodotti in laboratorio è dovuto al fatto che è possibile controllarne i parametri fondamentali dipendentemente dall'impiego.

1.2. Plasmi termici e non termici

La temperatura macroscopica del plasma è un parametro fondamentale che ne stabilisce il campo di applicazione.

Come nei gas ordinari, la temperatura del plasma è determinata dall'energia media delle particelle che lo compongono e, essendo un sistema multi-componente, le temperature delle diverse specie possono essere molto diverse.

I plasmi prodotti in laboratorio sono generalmente generati grazie all'applicazione di un campo elettrico esterno, e l'energia è così accumulata dagli elettroni che attraverso collisioni la trasferiscono alle particelle pesanti (neutri e ioni).

Perciò inizialmente la temperatura elettronica T_e è maggiore di quella dei pesanti T_p , ma grazie alle continue collisioni le due temperature tendono all'equilibrio, ammettendo che ci sia il tempo necessario perché ciò possa avvenire.

I plasmi di equilibrio saranno così caratterizzati da una sola temperatura che corrisponde a quella macroscopica T_m , perciò:

$$T_m \cong T_p \cong T_e$$

e inoltre la ionizzazione e i processi chimici sono determinati principalmente da questa e poco dal campo elettrico; sono chiamati plasmi termici.

Se invece il plasma non si trova in questa condizione, avremo molteplici temperature e come già accennato sarà generalmente

$$T_e \gg T_p$$

Per questo tipo di plasmi la ionizzazione e i processi chimici sono dipendenti principalmente dalla temperatura elettronica e non dalla temperatura macroscopica.

Essa può essere calcolata come una media ponderata delle temperature del plasma, e poiché la massa delle particelle pesanti è molto maggiore di quella degli elettroni, ricaviamo che

$$T_m \cong T_p$$

Questi plasmi sono detti non termici e saranno caratterizzati da una temperatura macroscopica relativamente bassa e molto diversa da quella elettronica.

Possono essere ottenuti mediante l'utilizzo di tensioni ad elevata frequenza (nell'ordine dei kHz) o nanopulsate; questo permette generalmente di ottenere i plasmi di non equilibrio con spese energetiche inferiori rispetto a quelli di equilibrio.

Per questi motivi i campi di applicazione delle due famiglie di plasmi sono molto diversi, e in particolare quelli non termici sono adatti alle applicazioni in cui è fondamentale avere basse temperature per evitare il danno termico, come nel caso di questo studio.

In laboratorio è possibile generare plasmi con temperature solo leggermente superiori a quella ambiente, il che li rende ottimi per il trattamento di cellule e tessuti.

1.3. Ionizzazione del gas

La ionizzazione del gas, inizialmente neutro, avviene per mezzo di una scarica elettrica in esso.

Essendo un gas neutro dielettrico, la scarica, o *breakdown*, avviene nel momento in cui si ha la rottura dielettrica del materiale.

Se sottoponiamo infatti un dielettrico a un campo elettrico, ad un certo valore, detto rigidità dielettrica, esso viene ionizzato e diventa un conduttore.

I gas possono essere ionizzati in più modi, ad esempio:

- applicando una tensione opportuna a due elettrodi immersi in esso
- immettendo onde in radio frequenza
- immettendo microonde

Con questi metodi si ottiene lo stesso risultato, infatti viene ceduta energia agli elettroni che raggiungendo una determinata quantità permette loro di liberarsi dal legame con i nuclei.

Questa energia di soglia è chiamata potenziale di prima ionizzazione e varia da elemento a elemento, e corrisponde con più precisione all'energia minima necessaria per allontanare fino a distanza infinita l'elettrone più esterno o ad energia inferiore tra gli esterni, a 0 K e in condizione di energia cinetica nulla.

È una proprietà periodica degli elementi, e cresce muovendosi dal basso verso l'alto e da sinistra verso destra della tavola periodica, con valori che vanno da circa 4 eV¹ per il Francio e 24.6 eV per l'Elio.

Risulta inoltre maggiore per i gas biatomici, in quanto deve comprendere anche la quota di energia per spezzare i legami tra gli atomi della molecola; per essi la tensione di *breakdown* sarà quindi generalmente più elevata rispetto a quella per i gas nobili.

Gli elettroni così liberati possono collidere con altri atomi neutri e produrre ulteriori ionizzazioni, e il processo procede a valanga fino al raggiungimento dell'equilibrio.

Considerando un sistema formato da due elettrodi posti a distanza d l'uno dall'altro, immersi in un particolare gas a pressione p , possiamo determinare la tensione di *breakdown* V_b grazie alla legge di Paschen, così espressa:

$$V_b = \frac{Bpd}{\log Apd - \log[\log(1 + \frac{1}{\gamma})]}$$

dove γ dipende dal materiale di cui sono composti gli elettrodi e A e B sono due termini ricavabili sperimentalmente che dipendono dal tipo di gas e dal rapporto $\frac{E}{p}$, dove E è il campo elettrico applicato, e risultano approssimativamente costanti per alcuni intervalli di E/p .

Dalla legge si ricavano le curve di Paschen, in figura 1.1, rappresentate per vari gas di interesse pratico, in cui la pressione è espressa in Torr² e la distanza tra gli elettrodi in cm.

Esse hanno un punto di minimo corrispondente ad un determinato valore di pd , chiamato punto di Stoletov.

¹ L'elettronvolt è un'unità di misura definita come l'energia cinetica acquisita da un elettrone accelerato nel vuoto da una differenza di potenziale di 1V; 1 eV = 1.602x10⁻¹⁹ J.

² 1 Torr = 133.322 Pa = 0.001333 Bar

Dal grafico possiamo vedere che per questi gas le tensioni di *breakdown* minime sono approssimativamente nell'intervallo 10^0 - 10^1 Torr*cm con valori dell'ordine di centinaia di Volt e crescono rapidamente muovendosi a *pd* maggiori, fino a considerare le scariche a pressione atmosferica (10^3 Torr circa) per un *gap* di 1 cm (ad esempio) che arrivano a valori dell'ordine delle decine di migliaia di Volt, tipici del caso in oggetto.

Nonostante sia più facile ottenere scariche a bassa pressione, il minimo della curva si trova ad un valore preciso di pressione e distanza tra gli elettrodi, e se si abbassa maggiormente la pressione, la tensione necessaria per raggiungere la condizione di scarica cresce molto rapidamente.

Questo perché se il vuoto è troppo elevato e di conseguenza la densità di particelle è molto bassa, a patto di non avere distanze enormi tra gli elettrodi, la probabilità di avere collisioni ionizzanti è estremamente piccola (*d* è minore del libero cammino medio di ionizzazione) e la scarica non può così avvenire.

Il caso inverso è dovuto invece al fatto che più *pd* aumenta, più energia viene persa nelle collisioni e vi è quindi la necessità di campi elettrici più intensi [1].

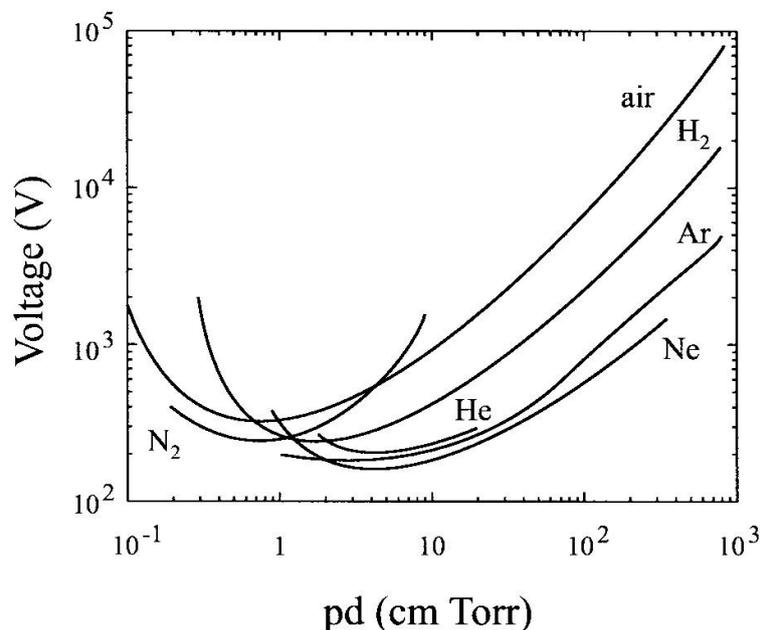


Fig. 1.1 – Curve di Paschen per determinati gas, nelle ordinate la tensione di *breakdown* in funzione del prodotto tra pressione e distanza degli elettrodi [1]

Capitolo 2

Sorgenti di plasma

2.1. Scarica a barriera dielettrica

La configurazione più semplice di un dispositivo DBD (Dielectric Barrier Discharges) consiste in un condensatore ad elettrodi piani e paralleli al cui interno è posto almeno uno strato dielettrico inserito in genere tra un elettrodo e uno spessore in cui viene inserito il gas, detto *gap* di scarica.

I due elettrodi sono poi connessi a una sorgente di tensione alternata esterna e la scarica nel gas avviene quando essa è tale da portare il campo elettrico nel gas ad un valore superiore a quello di *breakdown*, che nel caso dell'aria è circa 30 kV/cm.

I materiali più utilizzati per il dielettrico sono vetro, ceramica o polimeri (ad esempio Teflon).

La funzione principale della barriera dielettrica è la limitazione della corrente della scarica, in quanto la carica che si accumula sulla superficie del dielettrico determina una riduzione del campo elettrico fino ad annullarlo con conseguente blocco del passaggio di corrente (dopo pochi ns), evitando così la transizione al regime di arco elettrico.

Questo permette una maggior semplicità operativa, in quanto altri tipi di scariche di non-equilibrio che utilizzano elettrodi nudi necessitano di alimentazioni a tensioni impulsive a frequenza elevata per ovviare alla formazione dell'arco.

Le configurazioni di scarica più comuni sono mostrate in Fig. 2.1, dove (a) è la configurazione già citata a piatti piani e paralleli utilizzata ad esempio per il trattamento di materiali, (b) è una scarica a singola barriera anulare, ampiamente utilizzata per la produzione di ozono, (c) è una scarica superficiale a singola barriera e (d) una scarica complanare.

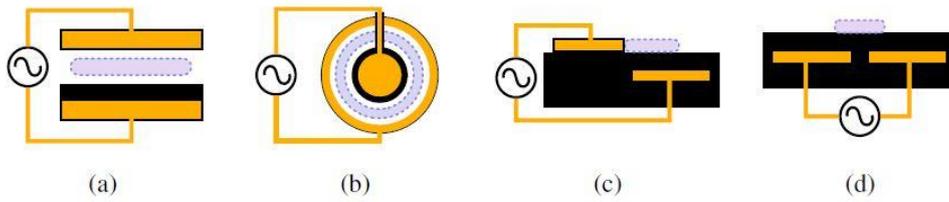


Fig. 2.1 – Varie configurazioni DBD, in nero i dielettrici, in giallo gli elettrodi e in viola le regioni di plasma (approssimativamente) [2]

Le prime due geometrie producono scariche cosiddette volumetriche, la terza scariche superficiali e l'ultima scariche complanari [2].

Come si può evidenziare sperimentalmente, la scarica in una DBD è composta da microscariche individuali di brevissima durata, dell'ordine di qualche nanosecondo, separate spazialmente tra loro e che si presentano come canali cilindrici di plasma, di diametro dell'ordine delle centinaia di micrometri.

Si verifica sperimentalmente che a pressioni elevate i diametri risultano inferiori e le microscariche più distinguibili le une dalle altre, mentre al diminuire della pressione aumentano i diametri e aumenta anche il loro numero, cosicchè la scarica nel suo insieme appare più uniforme [3].

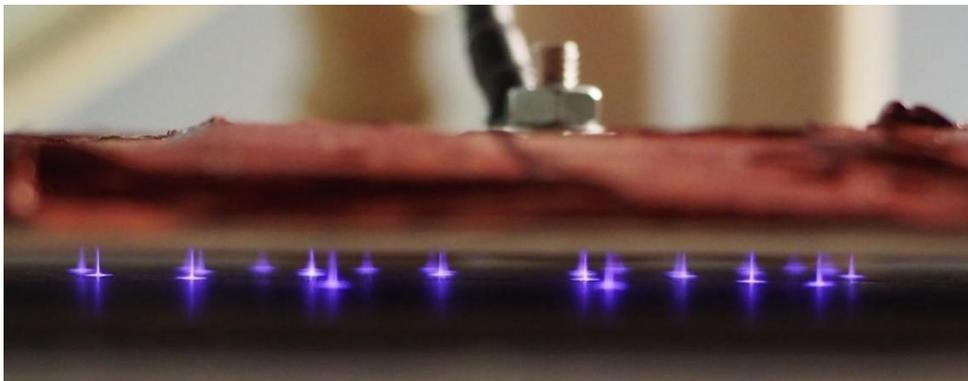


Fig. 2.2 – Microscariche in DBD a pressione atmosferica. Si può notare la deposizione di carica su una superficie maggiore della loro sezione [4]

La carica che si va a deporre sul dielettrico dà luogo all'effetto memoria, cioè facilita la formazione di nuove micro-scariche nello stesso punto alla successiva inversione di polarità.

