

“Plasma medicine”: introduzione alle applicazioni biomediche dei plasmi

prof. Emilio Martines

Dipartimento di Fisica “G. Occhialini”
Università degli Studi di Milano-Bicocca

emilio.martines@unimib.it

17 gennaio 2023

Cos'è la «plasma medicine»?

Il termine «plasma medicine» si usa per indicare l'**applicazione di un plasma sul (o nel) corpo umano (o animale) allo scopo di ottenere effetti terapeutici basati sull'interazione del plasma stesso con i tessuti viventi.**

Le tecnologie che usano **plasmi termici**, (ossia plasmi in cui elettroni, ioni e gas neutro sono a temperature simili), riscaldando i tessuti, per applicazioni come il taglio e la cauterizzazione, sono tipicamente esclusi dalla definizione.

La definizione può essere allargata ad includere gli usi terapeutici di oggetti o dispositivi trattati con il plasma. In particolare, si applica ai «**plasma treated liquids**» (acqua o altro), che diventano chimicamente «attivi» e capaci di indurre effetti terapeutici.

Esiste poi la branca degli effetti del plasma sui vegetali, tipicamente accelerazione di germinazione e crescita e uccisione di patogeni, denominata «**plasma agriculture**».

Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials

E Stoffels, A J Flikweert, W W Stoffels and G M W Kroesen

Department of Physics, Eindhoven University of Technology, PO Box 513, 5600 MB Eindhoven, The Netherlands

E-mail: e.stoffels.adamowicz@tue.nl

Received 19 February 2002, in final form 31 May 2002

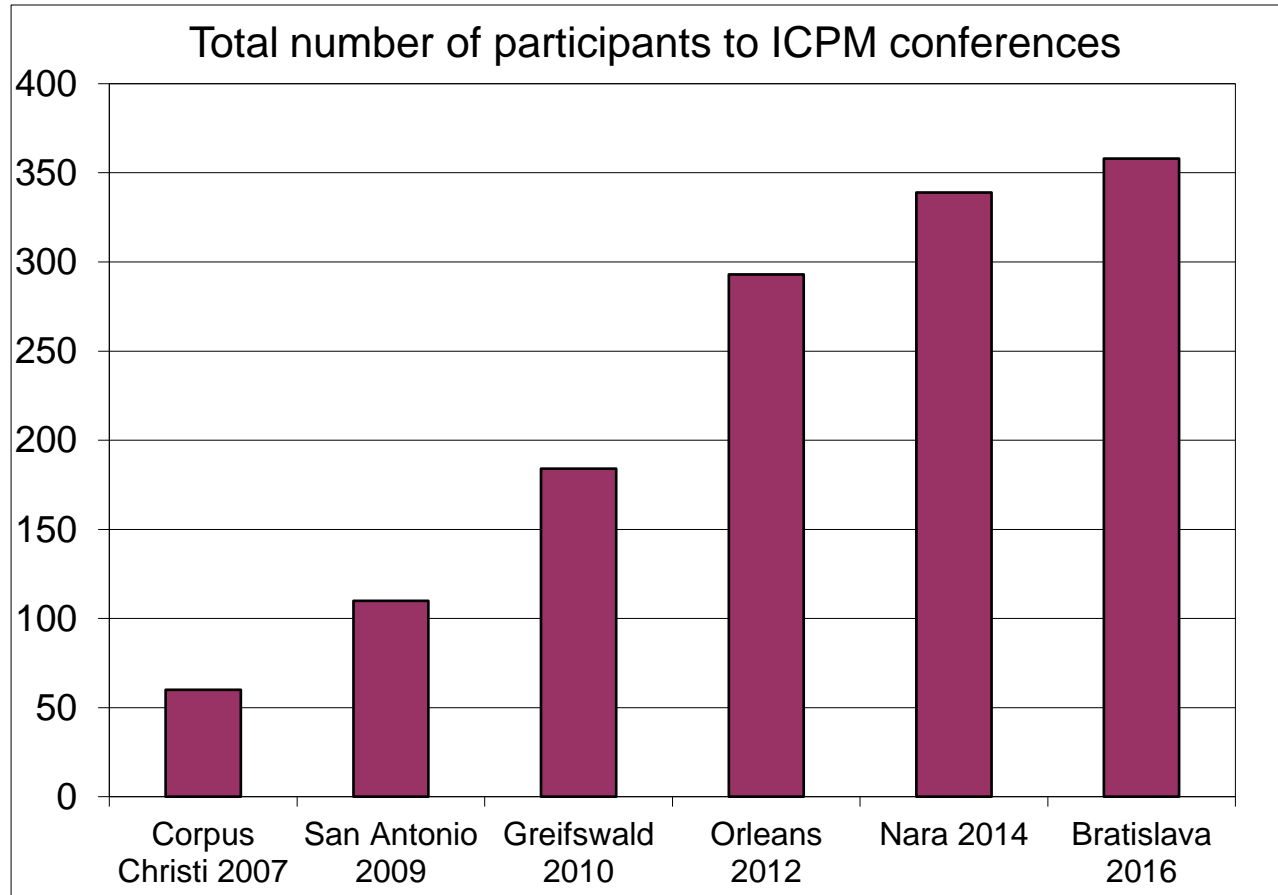
Published 30 August 2002

Online at stacks.iop.org/PSST/11/383

In this work we aim at producing a less aggressive plasma source, which can be applied directly on organic materials and living tissues. It is desired that the plasma action be refined: non-contact, strictly local and with minimum penetration depth. Possible applications will be high-precision removal of unwanted tissue/cells and cleaning of decayed matter in dental cavities, prior to filling. The latter could provide a new, attractive technique in dentistry, which would replace painful and destructive drilling. In parallel, we conduct studies on material removal from bone samples using a conventional etcher [14], in order to establish the capabilities of non-thermal plasmas to etch selectively organic matter in a strongly mineralized matrix. However, the main achievement of plasma treatment would be cell modification rather than plain destruction. Therefore, we plan to explore the possibilities of influencing cells in a well-controlled way, e.g. of inducing apoptosis in cancer cells.



Il numero di partecipanti alla International Conference of Plasma Medicine (ICPM) è andato costantemente crescendo dalla prima edizione del 2007.