Inoltre essa copre una porzione maggiore della sezione della microscarica, come è evidente in Fig. 2.2, e per questo motivo le scariche successive avranno una distribuzione più omogenea sull'intera superficie dell'elettrodo.

La dinamica di una microscarica si può riassumere qualitativamente in alcuni fasi, ed è rappresentata nella figura seguente.

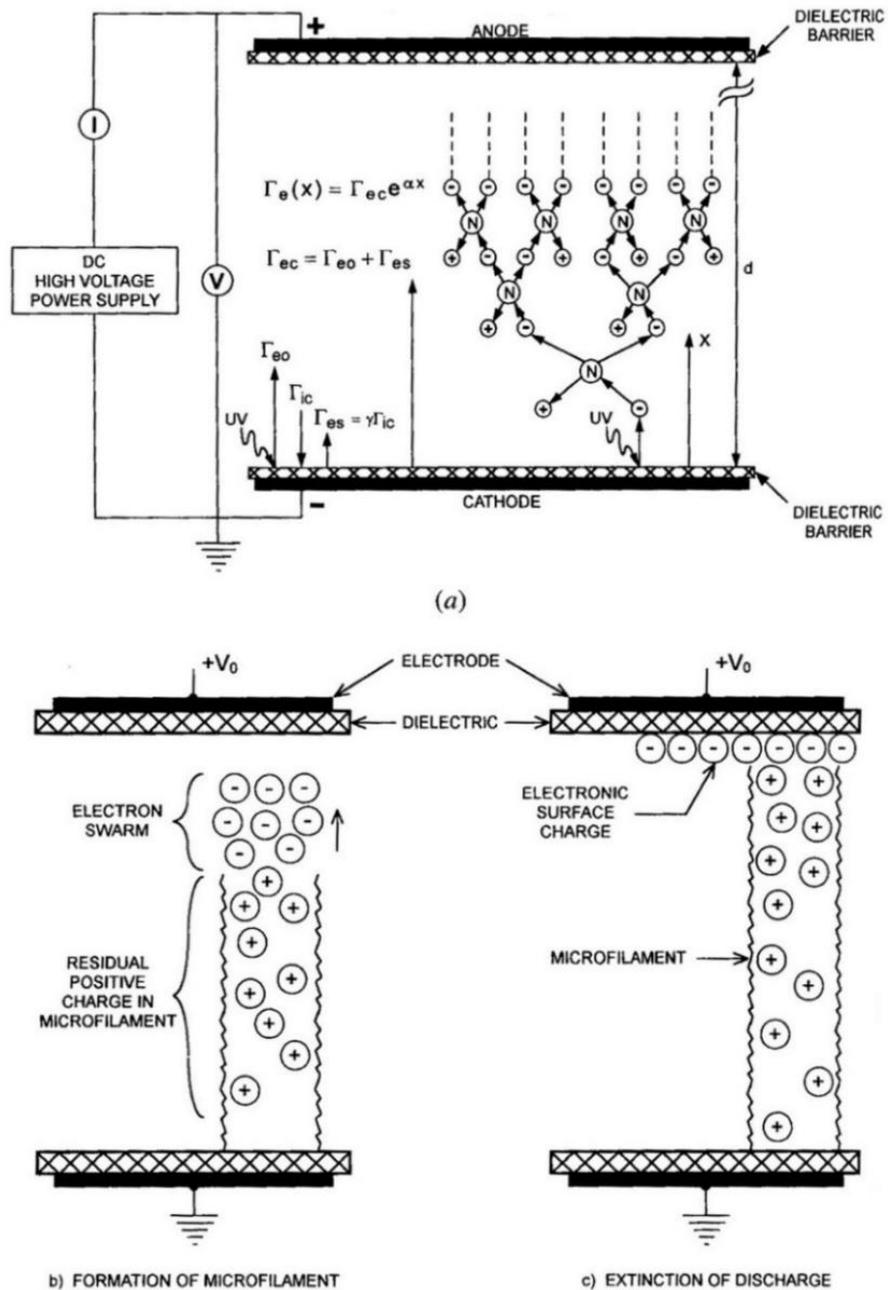


Fig. 2.3 – Evoluzione di una microscarica in un sistema DBD [5]

- Le scariche vengono attivate localmente, laddove il campo di breakdown viene superato per fluttuazioni o imperfezioni degli elettrodi (effetto punta), oppure per effetto di una sorgente disomogenea di pre-ionizzazione (Fig. 2.3a)
- La scarica genera una valanga elettronica che si deposita sul dielettrico, distribuendosi su uno strato superficiale più esteso della scarica (Fig. 2.3b)
- L'accumulo di carica diminuisce il campo elettrico su una regione estesa, impedendo il generarsi di nuove scariche nel volume circostante (Fig. 2.3c)

La fisica della formazione di scariche in un sistema DBD è descritta dal fenomeno di transizione da regime a valanga a quello di *streamer*.

Si verifica la già menzionata moltiplicazione dei portatori di carica, emessi inizialmente dal catodo, per ionizzazione degli atomi neutri del gas, con successivo fenomeno di ionizzazione a valanga.

Gli ioni formatosi per collisione degli atomi neutri del gas con elettroni sufficientemente energetici hanno una minor mobilità di questi ultimi, che tenderanno a separarsi spazialmente da essi; si crea così un dipolo che altera il campo elettrico locale e che modifica la velocità del processo di ionizzazione.

Il campo di carica spaziale formato può avere un'intensità tale da generare a sua volta ionizzazione in prossimità della valanga, e inoltre i fotoni emessi dalla valanga primaria innescano fenomeni di fotoionizzazione nelle vicinanze di essa, creando valanghe secondarie; ne segue così la formazione di un'onda di ionizzazione detta *streamer*, il cui fronte viaggia molto più velocemente (anche di un ordine di grandezza) di quello della valanga elettronica di partenza [6, 7, 8, 9].

Considerando lo schema e il relativo circuito di figura 2.4 possiamo ricavare che il reattore DBD si comporta come una serie di due capacitori, il primo di capacità C_g che rappresenta il *gap* gassoso in cui avviene la scarica e il secondo di capacità C_d che rappresenta la barriera dielettrica.

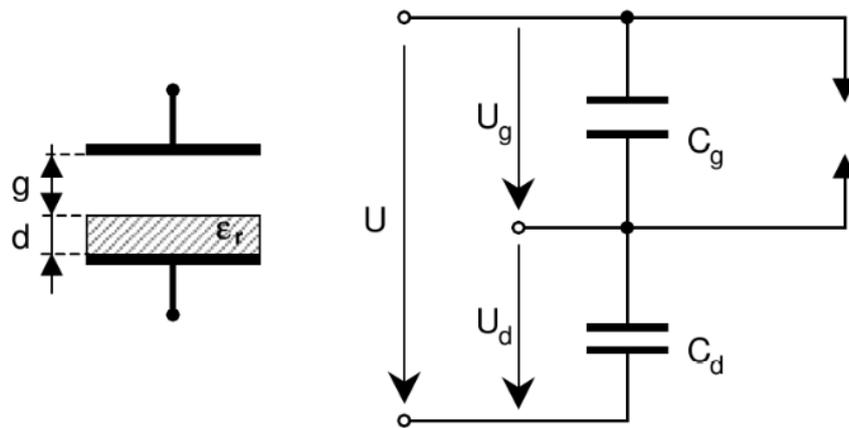


Fig. 2.4 – Schema di un dispositivo DBD a singola barriera dielettrica (a sinistra) e relativo circuito elettrico (a destra) [10]

La capacità totale sarà quindi data dalla relazione:

$$C = \frac{C_g C_d}{C_g + C_d}$$

Quando la tensione applicata U supera quella di *breakdown* e avviene la scarica, possiamo immaginare che si chiuda una resistenza $R(t)$ in parallelo al condensatore C_g , il cui valore è variabile rapidamente con il tempo³, su cui circola la corrente.

Considerando la U sinusoidale, si verifica che nei suoi punti di massimo e minimo la corrente è nulla, poiché $\frac{dU}{dt} = 0$; per cui l'attività di scarica si interrompe per poi riprendere nella semionda successiva quando viene nuovamente superata la tensione di *breakdown* (Fig. 2.5).

³ Variano il numero di portatori di carica, il numero di collisioni e il campo elettrico istante per istante.

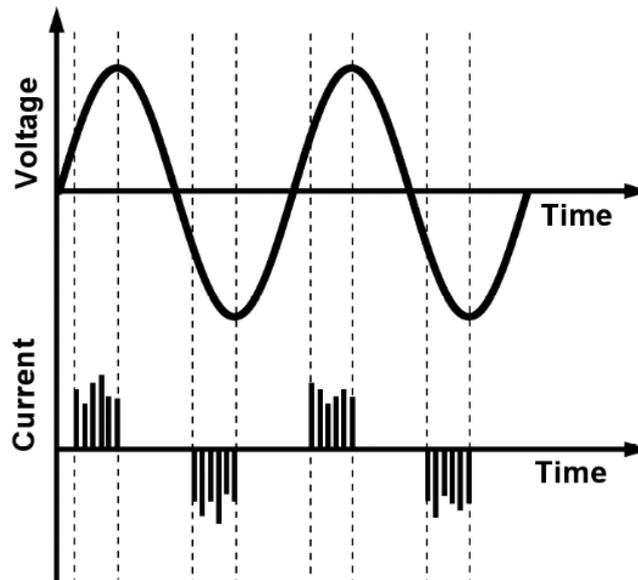


Fig. 2.5 – Andamento schematico della tensione e della corrente di un dispositivo DBD. La linea tratteggiata evidenzia l’inizio delle scariche, in corrispondenza delle tensioni di breakdown, e loro interruzione, nei massimi e minimi di tensione [11]

Considerando un modello “omogeneo” di una scarica a barriera dielettrica [5], possiamo ricavare altre utili informazioni.

Nonostante le microscariche rendano il sistema globalmente disomogeneo, per ottenere una relazione semiquantitativa la scarica la si può considerare con approssimazione omogenea.

Inoltre consideriamo costante il campo esterno applicato, semplificazione credibile poiché il tempo di scarica è molto minore del tempo caratteristico di variazione del campo (corrispondente alla durata del semiperiodo dell’onda nel caso di tensione alternata).

Trattiamo una scarica volumetrica come un sistema formato da un condensatore piano, con armature di area S , riempito da uno spessore d_g di gas e d_d di dielettrico.

Chiamiamo E_g e E_d il campo elettrico nel gas e nel dielettrico rispettivamente e ϵ_g e ϵ_d le loro permittività elettriche (la permittività elettrica quantifica la tendenza di un materiale dielettrico a contrastare l’intensità del campo elettrico a cui è sottoposto).

Sappiamo, dal teorema di Gauss per il campo elettrico, considerando le dimensioni degli elettrodi molto maggiori rispetto alla distanza tra essi, che

$$E_g = \frac{Q}{\epsilon_g S}$$

$$E_d = \frac{Q}{\epsilon_d S}$$

essendo Q la carica presente sulle armature del condensatore.

In ogni istante t , si avrà che la tensione ai capi delle armature è data da

$$U = \int_0^d \vec{E} \cdot d\vec{l} = \frac{Q}{S} \left(\frac{d_g}{\epsilon_g} + \frac{d_d}{\epsilon_d} \right)$$

e poiché

$$Q = CU = \frac{S\epsilon_g\epsilon_d U}{\epsilon_g d_d + \epsilon_d d_g}$$

otteniamo che il campo elettrico nel gas è dato da

$$E_g = \frac{\epsilon_d U}{\epsilon_g d_d + \epsilon_d d_g}$$

Possiamo così ricavare la tensione minima affinché si abbia l'innesco della scarica, ovvero quando $E_g = E_b$ (con E_b campo elettrico di soglia per il *breakdown*), che è

$$U_{min} = E_b \left(d_g + \frac{d_d \epsilon_g}{\epsilon_d} \right)$$

Il risultato può essere semplificato se $d_g \gg \frac{d_d \epsilon_g}{\epsilon_d}$, condizione non lontana da quella di nostro interesse poiché le permittività dei dielettrici utilizzati sono generalmente più grandi di quelle dei gas (il rapporto tra la permittività relativa del vetro o porcellana e quello dell'aria è circa 6), e quindi risulta

$$U_{min} \cong E_b d_g$$

Grazie a questa relazione, possiamo ricavare la potenza effettiva prodotta da una DBD grazie alla relazione di Manley [12]

$$P = 4fC_d^2 + \frac{U_{min}(U - U_{min})}{C_d C_g}$$

dove f è la frequenza della tensione applicata.

2.2. Plasma jet

Un altro sistema per la produzione di plasmi non termici è il *plasma jet* che, a differenza della scarica a barriera dielettrica già largamente presentata, ha la particolarità di generare un plasma non confinato all'interno di una struttura, ma che esce dal sistema.

Questo lo rende appetibile ad esempio per i trattamenti medici poiché ha meno limitazioni applicative, sia dal punto di vista della tipologia che della dimensione dell'esemplare oggetto della terapia, e, poiché il plasma si propaga lontano dalla regione ad alto voltaggio ad una senza un campo elettrico esterno applicato, è sicuro dal punto di vista elettrico e non può causare danni al campione da trattare o alla persona; infine il diametro del plasma può essere anche molto piccolo, permettendo un trattamento localizzato [13, 14].