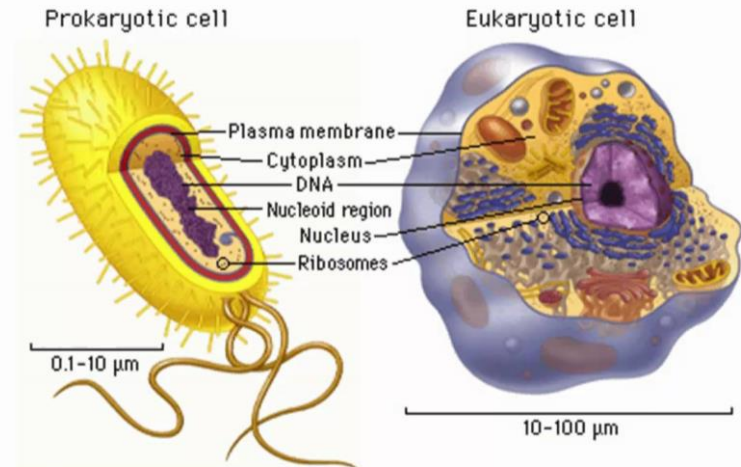
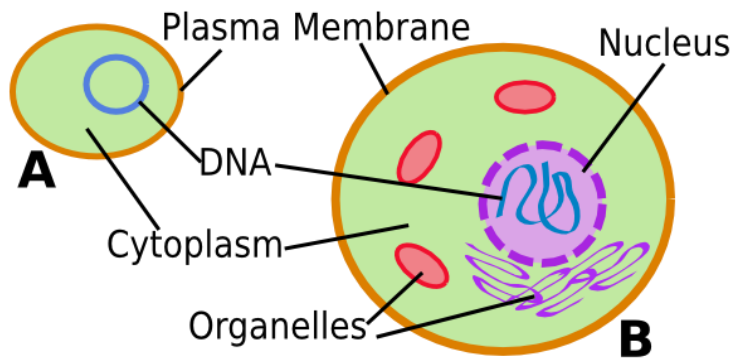
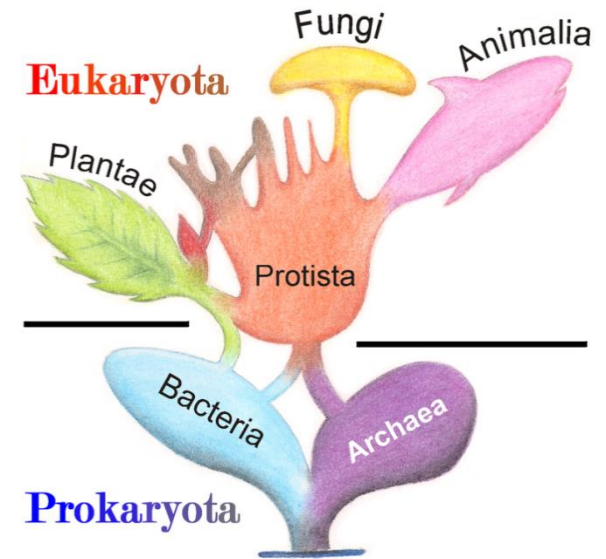
Un breve richiamo: la cellula

Le cellule si dividono in due grandi gruppi:

- Cellule procariotiche (batteri...)
- Cellule eucariotiche (cellule di piante ed animali)

Le cellule procariotiche sono piccole e relativamente semplici, circondate da una membrana e da una parete cellulare, con un filamento circolare di DNA contenente i loro geni.

Le cellule eucariotiche sono più grandi e complesse, dotate di un nucleo contenente il DNA e di altri organelli, come i mitocondri, che sono le "centrali elettriche" della cellula.



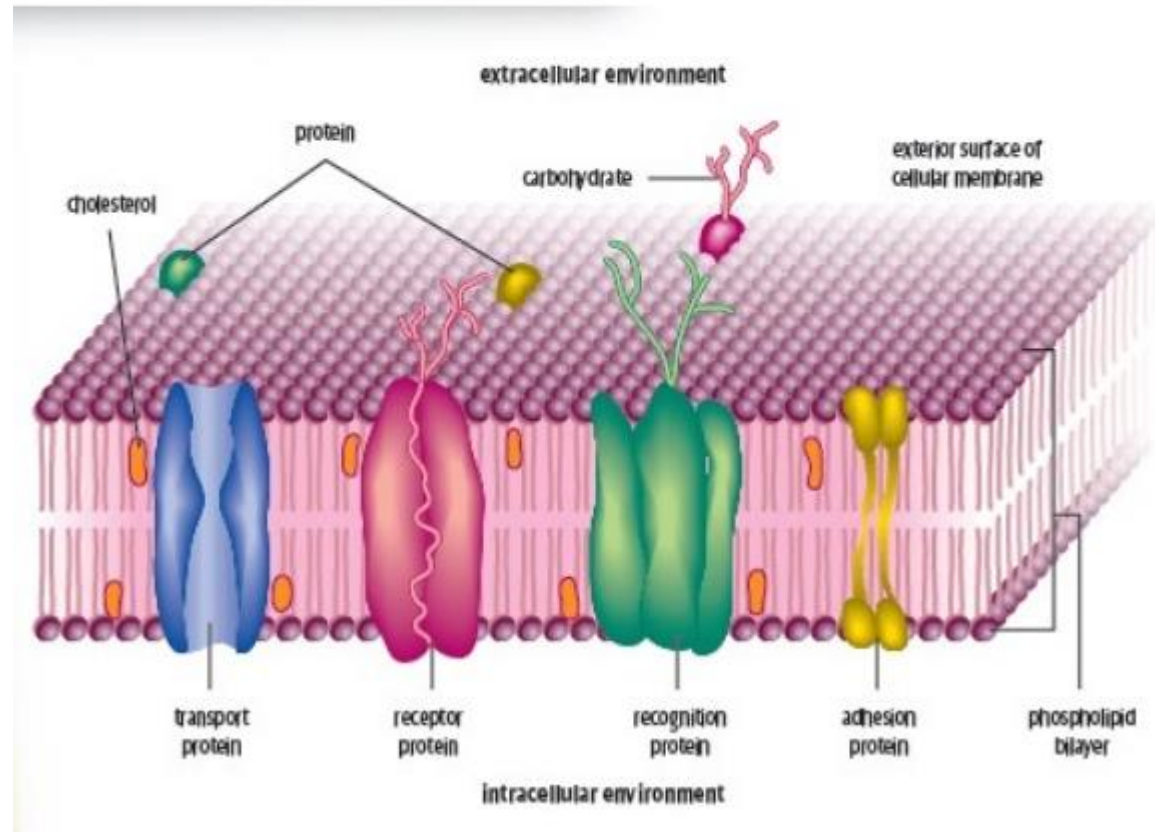
Il confine delle cellule eucariotiche è costituito dalla membrana, composta da lipidi e proteine.

La membrana è formata da un doppio strato di fosfolipidi.

Le proteine sono incorporate in questo strato e svolgono diversi ruoli:

- canali per la diffusione delle molecole dall'interno all'esterno e viceversa;
- recettori per il rilevamento dell'ambiente esterno;
- comunicazione intercellulare;
- adesione delle cellule.

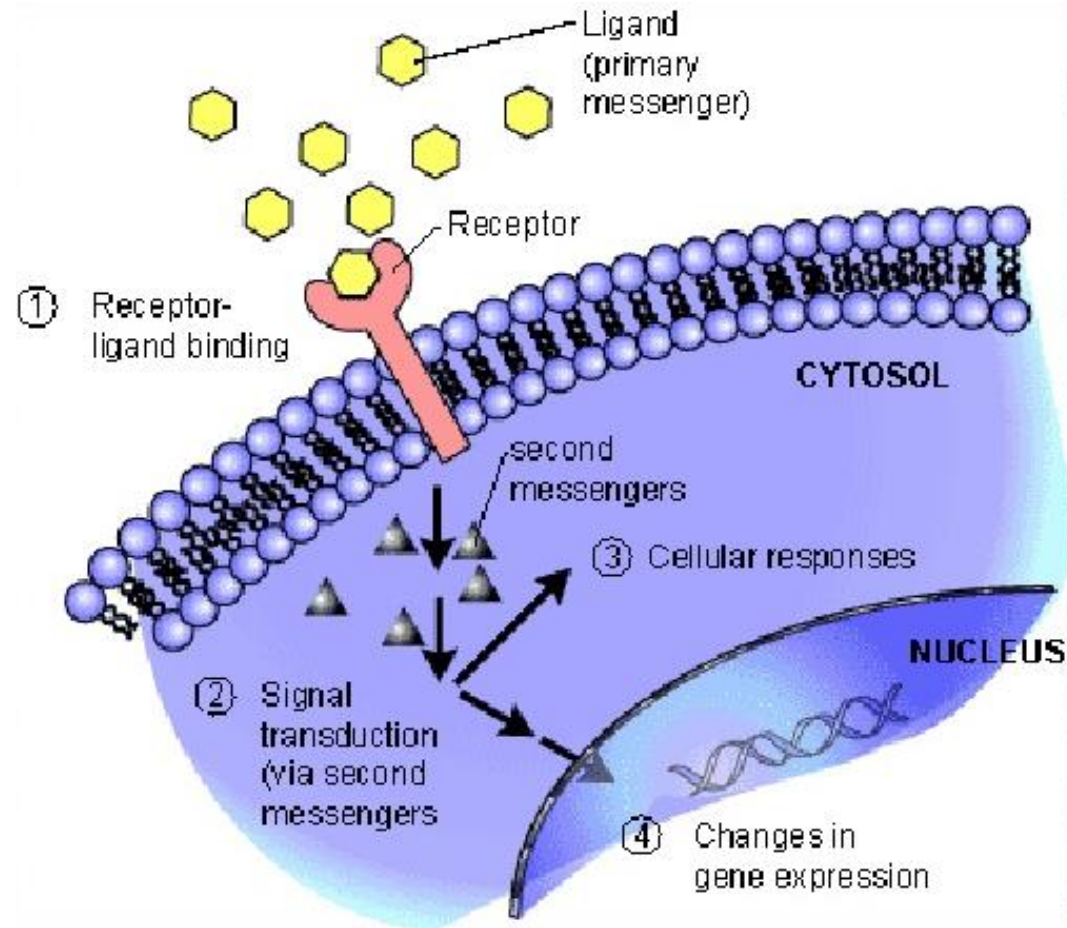
The Cell Membrane and Transport Systems



I **recettori** sono proteine incorporate nella membrana cellulare che interagiscono con le molecole dell'ambiente extracellulare.

Una molecola che si lega a un recettore è chiamata **ligando** e può essere un peptide (come un neurotrasmettitore), un ormone, un farmaco o una tossina.

Quando si verifica tale legame, il recettore avvia una **risposta cellulare**, ossia una **sequenza di processi** all'interno della cellula, che possono comportare cambiamenti nell'espressione genica.



Che azione compie il plasma?

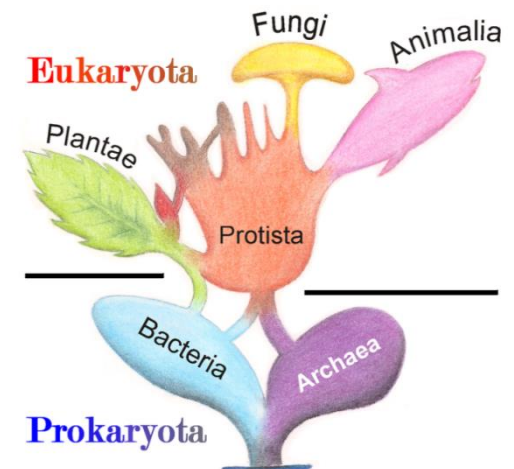
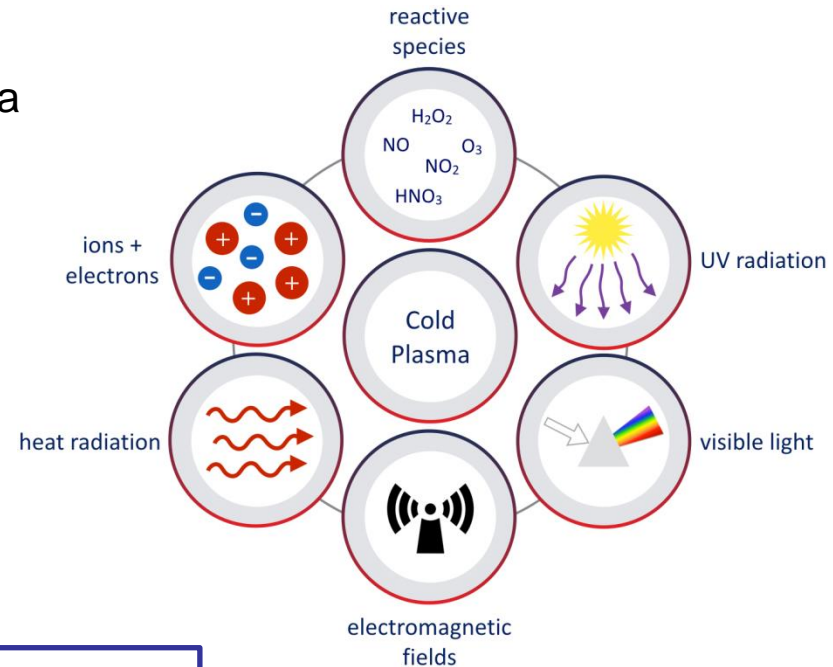
La «plasma medicine» si occupa dell'interazione tra un plasma di bassa temperatura (anche detto plasma freddo) prodotto a pressione atmosferica con cellule procariotiche ed eucariotiche.