I trattamenti indiretti con DBD hanno simili vantaggi, in quanto l'oggetto non viene posto all'interno degli elettrodi ma in una zona vicina e viene raggiunto dalle specie attive del plasma grazie ad effetti fluidodinamici (ed eventualmente elettrofluidodinamici), tuttavia i radicali con brevi vite e le particelle cariche potrebbero non avere il tempo necessario di arrivare in prossimità del campione [14].

Come in tutti i sistemi che generano scariche di non equilibrio, e quindi a bassa temperatura, l'obiettivo è quello di inibire la transizione dal regime di *glow discharge* a quello di arco elettrico, complicato dall'elevata frequenza di collisione tra elettroni e particelle pesanti.

Un altro traguardo è quello di sostenere l'esistenza del plasma anche in una regione a basso campo elettrico, ovvero la zona dove il plasma viene emesso nell'ambiente esterno. Esistono moltissime sorgenti *plasma jet* che soddisfano questi due punti che lavorano con gas nobili, ad esempio l'elio o l'argon, e costruite con varie configurazioni. È più complicato invece ottenere lo stesso risultato utilizzando l'aria o i gas biatomici, che tuttavia risultano molto interessanti poiché il plasma così generato ha una chimica più reattiva.

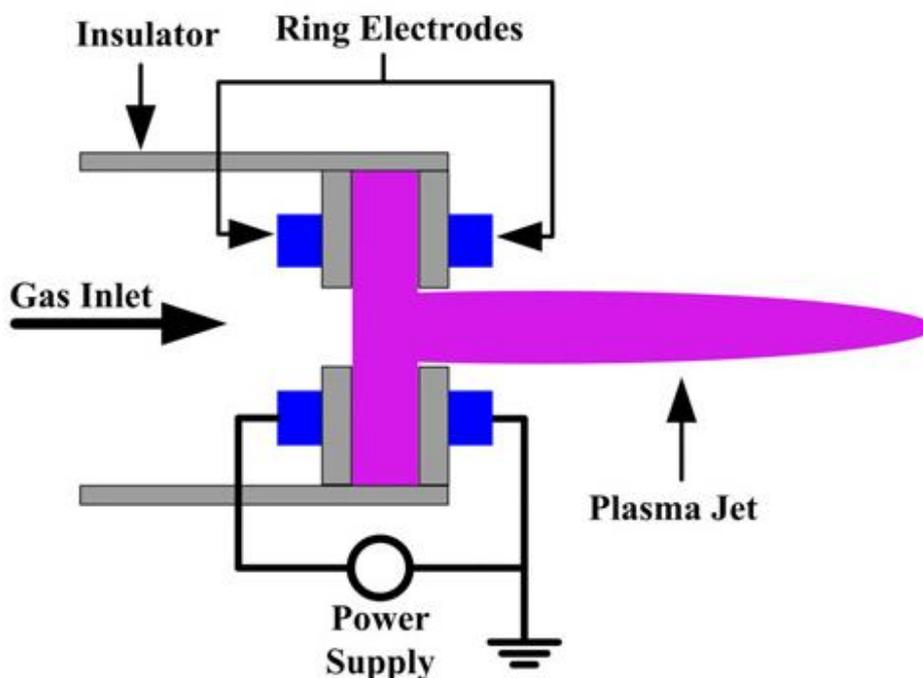


Fig. 2.6 – Schema di un DBD jet [15]

In figura 2.6 è mostrato lo schema di un DBD jet, progettato da Lu e Laroussi, costituito da due elettrodi ad anello attaccati a due dischi di dielettrico perforati, con il foro di circa 3 mm di diametro e posti a circa 5 mm di distanza.

Come in altri dispositivi di questa tipologia, il gas utilizzato è Elio o Argon, a cui viene applicata una alta tensione alternata a frequenza dell'ordine dei kHz oppure una corrente diretta impulsata.

Grazie al dielettrico le potenze in gioco sono molto basse e la temperatura del gas in uscita è circa quella ambiente, inoltre evita la possibilità di archi anche quando il campione è in prossimità dell'ugello.

Con questa configurazione si possono raggiungere lunghezze della piuma di plasma di anche 10 cm, grazie al maggior campo elettrico presente in questa zona rispetto al sistema DFE; questo campo permette inoltre di ottenere una chimica del plasma più attiva [16].

Il getto di plasma, che ad occhio nudo sembra omogeneo, in realtà è formato da un susseguirsi di proiettili di plasma che viaggiano a velocità superiori a $10 \text{ km} \cdot \text{s}^{-1}$ (enormi paragonate alla velocità di scorrimento del gas, che è circa di $8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

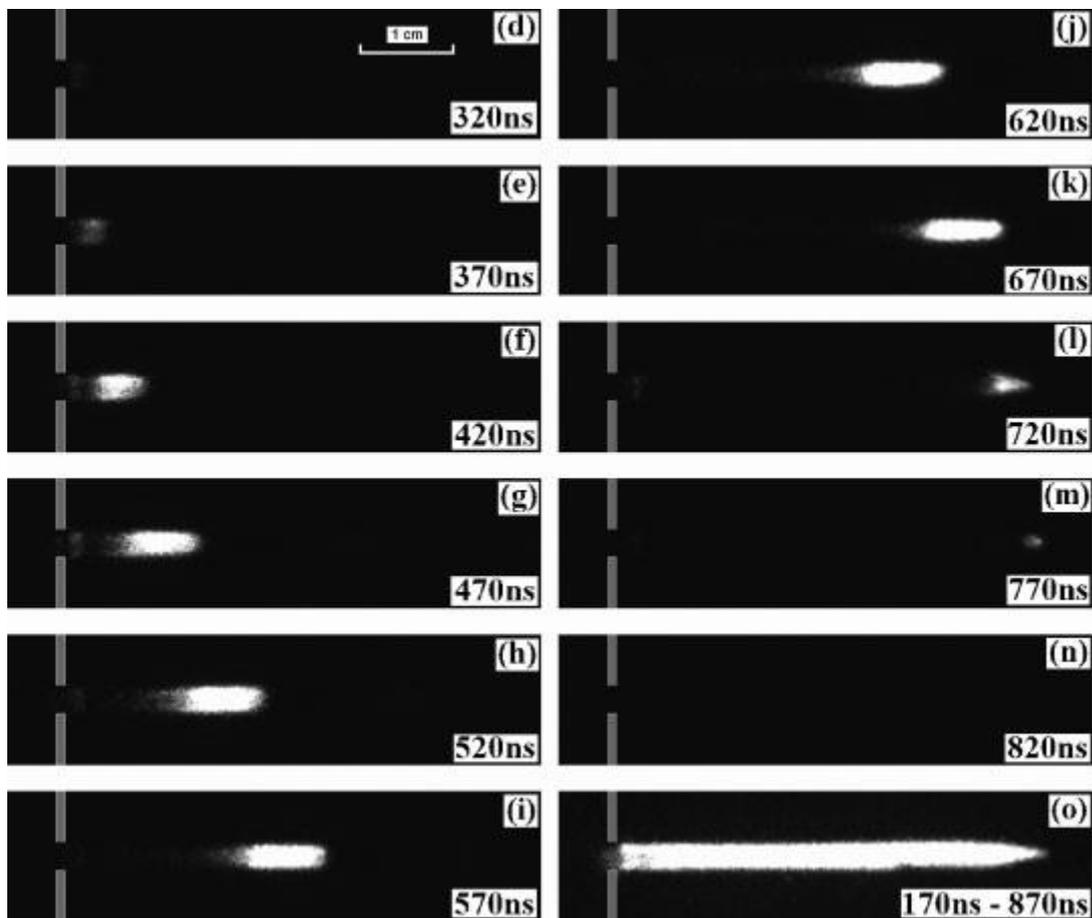


Fig. 2.7 – Proiettili di plasma emessi da una sorgente DBD jet alimentata a 10kV DC pulsata, fotografati ogni 50 ns [14]

La velocità di propagazione così elevata del *plasma bullet* è spiegata dal modello di Lu e Laroussi basato sul processo di fotoionizzazione.

Capitolo 3

Interazione del plasma con la materia

3.1. Agenti inattivanti del plasma

Sebbene l'esatto meccanismo di interazione tra plasma e cellule non sia ancora completamente compreso, possiamo considerare singolarmente il rapporto tra i materiali biologici e gli agenti creati durante la scarica per ottenere alcune informazioni preliminari riguardanti questo complicato processo.

Gli agenti che hanno un ruolo preponderante sono il calore, la radiazione UV, le particelle cariche e le specie reattive.

In aggiunta alla seguente breve introduzione, il rapporto tra cellule cancerose e plasma verrà discusso più approfonditamente nei capitoli successivi.

3.1.1. Calore

Il calore viene utilizzato come metodo di sterilizzazione in molte applicazioni data la sua capacità battericida.

Nei sistemi a calore umido, come l'autoclave, la temperatura di funzionamento standard è di 121° C ad una pressione intorno ad 1 bar, mentre nei sistemi a secco vengono utilizzate temperature vicino ai 170° C con tempi di trattamento di circa 1 ora [17].

Le temperature del plasma nei sistemi DBD o *plasma jet* utilizzati per la sterilizzazione sono prossime a quella ambiente, così come nelle scariche per i trattamenti di cellule di nostro interesse, di gran lunga lontane da quelle necessarie per indurre un danno cellulare. Per questo tipo di scariche, è ragionevole trascurare l'apporto del calore sugli effetti complessivi del plasma.

3.1.2. Radiazione UV

Le radiazioni ultraviolette sono radiazioni elettromagnetiche comprese nell'intervallo di spettro elettromagnetico tra la luce visibile all'occhio umano e i raggi X, e hanno lunghezza d'onda λ compresa tra i 400 nm e i 10 nm.

La relazione tra frequenza e lunghezza d'onda è così espressa

$$f = \frac{c}{\lambda}$$

dove c è la velocità della luce nel vuoto, e ci permette di determinare l'energia di un fotone mediante la relazione di Planck-Einstein

$$E = hf$$

con h costante di Planck; così l'energia dei fotoni UV varia da 3,10 eV a 124 eV e cresce in maniera inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda.

In base alle loro caratteristiche possiamo suddividere gli UV in quattro categorie:

- VUV, 10-100 nm
- UVC, 100-280 nm
- UVB, 280-315 nm
- UVA, 315-400 nm

I primi hanno energia molto elevata, sufficiente a rompere qualsiasi legame chimico, ma hanno una bassa capacità di penetrazione della materia.

Gli UVA e UVB sono poco energetici mentre gli UVC hanno buona capacità penetrante ed energia sufficiente a distruggere molte molecole organiche, per questo motivo sono i più efficaci ad interagire con la materia.

Gli UV agiscono catalizzando nel DNA la formazione di un legame covalente tra due basi di timina adiacenti, formando un dimero di timina.

Questo induce una distorsione dell'elica del DNA, che, se non viene corretta dagli enzimi con funzione riparatrice, può indurre una mutazione nella cellula.

Nei plasmi generati da DBD, lo spettro della radiazione UV è tendenzialmente quello mostrato in Fig. 3.1 e Fig. 3.2.

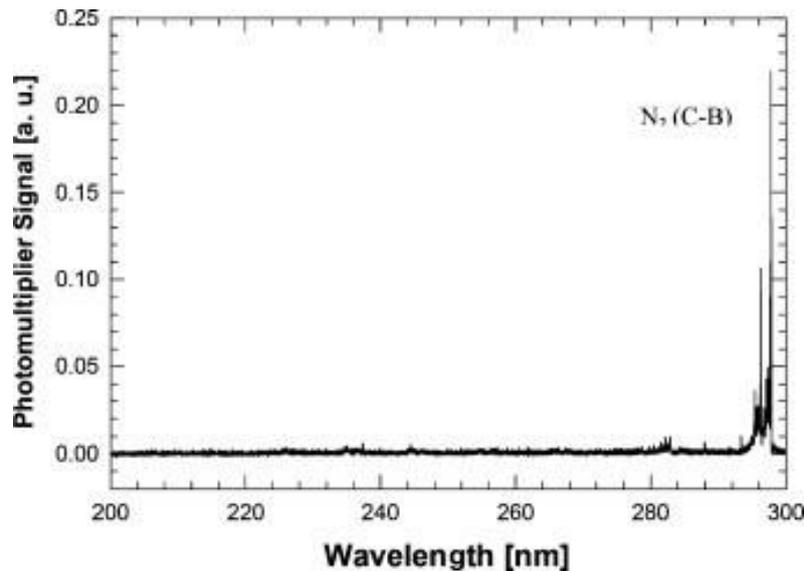


Fig. 3.1 – Spettro UV di una DBD in aria nell'intervallo compreso tra 200-300 nm di lunghezza d'onda [18]

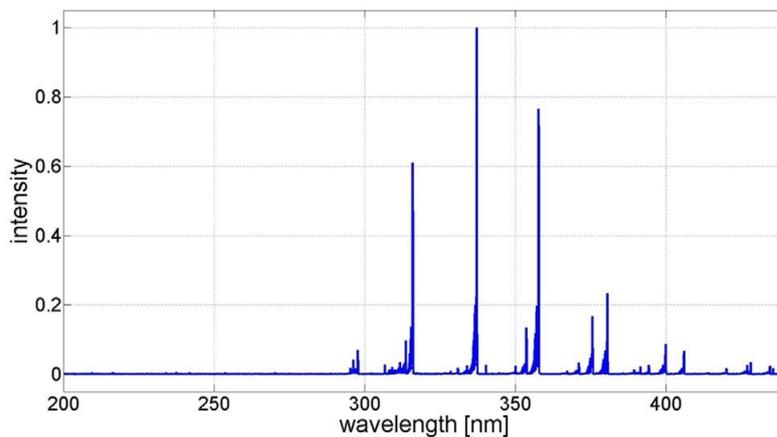


Fig. 3.2 – Spettro UV di una DBD pulsata (μ s) in aria [19]

Si può vedere che in entrambi i casi non avviene nessuna emissione significativa di UV a meno di 285 nm; considerando la densità di potenza misurate e i tempi di trattamento, l'apporto di questa radiazione è limitato [18, 19].

3.1.3. Particelle cariche

Le particelle cariche possono avere un ruolo significativo poiché causano delle perforazioni nella membrana cellulare.

Quando si depositano sulla superficie esterna della membrana cellulare, essa subisce una forza elettrostatica diretta verso l'esterno dovuta al fatto che ogni carica subisce la forza repulsiva di tutte le cariche simili accumulate sulla superficie.

Questa forza elettrostatica può superare la tensione di rottura della membrana cellulare, causando una lacerazione in essa; la forza è inversamente proporzionale al quadrato del raggio di curvatura della superficie, perciò considerando una cellula sferica, essa sarà tanto più grande quanto è piccola la cellula, inoltre, le cellule con superfici irregolari, avranno porzioni di superficie a curvatura particolarmente accentuata.

Per questo motivo la forza che subiranno sarà molto intensa aumentando così la probabilità che il processo di elettroporazione avvenga.

La formazione localizzata di pori nella membrana cellulare potrebbe eventualmente essere sfruttata per introdurre determinate molecole all'interno delle cellule utili a vari scopi [18].

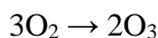
3.1.4. Specie reattive

Nelle scariche di non equilibrio a pressione atmosferica, le specie reattive sono generate attraverso vari processi collisionali, tra cui molto importanti sono quelli di urto tra elettroni e altri corpi.

Nei plasmi in aria, si formano una varietà di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS), come l'ossigeno atomico O, l'anione superossido O_2^- , l'ozono

O₃, il radicale⁴ ossidrilico OH·, il perossido d'idrogeno H₂O₂, il monossido di azoto NO, il biossido di azoto NO₂, e altri.

L'ozono viene prodotto dalla scarica grazie alla presenza dell'ossigeno, che si può convertire in ozono secondo la reazione endotermica seguente:



È un efficace disinfettante e battericida e più in generale è un agente dannoso per la vita delle cellule, poiché interferisce con il processo di respirazione cellulare.

Le specie basate sull'ossigeno e azoto hanno un grosso effetto ossidativo nella struttura esterna delle cellule.

La membrana è costituita da strati lipidici, tra cui una parte importante sono gli acidi grassi insaturi, e ciò permette il trasporto di sottoprodotti biochimici attraverso essa.

Poiché gli acidi grassi insaturi sono sensibili all'attacco del radicale ossidrilico OH·, la sua presenza può compromettere la loro efficacia nel ruolo di barriera al trasporto di ioni e composti polari all'interno ed esterno della cellula [20].

Le proteine, che sono catene di amminoacidi, hanno anch'esse un ruolo di controllo del passaggio di varie macromolecole dalla membrana cellulare, ed essendo propense all'ossidazione con l'ossigeno atomico o con molecole dell'ossigeno poco stabili, possono compromettere l'integrità dei rivestimenti della cellula.

Ci si aspetta così un notevole impatto dovuto ai ROS e RNS sulla vita della cellula [18].

3.2. Agenti nei trattamenti diretti e indiretti

L'esposizione del campione al plasma può avvenire in due maniere: direttamente, in cui il campione è in effettivo contatto con il plasma, oppure indirettamente, ponendolo ad opportuna distanza dal volume di plasma.

La scelta di una configurazione piuttosto che un'altra determina un cambiamento nell'interazione del plasma con la materia in quanto l'effetto di alcuni agenti sarà più o meno accentuato.

⁴ Un radicale è un'entità molecolare molto reattiva avente vita media di norma molto breve, costituita da un atomo o una molecola che presenta un elettrone spaiato; in generale non è uno ione poiché ha carica neutra (esistono tuttavia ioni radicalici).

Nel primo caso abbiamo la massima efficacia sotto tutti i punti di vista, essendo il campione esposto totalmente all'azione degli agenti.

Con la seconda tipologia il calore trasmesso all'oggetto del trattamento è minore, le particelle cariche non hanno un ruolo di interesse poiché si ricombinano prima di raggiungerlo, e per quanto riguarda la componente neutra, anche molte specie reattive a vita breve non riescono ad arrivare al campione [18].

L'efficacia delle due configurazioni nel caso di trattamento di cellule cancerose sarà discussa nel capitolo successivo.

Capitolo 4

Trattamenti su cellule tumorali

4.1. Le cellule tumorali

Per capire gli effetti del plasma sulle cellule tumorali, è necessaria una preliminare descrizione delle loro caratteristiche mediante un confronto tra esse e le cellule non neoplastiche.

In ogni cellula mammifera proliferante, la replicazione dell'intero genoma e la divisione della cellula in due cellule figlie identiche geneticamente può essere suddivisa in quattro distinte fasi del ciclo cellulare.

Nella prima fase chiamata G_1 , la cellula subisce i cambiamenti biochimici che la preparano ad entrare nella fase successiva S , in cui viene sintetizzato nuovo DNA.

In questa fase S la cellula genera una copia completa del proprio materiale genetico e procede ad una seconda fase preparatoria, chiamata G_2 , prima di entrare nella fase di mitosi (fase M).

In quest'ultima il DNA replicato è condensato in cromosomi e segregato per permettere alle due cellule figlie di ricevere l'intero complemento del materiale genetico.

Dopo la mitosi, ogni cellula rientra direttamente nella fase G_1 , che la prepara per la successiva replicazione.

Oltre a queste fasi, la cellula può entrare nella fase G_0 , dopo la G_1 , che è uno stato di inattività, e che si presenta quando le condizioni non sono adatte alla cellula per procedere alla duplicazione.

Data la complessità e la irreversibilità dei processi biologici che avvengono durante la replicazione cellulare, le cellule eucariote hanno sviluppato alcuni *checkpoint*, che sono dei punti definiti biochimicamente del ciclo cellulare che possono essere attivati per prevenire la transizione attraverso certe fasi.

In questa maniera, una cellula normale può essere sicura che la sintesi del DNA non venga iniziata o continuata in condizioni avverse, e che i cromosomi non si condensino nelle cellule figlie fino a quando l'intero genoma non è accuratamente replicato e preparato per la mitosi.

La perdita di questi *checkpoint*, che comporta disastrose implicazioni inducendo una varietà di anomalie genetiche, è una cosa comune nelle cellule cancerose [21].

Una cellula normale può subire una trasformazione, dovuta ad effetti fisici, chimici o biologici esterni, che la rende maligna.

Il progressivo raddoppiamento ad oltranza di questa cellula attivata va a costituire un tessuto tumorale, e quando le cellule tumorali sono un numero sufficiente, può avvenire la morte dell'ospite.

La cinetica di crescita del tessuto tumorale dipende così dal periodo di raddoppiamento delle cellule, che varia da tipo a tipo.

Inoltre bisogna considerare che non tutte le cellule tumorali sono proliferanti, alcune infatti rimangono in G_0 , altre muoiono e le ultime sono differenziate e hanno perso la capacità di replicazione.

Nel caso dei tumori solidi umani, la proliferazione delle cellule e di conseguenza il volume della massa tumorale presenta un andamento decrescente nel tempo, rappresentato dal modello di Gompertz, espresso così matematicamente

$$\frac{dV(t)}{dt} = aV(t) - bV(t) \ln V(t)$$

dove V è il volume del tumore al tempo $t > 0$, a e b sono due termini positivi che rappresentano rispettivamente il tasso di crescita intrinseco del tumore correlato al tasso mitotico cellulare e il fattore di decelerazione della crescita.

Integrando l'equazione differenziale a partire dalla condizione iniziale V_0 (volume del tumore al tempo zero), otteniamo

$$V(t) = \exp\left(\frac{a}{b} - \left(\frac{a}{b} - \ln V_0\right)e^{-bt}\right)$$

Inizialmente la crescita procede con un tasso che aumenta fino ad un punto di flesso, per poi proseguire ma con un tasso che va diminuendosi fino ad esaurirsi, raggiungendo un valore asintotico

$$V(\infty) = e^{\frac{a}{b}}$$

Questo modello teorico ci mostra che le neoplasie raggiungono volumi interessanti in breve termine, per poi stabilizzarsi.

Questo comportamento è dovuto al fatto che più il volume cresce, più la vascolarizzazione del tumore diventa inadeguata, particolarmente nelle zone centrali, causando la morte delle cellule tumorali.

La trasformazione neoplastica parte dai protooncogeni, geni che codificano le proteine coinvolte nel controllo della crescita cellulare, come i fattori di crescita, i recettori, i trasduttori del segnale, le proteine che trascrivono il DNA e le proteine coinvolte nell'apoptosi.

Questi geni, a causa di alcuni fattori, come le mutazioni nei nucleotidi, si attivano diventando oncogeni, che svolgono la codifica delle particolari proteine senza un controllo (ad esempio un recettore sempre attivo).

In questa maniera aumentano le probabilità che lo sviluppo della cellula si diriga in senso tumorale.

Dall'altra parte vi sono i geni oncosoppressori, che svolgono un ruolo di codifica di proteine che agiscono negativamente sulla progressione del ciclo cellulare proteggendo la cellula dall'accumulo di mutazioni potenzialmente tumorali.

Le funzioni degli oncosoppressori possono essere le seguenti: repressione di geni essenziali per il proseguimento del ciclo cellulare, interruzione del ciclo cellulare in caso di DNA danneggiato, soppressione di metastasi⁵ e avvio dell'apoptosi [22].

Quest'ultimo processo è una forma di morte cellulare programmata, che è utile per l'omeostasi cellulare, mantenendo il numero adeguato di cellule nel sistema, ed è iniziato dalle caspasi, enzimi che possono eliminare determinate proteine portando infine alla morte della cellula.

⁵ Disseminazione delle cellule tumorali in organi diversi dalla sede di origine.

L'inibizione della attività apoptotica è un importante meccanismo presente nelle cellule neoplastiche, che favorisce uno sviluppo maggiore del tumore, grazie alla limitazione del numero di cellule morte.

La duplicazione incontrollata non è sempre ovvia, infatti le cellule neoplastiche possono rimanere quiescenti per anni, o per un arresto del ciclo cellulare nella fase G₀ oppure poiché la frequenza di morte cellulare bilancia la proliferazione.

Il passaggio tra tessuto normale a tumore invasivo può avvenire tra 5 e 20 anni e vi sono elementi favorevoli alla promozione di questo sviluppo, ad esempio fattori genetici ereditari [21].

Il processo di metastatizzazione si sviluppa grazie all'angiogenesi, ovvero la strutturazione di una rete capillare dal tessuto vicino al tumore, partendo da vasi sanguigni già esistenti, che va a formare una nuova vascolarizzazione tumorale.

L'angiogenesi è favorita da determinati fattori, come l'ipossia, concentrazioni alte di CO₂, oncogeni, ecc.

Fornisce così un canale di invasione nel resto del corpo per le cellule tumorali, che vanno a diffondersi in altri organi, e riescono a stabilirsi nei loro tessuti.

Altri meccanismi che favoriscono lo sviluppo tumorale sono la perdita delle cellule dell'inibizione da contatto, che permette ad esse di moltiplicarsi indipendentemente dal numero di cellule vicine, e la possibilità di replicarsi ipoteticamente infinite volte grazie all'azione di un enzima, chiamato telomerasi, che aggiunge sequenze ripetitive di DNA nella zona dei telomeri, in modo da mantenere la loro lunghezza costante.

Nelle cellule normali infatti i telomeri, regioni terminali del cromosoma che permettono di non perdere informazione cellulare durante la replicazione del DNA, si accorciano ad ogni duplicazione cellulare, limitandone il numero possibile [21].

4.2. I trattamenti

L'utilizzo di plasmi per il trattamento di cellule tumorali ha suscitato recentemente un grande interesse poiché, in alcuni casi, ha permesso la limitazione dello sviluppo del tumore mediante l'uccisione delle cellule neoplastiche.

Gli effetti del plasma sulle cellule sono già stati presentati, e non è quindi strano che il plasma porti alla morte delle cellule grazie ai numerosi agenti che si generano durante la scarica.

Tuttavia, ciò che è particolare è che gli effetti risultano più accentuati sulle cellule tumorali piuttosto che su quelle sane.

Il plasma sembra perciò avere una selettività non ancora chiara che lo potrebbe rendere in futuro un interessante terapia nel campo dell'oncologia.

Una descrizione generale del perché ciò avvenga è però molto difficile da ottenere, in primo luogo per la complessità dei fenomeni fisici, chimici e biologici che avvengono nel processo, e un ulteriore ostacolo è dato dal fatto che i gruppi di ricerca lavorano con una varietà di reattori con chimiche del plasma estremamente diverse, e applicano i trattamenti a cellule cancerose di tutti i generi, ottenendo risultati spesso contrastanti.