Possibili agenti dell'interazione:

- specie chimiche reattive
- fotoni (in particolare la radiazione UV)
- campo elettromagnetico
- particelle cariche (ioni ed elettroni)

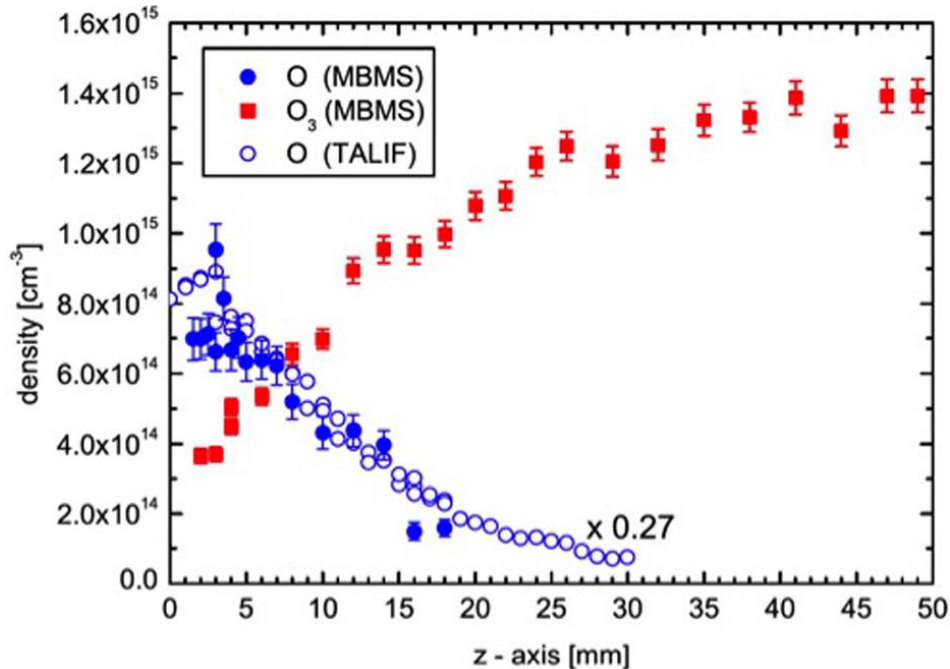
Il punto di vista oggi prevalente è che il più importante agente attivo è costituito dalle specie chimiche reattive, formate dall'azione del plasma, in particolare le **specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto** (ROS/RNS, dette anche RONS)

La formazione nel plasma di specie chimiche reattive è dovuta alla presenza di una popolazione di elettroni di alta temperatura, che dissociano le molecole in esso presenti.



Esempi di RONS prodotte nel plasma sono:

- ozono (O_3)
- ossigeno e azoto atomici (O, N)
- radicale ossidrilico (OH)
- ossidi di azoto (NO , NO_2 and N_2O)
- perossido di idrogeno (H_2O_2)
- ione superossido (O_2^-)



Measured density of O and O_3 as a function of distance from the tip of a He/ O_2 plasma jet. MBMS: molecular beam mass spectrometry. TALIF: two-photon absorption laser-induced fluorescence,

Ellerwig et al., New J. Phys. **12**, 013021 (2010).

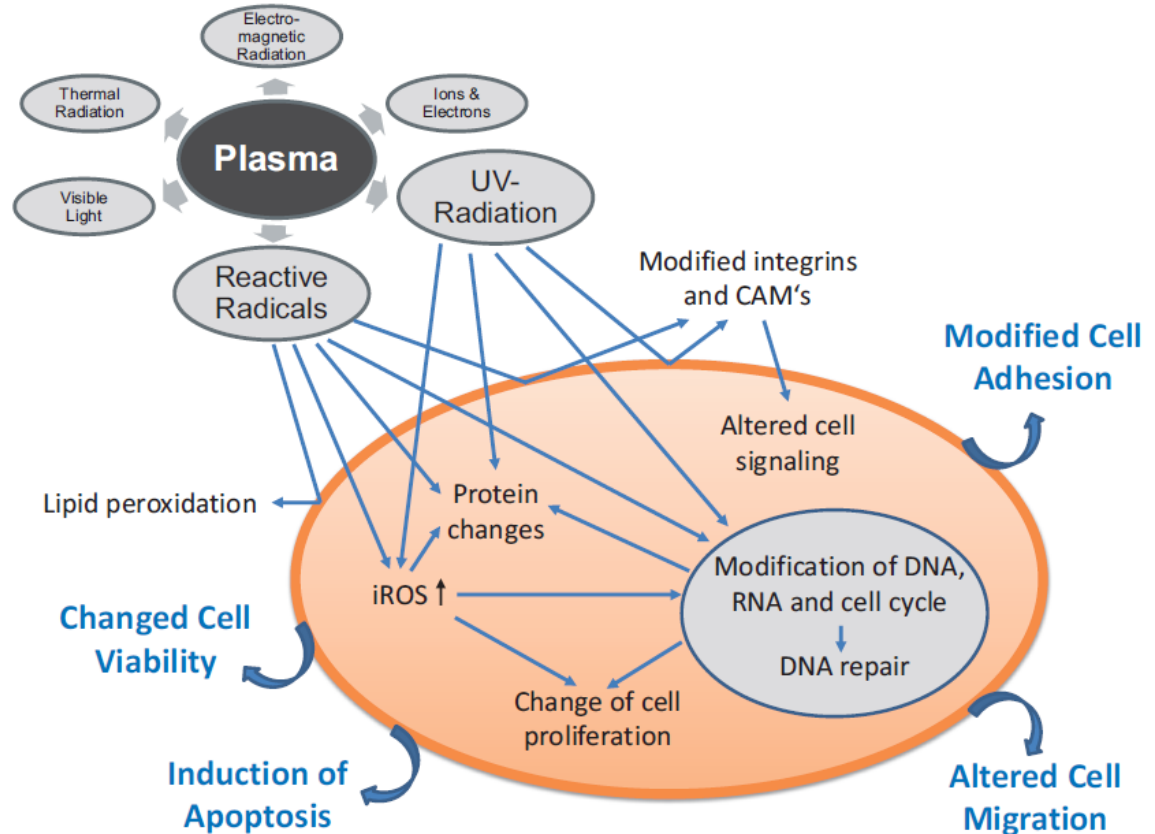
Le specie chimiche prodotte nel plasma interagiscono con i recettori posti sulla membrana cellulare, innescando vari processi cellulari.

Questa azione è spesso mediata dalla variazione del livello di RONS endogeni.