La scelta dei generatori di plasma ricade ovviamente su quelli che producono plasmi non termici, ideali per le applicazioni mediche, e in particolare le configurazioni più utilizzate sono *plasma jet* e DBD in due varianti, classica a due elettrodi metallici a distanza opportuna per l'inserimento del campione, e FE-DBD (*floating electrode dielectric barrier discharge*), in cui l'elettrodo di terra è il materiale biologico stesso.

Molti gruppi di ricerca hanno inoltre utilizzato un duplice approccio, effettuando i trattamenti sia in maniera diretta che indiretta, confrontandone i risultati.

Nonostante sia un campo di ricerca ancora agli esordi, sono già state fatte sperimentazioni su sistemi più complessi della singola cellula; presenterò successivamente i risultati più interessanti ottenuti *in-vitro* e *in-vivo*.

4.2.1. Trattamenti *in-vitro*

Il primo approccio utile ad ottenere risultati riguardo questa tipologia di trattamento è quello *in-vitro*.

Il campione in questo caso è costituito da una cultura cellulare contenuta, ad esempio, in una piastra di Petri, che viene sottoposta poi al plasma.

Le tipologie di cellule neoplastiche trattate in questa maniera dai gruppi di ricerca sono di una grande varietà, ed è utile un confronto tra i risultati ottenuti per capire, almeno in maniera preliminare, il rapporto tra il plasma e le cellule tumorali.

Un risultato comune è la dipendenza dalla dose di trattamento e l'effetto sulle cellule, infatti il numero di cellule cala in maniera dipendente dal tempo di esposizione [23], come si può vedere nella figura successiva.

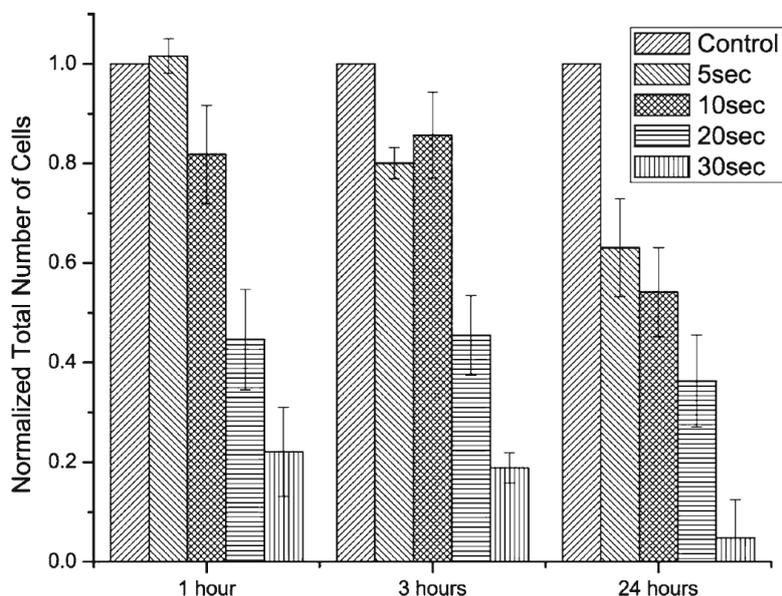


Fig. 4.1 – Numero di cellule di melanoma rimaste vive in funzione del tempo di applicazione del plasma a 1, 3, 24 ore dal trattamento [23].

In questo caso sono state trattate cellule di melanoma con una sorgente FE-DBD per 5, 10, 20, 30 secondi, ed è stato poi valutato il numero di cellule rispetto al totale a 1, 3, 5 ore dall'applicazione del plasma.

Si può notare un calo maggiore per quelle trattate per tempi più lunghi, e inoltre è osservabile una continua diminuzione delle cellule anche a distanza di ore, che permette di ipotizzare un aumento dell'attività apoptotica.

Inoltre da più esperimenti è risultato che la modalità di morte cellulare sembra variare in base all'intensità di trattamento, a basse dosi per apoptosi, mentre ad alte per necrosi [23, 24]; la presenza di cellule apoptotiche, in particolare, sarà analizzata successivamente.

La morte delle cellule dovuta al plasma non è affatto strana, tuttavia in alcuni casi si è evidenziato un calo nel numero di cellule più accentuato in quelle tumorali rispetto a cellule normali.

Questo si può vedere in Fig. 4.2, dove sono state trattate da una DBD cellule di glioblastoma (T98G), di carcinoma tiroideo (SNU80), di carcinoma orale (KB) e cellule embrionali non maligne (HEK293).

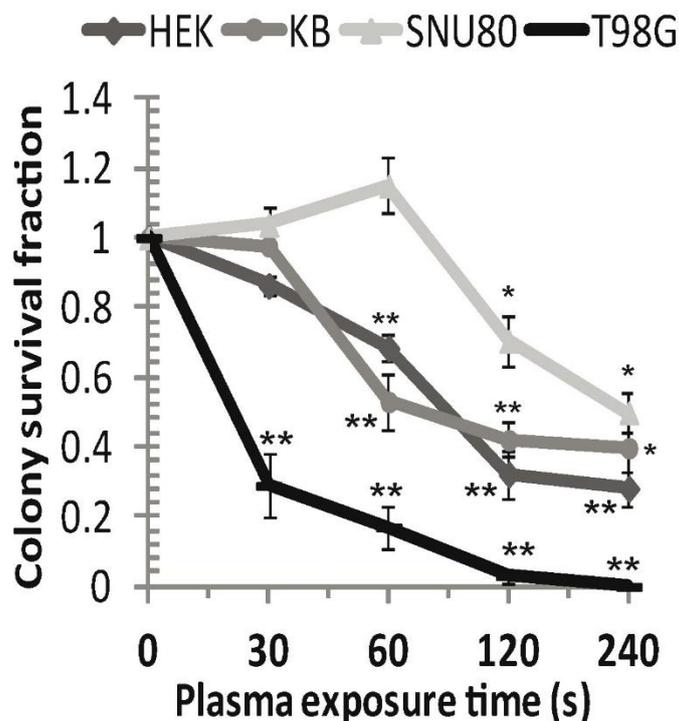


Fig. 4.2 – Frazione sopravvissuta di cellule HEK, KB, SNU80 e T98G in funzione del tempo di esposizione al plasma [24].

Si può notare un calo del numero di cellule a 60 secondi di trattamento molto più accentuato per le cellule T98G e KB, neoplastiche, piuttosto che in quelle HEK normali [24].

Nel caso delle cellule SNU80, il trattamento è risultato inefficace, ed esse risultano estremamente resistenti anche ad altre terapie, come la chemioterapia e la radioterapia.

In un altro studio, il plasma, prodotto da una sorgente *plasma jet*, ha mediato il distaccamento dal piatto di coltura di una grossa porzione di cellule di tumore polmonare SW900, mentre non ha avuto lo stesso effetto su normali cellule epiteliali bronchiali (Fig. 4.3), indicando anche in questo caso una particolare selettività.

Il fenomeno di adesione cellulare, mediato da determinate proteine chiamate caderine, e in particolare le caderine E che servono per mantenere un equilibrio meccanico tra le cellule e il tessuto in cui sono presenti, è un importante meccanismo nel processo

canceroso, così come l'inibizione dell'apoptosi, e sembra che possano essere deregolati dal plasma [25].

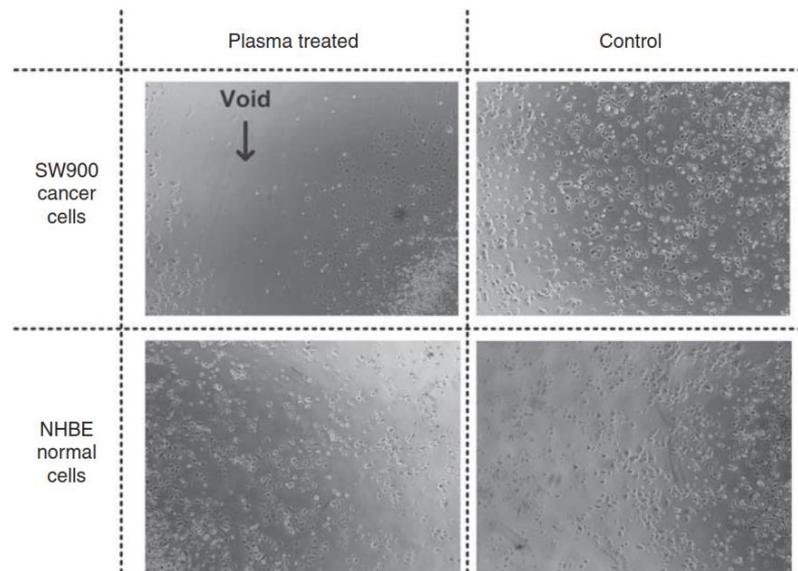


Fig. 4.3 – Distacco del 60-70 % di cellule SW900 dalla piastra Petri, non avvenuto invece nel caso delle cellule NHBE [25].

Il plasma sembra inoltre influire negativamente sulla motilità cellulare, fattore molto importante nella ricerca sul cancro poiché la migrazione e l'infiltrazione cellulare sono fenomeni critici per la crescita tumorale e lo sviluppo di metastasi, che potrebbero così essere limitate, e genera dei pori nella membrana cellulare di raggio dell'ordine dei nanometri.

Questo, assieme alle altre reazioni biochimiche che avvengono nella superficie cellulare, potrebbe migliorare, ad esempio in una terapia combinata plasma e chemioterapia, l'assorbimento e l'efficacia dei farmaci, anche in cellule particolarmente resistenti, ripristinando la chemiotassi⁶ [26].

Il plasma, sempre in maniera dipendente dalla dose, determina un aumento della produzione di ROS intracellulari.

In presenza di uno sbilanciamento tra la produzione di questi e la difesa antiossidante della cellula, mediata da alcuni enzimi, avviene lo stress ossidativo, che comporta un danneggiamento di tutti i componenti della cellula, incluse proteine, lipidi e DNA.

⁶ Chemiosensibilità, suscettibilità delle cellule neoplastiche agli effetti dei farmaci che le distruggono.

Il glutatione (GSH) è un tripeptide che ha ruolo chiave nel mantenimento della omeostasi cellulare relativa all'ossidazione, proteggendo la cellula dalla presenza dei sopracitati ROS.

Esso viene rigenerato per mezzo dell'enzima glutatione reduttasi (GSR) dal glutatione ridotto (GSSG) grazie al coenzima NADPH, che a sua volta si genera dalla sua forma ossidata NADP⁺.

È stato valutato il livello GSH/GSSG nelle cellule T98G, KB, SNU80 e HEK per tempi di trattamento di 0, 30, 60, 120 secondi, mostrato in figura 4.4.

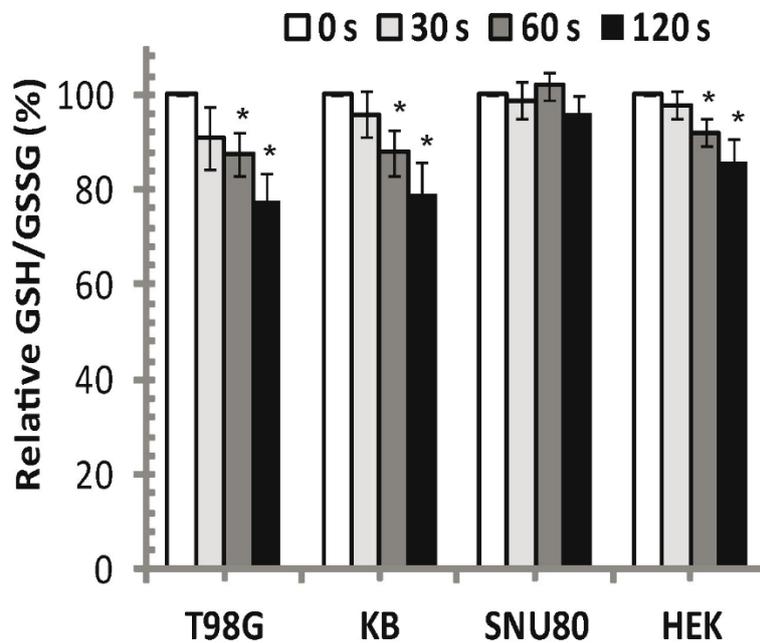


Fig. 4.4 – Livello di GSH/GSSG per quattro tipi di cellule in seguito a 0, 30, 60, 120 secondi di trattamento [24].

Si può vedere una diminuzione interessante di GSH per le cellule T98G e KB rispetto al caso delle normali cellule HEK, mentre nel caso delle cellule SNU80 non vi è una variazione particolare.

Sono stati valutati anche i livelli NADP⁺/NADPH, essendo il NADPH fondamentale per la sintesi del glutatione.