A seconda della «dose» di plasma, gli effetti possono includere:

- distacco e migrazione
- proliferazione
- apoptosi (morte cellulare)

Nel caso dei batteri, lo stress ossidativo conduce alla morte.



L'argomento delle interazioni biochimiche dei RONS è talvolta chiamato **biochimica redox** (di ossidoriduzione).

Originariamente si sospettava che i RONS fossero *solo* dannosi e i composti noti come "antiossidanti" erano ritenuti terapeutici per contrastare livelli eccessivi di "stress ossidativo" da specie reattive come l'ossigeno e altri tipi di radicali.

La ben nota **teoria dell'invecchiamento basata sui radicali liberi** postulava che il processo di invecchiamento fosse dovuto principalmente ai danni accumulati dai radicali, che sono il prodotto ineluttabile del metabolismo.

Oggi si è capito che questa teoria è troppo semplicistica e che **i RONS sono protagonisti della normale fisiologia** e anche di terapie come quelle antimicrobiche e antitumorali.

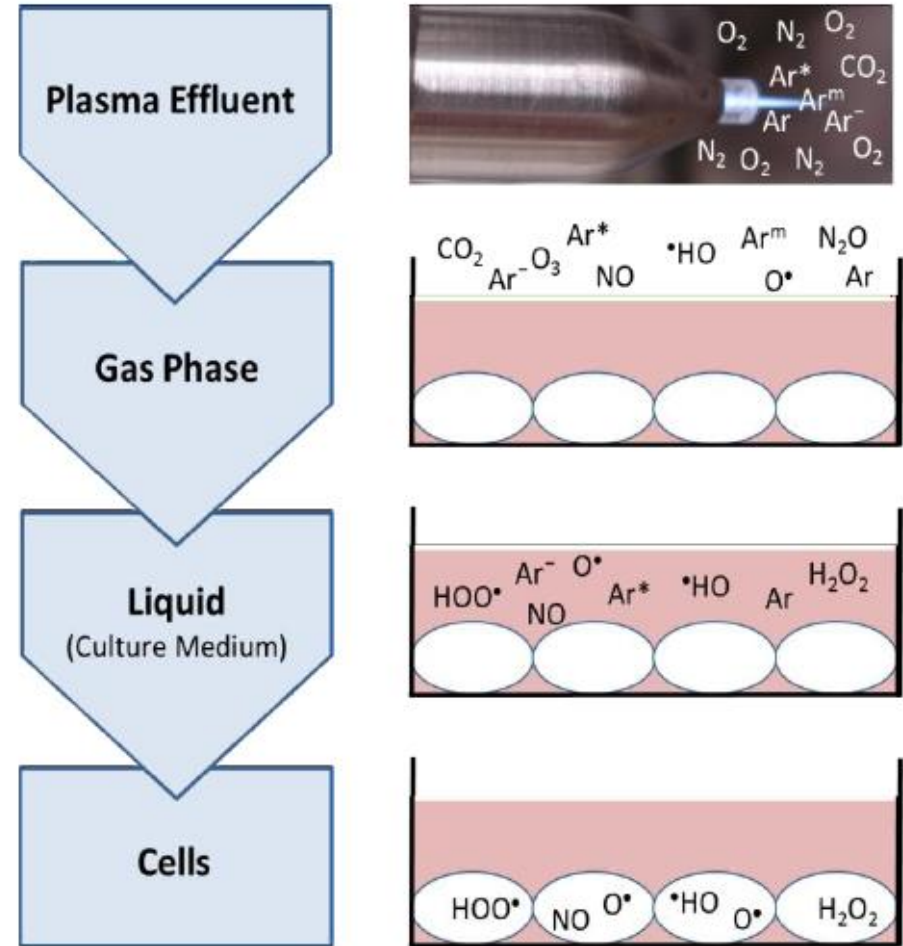
In particolare, esiste un bilancio intracellulare di queste specie che deriva dalla loro produzione connessa con il normale funzionamento della cellula (ad esempio: respirazione cellulare) e la loro eliminazione. L'azione del plasma è in grado di alterare questo bilancio.

Ruolo della fase liquida

Sia negli esperimenti in vitro che in vivo, le cellule sono a contatto con un mezzo liquido.

L'effetto del plasma è quindi legato al passaggio delle specie chimiche dalla fase gassosa a quella liquida, dove avvengono ulteriori reazioni chimiche.

Una branca della «plasma medicine» studia la composizione e gli effetti dalla «**plasma-activated water**» (PAW) e del «**plasma-activated medium**» (PAM), o più in generale dei «**plasma-activated liquids**» (PAL).



Principali caratteristiche dei plasmi utilizzati

Richieste principali:

- pressione atmosferica;
- basso carico termico sul substrato trattato.

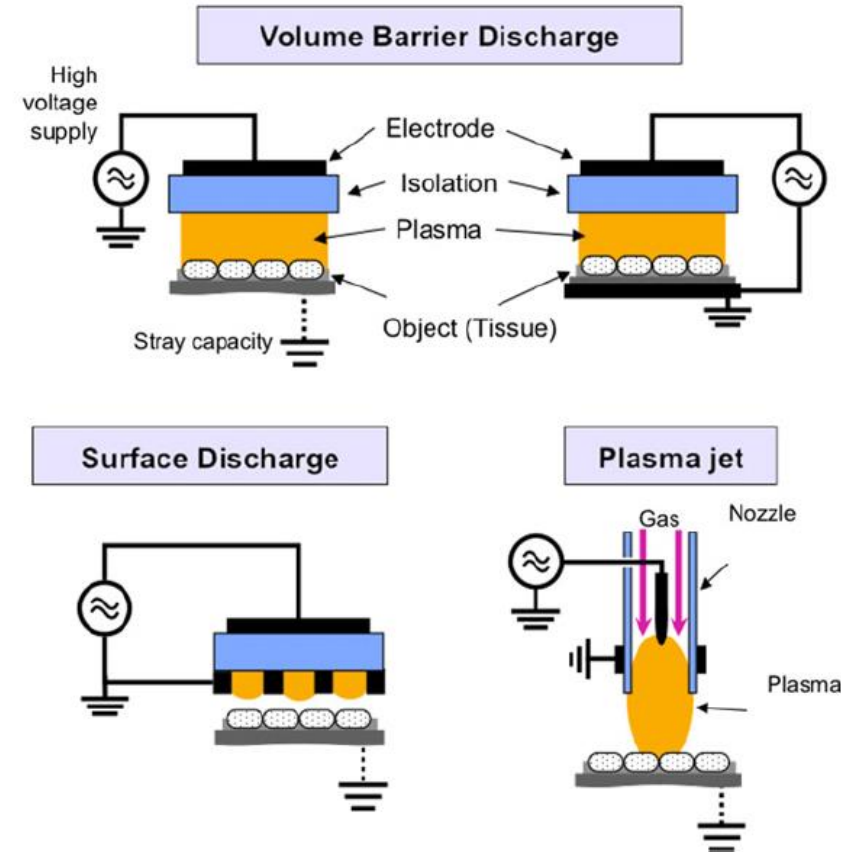
A causa dell'alta tensione richiesta per innescare il plasma a pressione atmosferica (tipicamente svariati kV), è necessario un metodo per estinguere la corrente subito dopo l'innesco, così da limitare il trasferimento di potenza.

Le principali strategie sono:

- la scarica a barriera dielettrica (DBD);
- l'uso di alta frequenza (radiofrequenza o microonde).

Gas utilizzati:

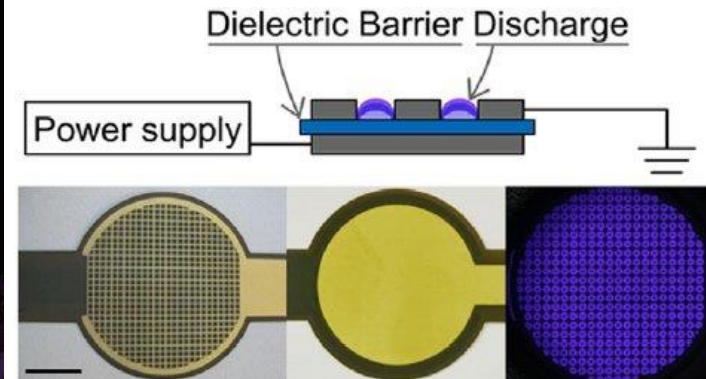
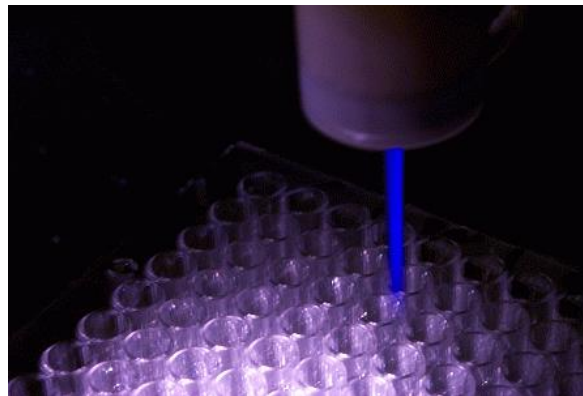
- Gas nobili (He, Ar) con l'aggiunta di piccole quantità di O₂, H₂O, N₂, aria;
- Aria.



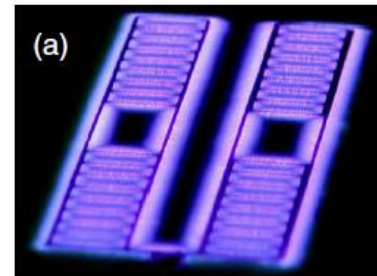
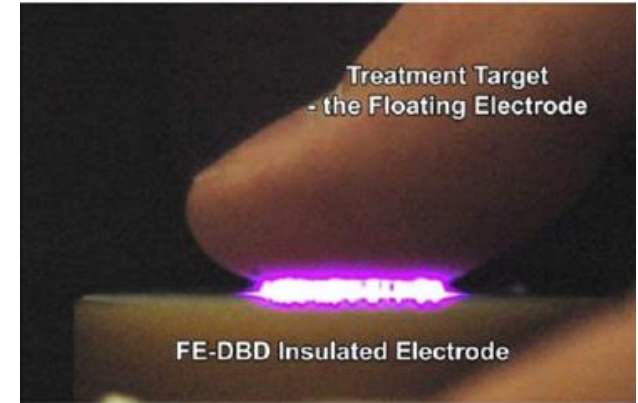
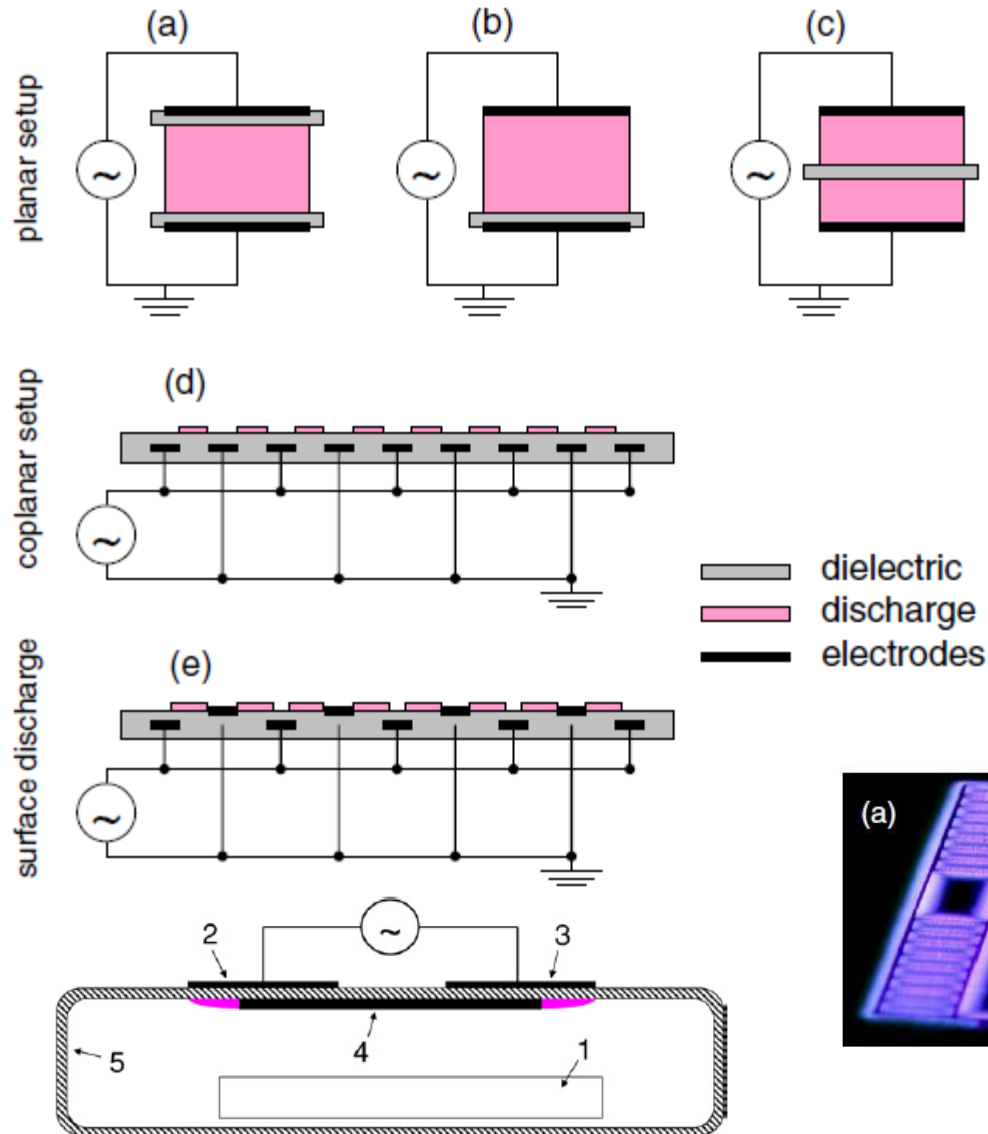
Esempi di sorgenti di plasma per usi medici