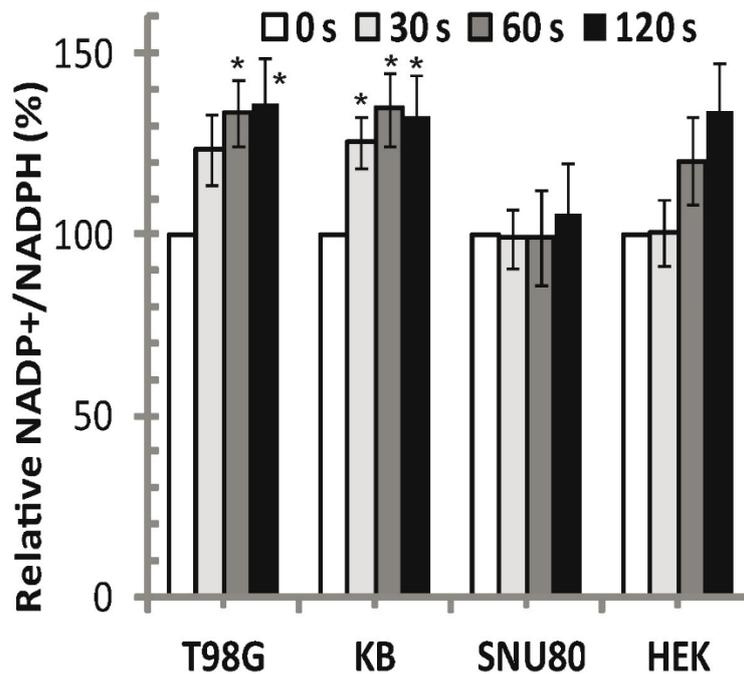


Fig. 4.5 - Livello di $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ per quattro tipi di cellule in seguito a 0, 30, 60, 120 secondi di trattamento [24].

La diminuzione del NADPH è evidente nel caso delle cellule di glioblastoma e carcinoma orale, anche per dosi basse di trattamento, mentre è trascurabile per il carcinoma tiroideo e per le normali cellule embrionali.

Ciò implica che il plasma, per determinati tipi di cellule, potrebbe interrompere la rigenerazione del NADPH, comportando un elevato stress ossidativo intracellulare.

Riprendendo la discussione riguardante l'apoptosi, è stata valutata l'attività delle caspasi, in particolare caspasi-3 e caspasi-7, enzimi essenziali durante l'apoptosi in grado di scindere i costituenti cellulari.

Nel gruppo di controllo, il livello di attività delle caspasi è legato alla frazione di cellule apoptotiche generate a causa del normale invecchiamento della popolazione cellulare.

L'attività è aumentata del 41.3% per le cellule T98G nel caso di 120 secondi di trattamento e del 78.6% nel caso di 240 secondi, mentre nelle altre tre tipologie di cellule l'attività è aumentata solamente ad alte dosi.

Poiché i mitocondri sono importanti nei processi apoptotici, è stato misurato il potenziale di membrana mitocondriale; il plasma infatti genera ROS che possono disturbare la

polarizzazione della membrana e variarne la permeabilità, un evento iniziale dell'apoptosi.

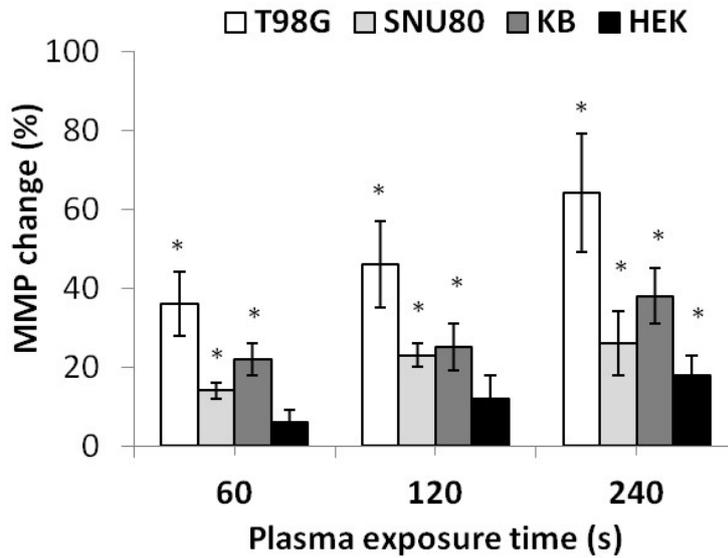


Fig. 4.5 – Variazione percentuale nel potenziale della membrana mitocondriale [24].

Anche in questo caso le cellule T98G mostrano un cambiamento più accentuato rispetto alle altre, seguite dalle cellule KB, e il seguente risultato è in linea con la percentuale di cellule in apoptosi per 120 secondi di trattamento, in figura 4.6.

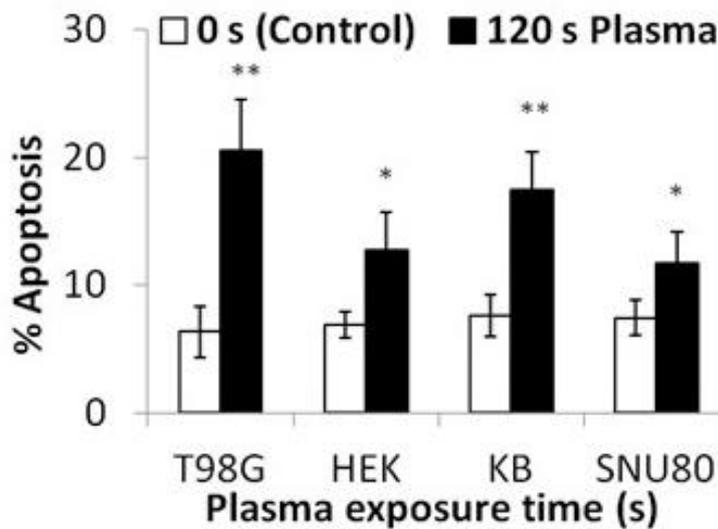


Fig. 4.6 – Percentuale di cellule apoptotiche nel gruppo di controllo e per un trattamento di 120 secondi, per quattro tipi di cellule [24].

4.2.2. Trattamenti *in-vivo*

Essendo la ricerca su questa particolare applicazione ad uno stato preliminare, i trattamenti *in-vivo* sono al momento ancora pochi e sono stati effettuati principalmente su topi, con una varietà di cellule tumorali impiantate.

Keidar *et al.* [25] hanno trattato 10 topi con cellule tumorali di cancro alla vescica iniettate sottocute, mediante una sorgente *plasma jet* ad elio.

L'effetto è stato equivalente per tutti i topi, risultando, dopo un trattamento di due minuti, in una rimozione del tumore nei casi di dimensione di circa 5 mm di diametro, mentre le masse più grandi sono diminuite in estensione.

Le masse tumorali eliminate non sono ricresciute, mentre quelle parzialmente ridotte sono tornate a crescere dopo circa una settimana dal trattamento, ma non hanno mai raggiunto le dimensioni originali nemmeno dopo tre settimane.

Applicando lo stesso trattamento a 8 topi con cellule di melanoma (B16-F10) iniettate sottocute, il risultato è stato simile al precedente, comportando una riduzione di volume del tumore e un conseguente aumento della sopravvivenza nel gruppo trattato piuttosto che nel gruppo di controllo, come si può vedere nelle figure 4.7 e 4.8.

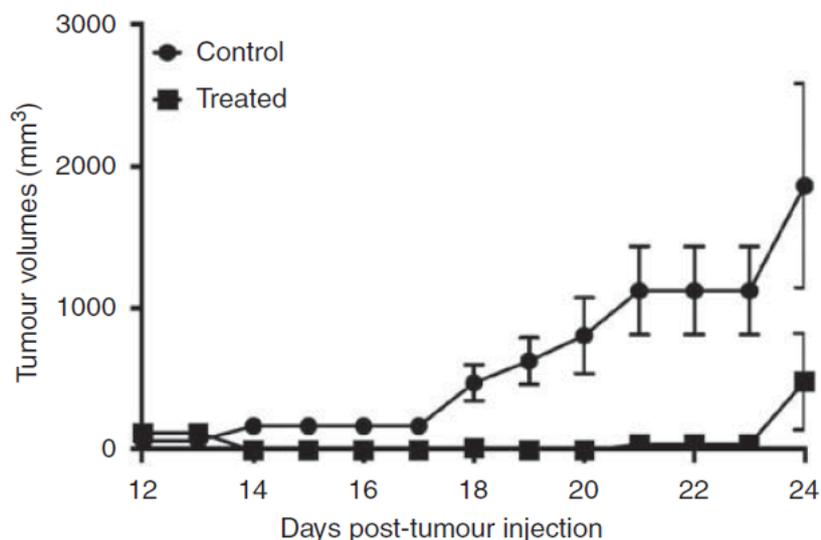


Fig. 4.7 – Effetti del trattamento a plasma non termico sulla crescita del tumore nel caso di melanoma [25].

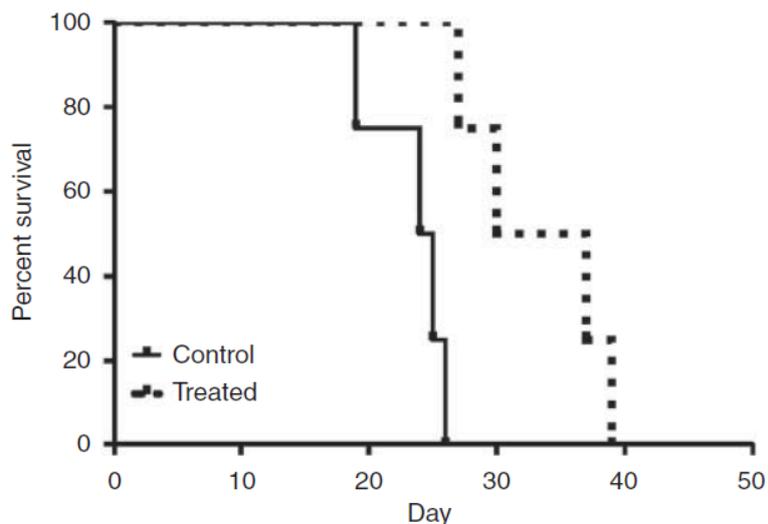


Fig. 4.8 – Effetti del trattamento al plasma non termico sulla sopravvivenza dei topi con melanoma [25].

Vandamme *et al.* [27] hanno applicato il trattamento al plasma non termico effettuato da un sistema FE-DBD su 32 topi con iniettate cellule di glioblastoma (U87MG).

Il plasma è stato applicato ogni giorno per cinque giorni consecutivi ai topi nel gruppo di trattamento, una volta che il volume del tumore ha raggiunto i $125 \pm 50 \text{ mm}^3$.

Alla conclusione del trattamento si è potuto vedere una importante differenza in termini di dimensioni tra il gruppo di controllo e quello di trattamento, con volumi medi di 400 mm^3 e 233 mm^3 rispettivamente (Fig. 4.9a).

Inoltre è stata analizzata l'attività apoptotica nei due gruppi, molto più intensa nel caso dei tumori trattati (Fig. 4.9b).

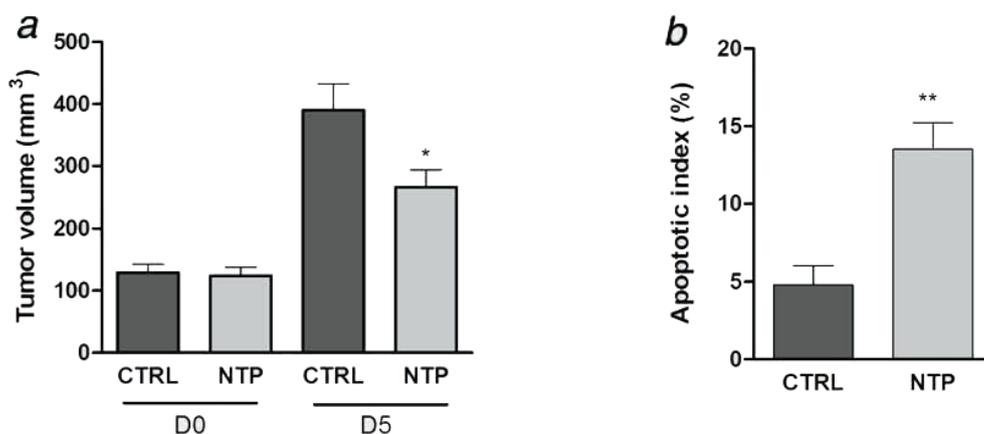


Fig. 4.9 – (a) Volume del tumore al giorno 0 e 5 per il gruppo di controllo e non. (b) Attività dell'apoptosi per i due gruppi [27].

4.2.3. Altri risultati

Non è stata notata in più casi particolare differenza tra gli effetti dovuti ad un trattamento diretto piuttosto che ad uno indiretto [27, 28]

La temperatura in tutti i casi analizzati è risultata leggermente superiore a quella ambiente, rimanendo largamente al di sotto di quella necessaria a causare un danno termico [24, 25, 27].

Per quanto riguarda il livello di pH, il plasma ha avuto un impatto variabile nei campioni, lasciandolo in alcuni casi inalterato [25], in altri ne ha provocato una crescita [24] o un calo anche non trascurabile [23]; queste differenze sono dovute alle diverse chimiche del plasma prodotto da varie sorgenti.

Nell'ultimo caso, per accertarsi che l'effetto antitumorale non sia stato mediato da un pH basso, essendo noto che l'acidità è dannosa per le cellule, Fridman *et al.* hanno confrontato il numero di cellule morte in seguito al trattamento al plasma e quelle morte in un mezzo di crescita a pH equivalente; il risultato si può vedere in Fig. 4.10, che evidenzia che il trattamento non agisce "avvelenando" il mezzo.