Potenza elettrica: tipicamente inferiore a 10 W.

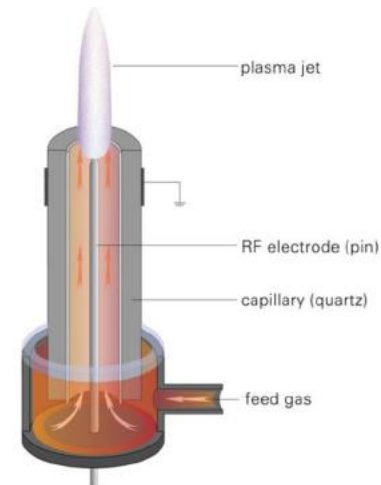
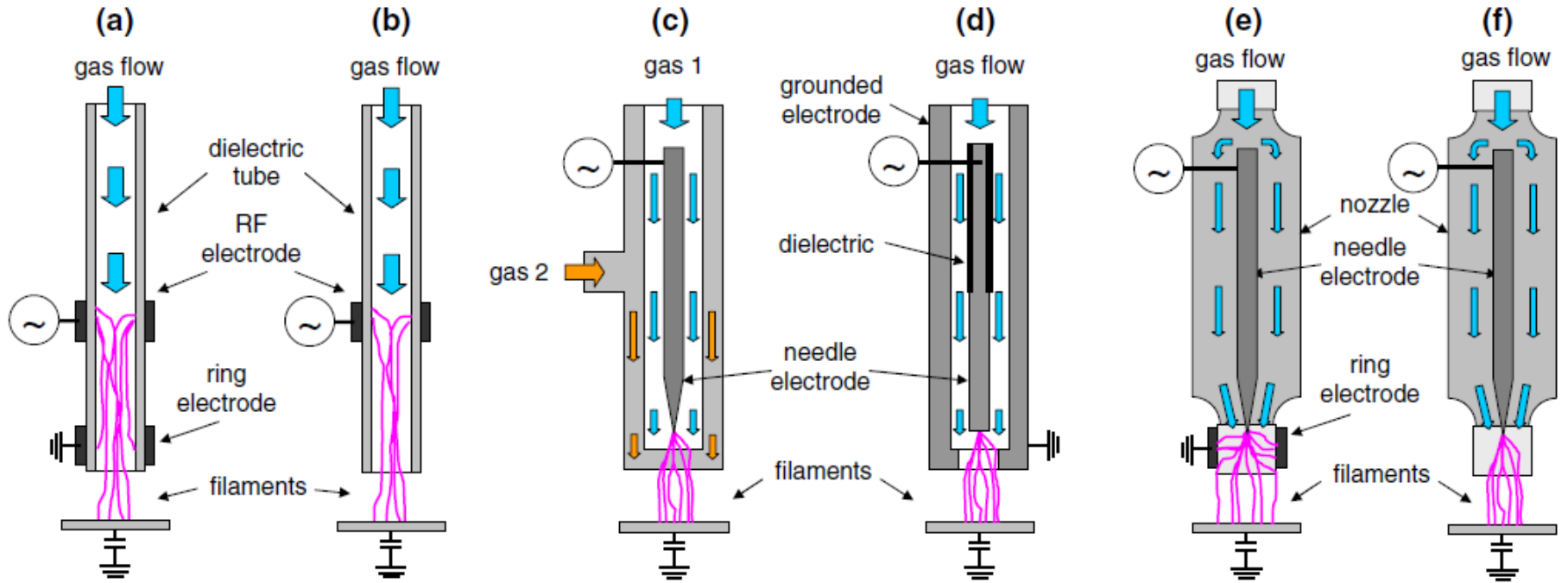
Temperatura del gas: minore o uguale a 37°.

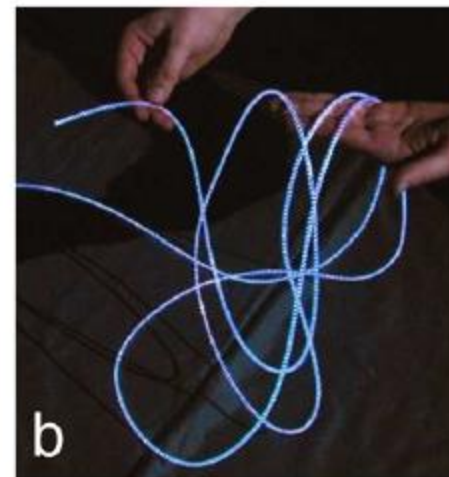
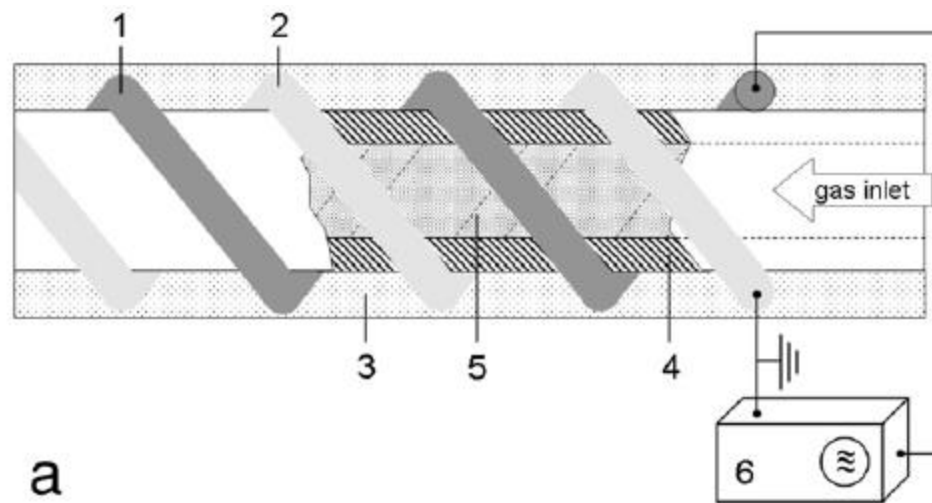