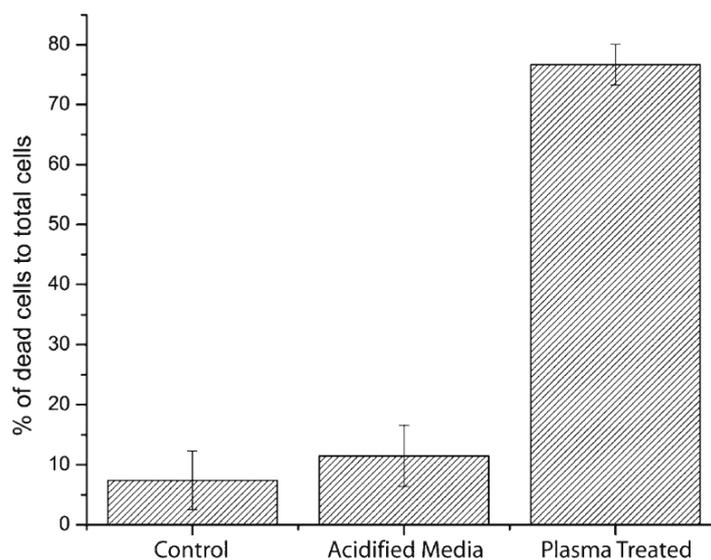


Fig. 4.10 – Confronto tra le cellule morte nel gruppo di controllo, nelle cellule trattate e in cellule poste in un mezzo a pH coincidente a quello conseguente all'applicazione del plasma [23].

Una possibile difficoltà è data dall'intuibile disuniformità di trattamento sul tessuto tumorale o sulle cellule nella piastra Petri, infatti le zone più profonde del tessuto saranno meno o addirittura non colpite dal trattamento, così come le cellule più protette dal mezzo di crescita [23].

Per ultimo, sulla selettività, Volotskova *et al.*, applicando il plasma a cheratinociti e a cellule di melanoma, hanno ipotizzato che le cellule tumorali, avendo una proliferazione maggiore e una distribuzione del ciclo cellulare diversa da quella delle cellule normali, sono più interessate dal trattamento al plasma poiché un numero più rilevante di esse si trova nella fase S, che sembra essere il momento di massima vulnerabilità [29].

4.3. Nostri trattamenti

4.3.1. Layout del reattore

La tipologia di scarica da noi utilizzata in laboratorio è una scarica a barriera dielettrica, con differenti configurazioni degli elettrodi e alimentazioni dipendentemente dal tipo di trattamento da svolgere, diretto o indiretto.

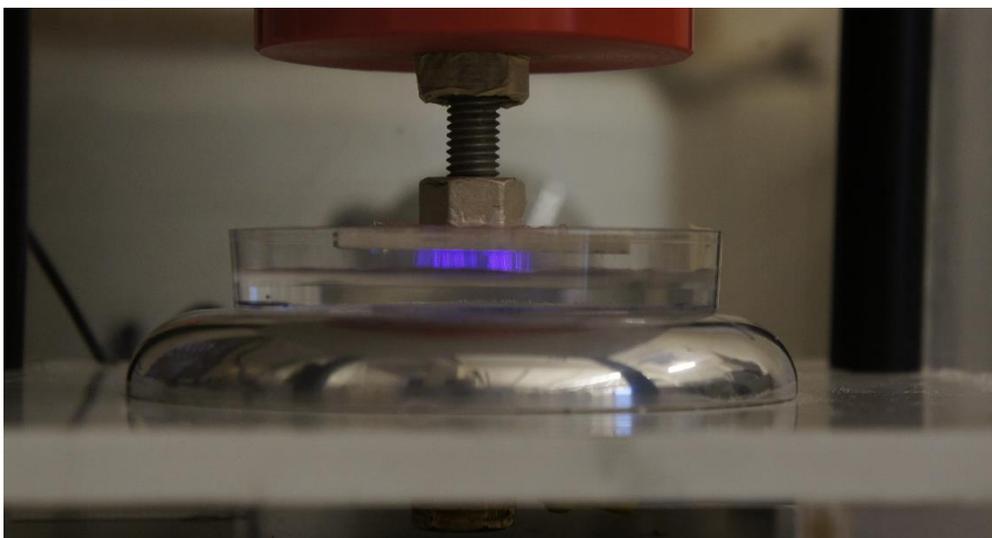


Fig. 4.11 - Sorgente DBD disposta per il trattamento diretto [9].

Nella figura vediamo il reattore adatto alla prima tipologia in funzione durante il trattamento di un volume di acqua contenuta in una piastra di Petri.

L'elettrodo di terra è formato da una striscia di rame incollata sul dielettrico di ceramica (grès porcellanato) e collegato al dado superiore in modo da permettere la regolazione dell'altezza del *gap* di scarica; l'elettrodo di alta tensione è il disco di acciaio alla base del sistema, scelta fatta per motivi di sicurezza.

Quest'ultimo inoltre ha un profilo curvo in modo da evitare l'effetto punta negli spigoli ed evitare così picchi di campo elettrico, che potrebbero far transire la scarica ad arco danneggiando i materiali di cui sono composti gli elettrodi e il campione da trattare.

La scarica in questo caso è una classica DBD volumetrica.

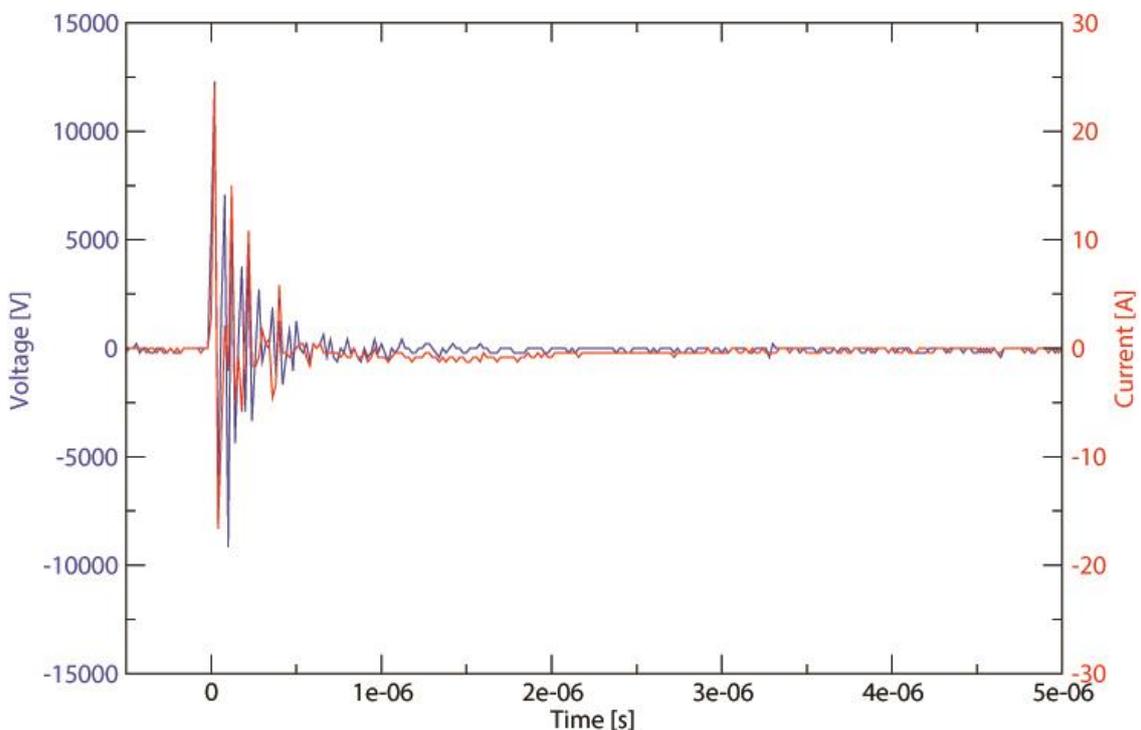


Fig. 4.12 – Andamento temporale di tensione e corrente della scarica nano-impulsata.

Per il trattamento diretto è stata scelta un'alimentazione nano-impulsata, e l'andamento di tensione e corrente in funzione del tempo è mostrato in Fig. 4.12 nel caso specifico di 11 kV di tensione e 1 kHz di frequenza.

Come si può vedere nella Fig. 4.13, l'elettrodo per il trattamento indiretto è costruito diversamente; la base di acciaio infatti non funge più da elettrodo di alta tensione, ma è scollegata e serve solamente da supporto per il campione.

L'elettrodo di alta tensione è invece costituito da tre strisce di rame, distanziate e incollate sulla superficie inferiore del dielettrico, mentre l'elettrodo di *ground* è sempre posizionato nel lato superiore.

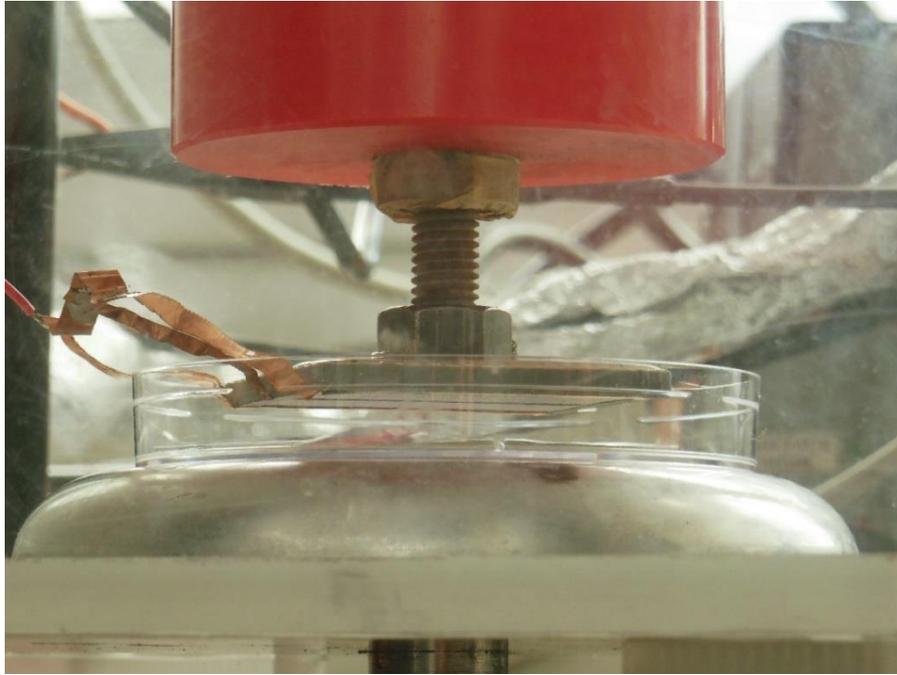


Fig. 4.13 - Sorgente DBD disposta per il trattamento indiretto.

La scarica così generata è una scarica superficiale, e il plasma si va a formare nello spazio tra le lamelle di rame dell'elettrodo di alta tensione, come si può vedere nella figura seguente.

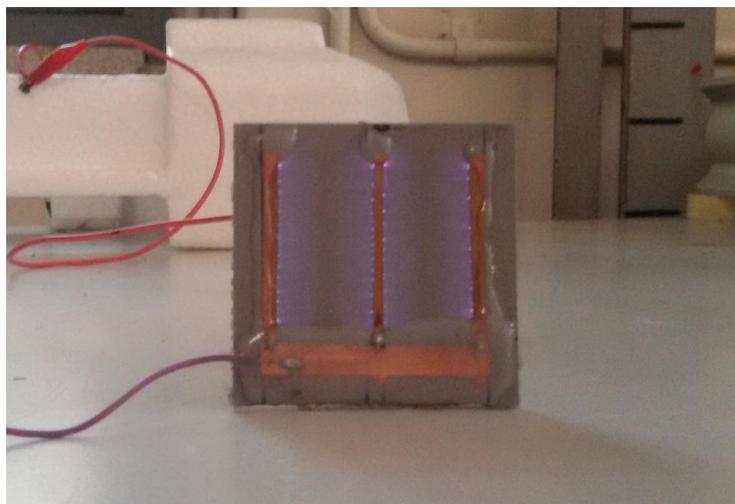


Fig. 4.14 – Scarica superficiale utilizzata nel trattamento indiretto [30].

Il campione posto al di sotto della scarica viene investito dai prodotti del plasma grazie ad un effetto elettrofluidodinamico.

In questo caso è stata scelta un'alimentazione sinusoidale, mostrata in figura 4.15 per il particolare caso di tensione 12.3 kV e frequenza 5.1 kHz.

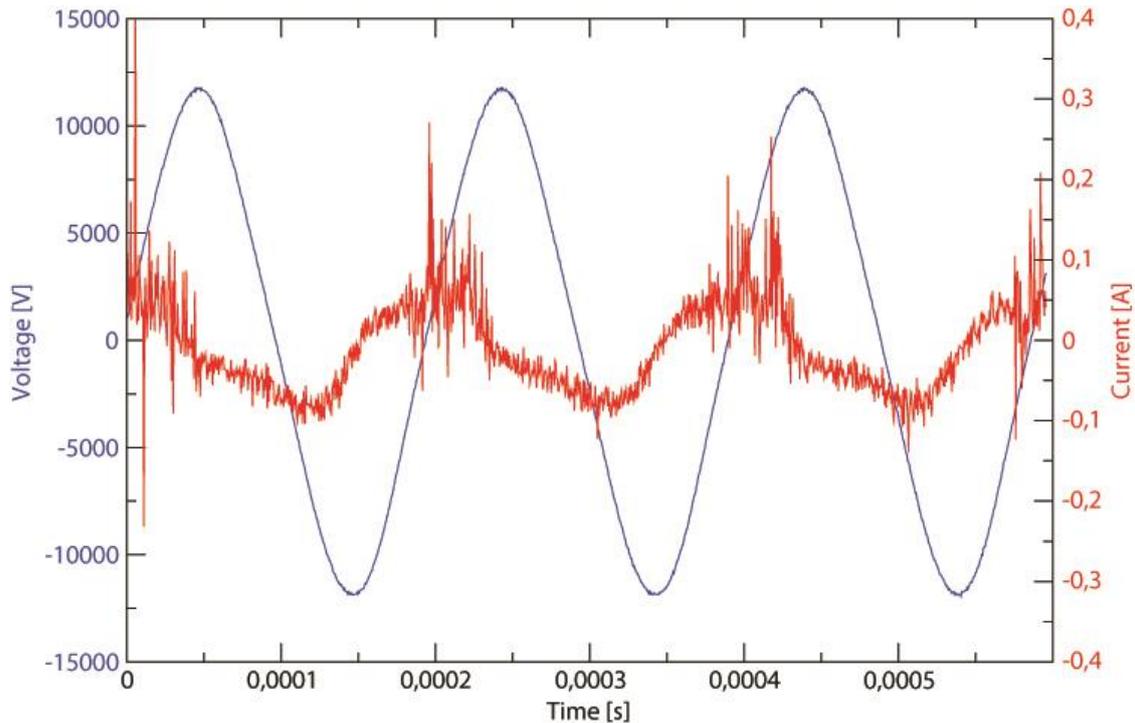


Fig. 4.15 - Andamento temporale di tensione e corrente della scarica sinusoidale.

In entrambe le configurazioni, il sistema è poi racchiuso da una struttura in plexiglass per limitare l'esposizione degli operatori ai prodotti del plasma, data, ad esempio, la grande quantità di ozono generata durante la scarica, che è tossico per gli esseri umani.

4.3.2. Trattamenti su larve di *drosophila* e risultati

Il nostro trattamento è stato effettuato *in-vivo* su larve di *drosophila*, un insetto di piccole dimensioni più comunemente noto come “moscerino della frutta”.

Mentre il trattamento su cellule in coltura permette di ottenere solo alcune indicazioni circa la plausibilità dell'ipotesi che la terapia sia efficace, quello su un animale in cui il tumore cresce all'interno di un organo è senz'altro un modello più affidabile.

La scelta è ricaduta sulla *drosophila* poiché il gruppo di ricerca rappresentato dalla Dottoressa Daniela Grifoni del dipartimento di Farmacia e Biotecnologia dell'Università di Bologna utilizza questo modello per indagare le basi genetiche della formazione e della progressione dei tumori epiteliali.

Il gruppo ha collaborato in questa ricerca e ci ha fornito i campioni.

I trattamenti sono stati svolti in due differenti sessioni e con due obiettivi diversi.

Nella prima abbiamo utilizzato un campione sano, per poter valutare la dose massima che non provoca difetti di sviluppo nei moscerini.

Le larve sono state posizionate una ad una con una pinzetta su un Petri immerse in qualche goccia d'acqua utile ad omogeneizzare la scarica.

I trattamenti diversi sono stati otto: tre diretti, su 20 larve ciascuno, per tempi di 5, 30 e 60 secondi ad una tensione di 11 kV, tre indiretti, sempre su 20 larve, per tempi di 120, 240, 480 secondi a 12.5 kV e 5.2 kHz, e altri due diretti, su 10 larve ciascuno per 5 minuti, a tensioni di 11 kV e 15 kV rispettivamente.

Tutti questi casi non hanno portato danni alle larve, permettendoci di definire la non pericolosità del nostro trattamento.

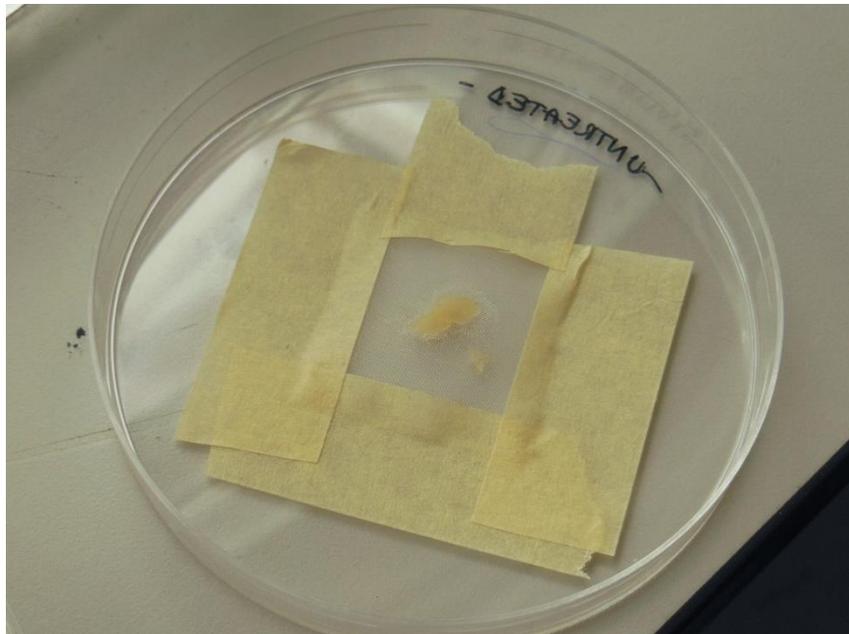


Fig. 4.16 – Larve di *drosophila* con neoplasie allevate in agar nella piastra Petri.

Nella seconda sessione abbiamo trattato, con parametri simili a quelli precedentemente presentati, larve in cui erano stati indotti tumori epiteliali tramite la mutazione di Ras

(V12) e la perdita di funzione di un gene responsabile del mantenimento della polarità amico-basale degli epiteli, denominato *lethal giant larvae* (lgl).

Il modello è stato scelto poiché entrambi i geni sono mutati anche nei tumori umani, ed inoltre questi animali muoiono prima di raggiungere lo stadio di pupa; ci si aspettava quindi qualche recupero o l'allungamento della vita dei campioni trattati.

Le larve sono state questa volta allevate in agar direttamente nel Petri da inserire tra le armature del reattore, in figura 4.16, in modo da limitare le manipolazioni (ad esempio lo spostamento con la pinza) potenzialmente dannose per i campioni.

Anche questo secondo trattamento è stato svolto in qualità di prova, e data l'esiguità del campione non è stato possibile determinare un miglioramento delle condizioni o un allungamento della vita.

Tuttavia, grazie a questi due tentativi, è stato possibile definire i parametri del generatore di plasma e altre importanti condizioni per eseguire, prossimamente, trattamenti su campioni più grandi onde ottenere risultati statisticamente significativi.

Conclusioni

Il trattamento di cellule cancerose mediante plasmi non termici sembra possa diventare in futuro, considerati gli interessanti risultati sia *in-vitro* che *in-vivo*, una possibile terapia in alternativa o in combinazione alle già consolidate chemioterapia o radioterapia.

Tra gli effetti più importanti troviamo la generazione di pori nella membrana cellulare che può permettere una maggior facilità di assorbimento da parte delle cellule tumorali dei farmaci antineoplastici.

Inoltre la riduzione della migrazione cellulare e la deregolazione dell'adesione cellulare risultano molto interessanti in quanto sono processi chiave nel processo di sviluppo della massa tumorale e nel processo di metastatizzazione.

L'aumento dell'attività apoptotica nelle cellule tumorali trattate con plasmi non termici è tra i punti focali della ricerca, dato che le cellule neoplastiche vanno in apoptosi con frequenza meno elevata delle cellule sane.

Lo studio di questa applicazione della *plasma medicine* è però molto complicato, sia per la multidisciplinarietà della materia, sia per la complessità dei fenomeni biochimici che intercorrono durante l'interazione del plasma con le cellule.

Per questo motivo, una descrizione dettagliata dello sviluppo degli effetti non è ancora stata ottenuta, e ci si è limitati ad alcune supposizioni basate sui risultati positivi.

Un'altra difficoltà è data dalla varietà di sorgenti di plasma utilizzate per i trattamenti, ciascuna con una chimica diversa dalle altre, che comporta una frammentazione notevole dei risultati.

Infine le cellule tumorali sono diverse le une dalle altre e reagiscono al plasma anche in maniera completamente differente; un caso interessante è l'effetto del plasma molto pronunciato sulle cellule di glioblastoma mentre trascurabile sul carcinoma tiroideo, mostrato nella ricerca di Kaushik *et al.*

Anche *in-vivo* la ricerca si è rivelata proficua nonostante i trattamenti di questo tipo siano stati effettuati solamente negli ultimi anni, risultando nella maggior parte dei casi in una diminuzione della massa tumorale dei topi e conseguente aumento della sopravvivenza dei campioni.

La ricerca in questo campo sta procedendo velocemente, e sono sempre più numerosi i gruppi di ricerca che trattano con plasma non termico cellule tumorali o campioni con neoplasie.

Non è così da escludere la possibilità che in un futuro possa diventare una terapia efficace per il trattamento di alcuni tipi di cancro.

Bibliografia

- [1] Y. P. Raizer, *Gas Discharge Physics*, New York: Springer-Verlag, 1991
- [2] A. R. Hoskinson, *Measurements and simulations of surface dielectric barrier discharges used as plasma actuators*, NASA/CR, 2012
- [3] B. Eliasson, U. Kogelschatz, *Modeling and applications of silent discharge plasmas*, IEEE Trans. Plasma Sci., 1991
- [4] <https://www.quora.com/A-gas-in-a-discharge-tube-illuminates-What-would-happen-if-a-solid-material-was-present-in-the-tube-as-well>
- [5] J. R. Roth, *Industrial plasma processing vol. 2. Applications to nonthermal plasma processing*, Institute of physics publishing, 2001
- [6] G. Scarduelli, *Diagnostica di processi molecolari in scariche a pressione atmosferica*
- [7] A. Chirokov, A. Gutsol, A. Fridman, *Atmospheric pressure plasma of dielectric barrier discharges*, Pure Appl. Chem., 2005
- [8] A. Fridman, A. Chirokov, A. Gutsol, *Non-thermal atmospheric pressure discharges*, J. Phys. D: Appl. Phys., 2005
- [9] M. Taglioli, *Progettazione, caratterizzazione e confronto prestazionale di sorgenti di plasma DBD per inattivazione di microrganismi in soluzione acquosa*, 2012/2013
- [10] H. E. Wagner, R. Brandenburg, K. V. Kozlov, A. Sonnenfeld, P. Michel, J. F. Behnke, *The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment*, Vacuum, 2003

- [11] B. Eliasson, U. Kogelschatz, *Nonequilibrium volume plasma chemical processing*, IEEE Trans. Plasma Sci., 1991
- [12] T. C. Manley, Tans. Electrochem. Soc., 1943
- [13] M. Laroussi, *Low-Temperature Plasma Jet for Biomedical Applications: A Review*, IEEE Trans. Plasma Sci., 2015
- [14] M. Laroussi, T. Akan, *Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review*, Plasma Process. Polym., 2007
- [15] X. Lu, M. Laroussi, V. Puech, *On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets*, Plasma Sources Science and Technology, 2012
- [16] J. L. Walsh, M. G. Kong, Appl. Phys. Lett. 93 111501, 2008
- [17] S. S. Block, *Sterilization*, Encyclopedia of Microbiology vol. 4, Academic Press, San Diego, 1992
- [18] M. Laroussi, *Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art*, Plasma Processes and Polymers, 2005
- [19] R. Tiede, J. Hirschberg, W. Viöl, S. Emmert, *A μ s-pulsed dielectric barrier discharge source: physical characterization and biological effects on human skin fibroblasts*, Plasma Processes and Polymers, 2015
- [20] F. A. Bettleheim, J. March, *Introduction to general, organic, and biochemistry*, 4th edition, 1995
- [21] V. T. DeVita, S. Hellman, S. A. Rosenberg, *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th edition

- [22] C. Sherr, *Principles of tumor suppression*, Cell vol. 116, 2004
- [23] G. Fridman *et al.*, *Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behaviour in Melanoma skin cancer cell lines*, Plasma chem plasma process, 2007
- [24] N. K. Kaushik, N. Kaushik, D. Park, E. H. Choi, *Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment*, 2014
- [25] M. Keidar *et al.*, *Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy*, British journal of cancer, 2011
- [26] J. Schlegel, J. Köritzer, V. Boxhammer, *Plasma in cancer treatment*, Clinical plasma medicine, 2013
- [27] M. Vandamme *et al.*, *ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma*, International journal of cancer, 2011
- [28] M. Gherardi, E. Turrini, R. Laurita, E. De Gianni, L. Ferruzzi, A. Liguori, A. Stancapiano, V. Colombo, C. Fimognari, *Atmospheric non-equilibrium plasma promotes cell death and cell-cycle arrest in a lymphoma cell line*, Plasma process. Polym., 2015
- [29] O. Volotskova, T. S. Hawley, M. A. Stepp, M. Keidar, *Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma*, Scientific reports, 2012
- [30] F. Mirandola, *Scarica a barriera dielettrica superficiale per la disinfezione dell'acqua mediante trattamento indiretto*, 2016