Scarica a barriera dielettrica (DBD)

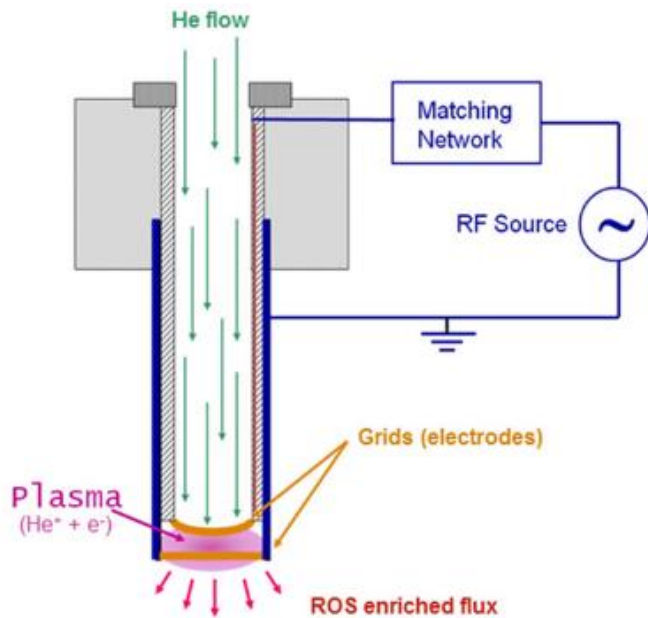


Plasma jet (DBD o RF)

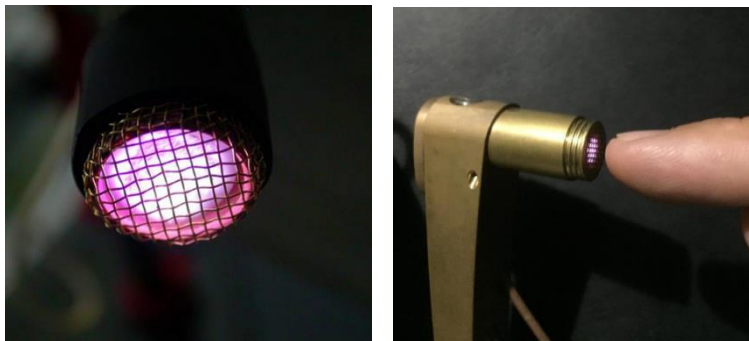




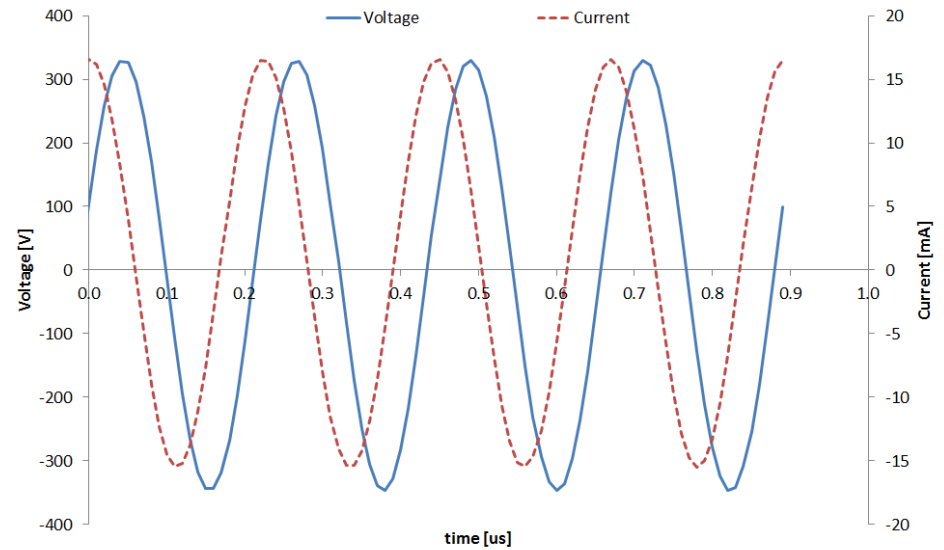
La sorgente RF di Padova (ora a Unimib)



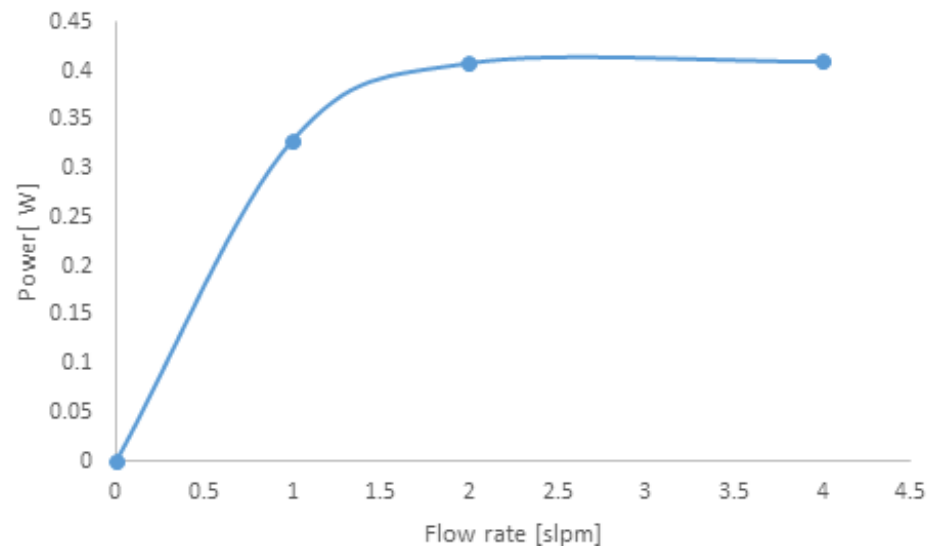
- Tubo di dielettrico chiuso da una griglia di ottone, contenuto in un secondo tubo di rame, collegato a terra, chiuso da una seconda griglia.
- Distanza fra le griglie: ~ 1 mm.
- Tensione sinusoidale a frequenza di 4.5 MHz con valore tipico di $900 V_{pp}$ applicata alla griglia interna.
- L'elio è iniettato nel tubo interno e viene ionizzato nello spazio fra le due griglie.
- Il plasma induce la formazione di stati metastabili dell'elio e di specie chimiche reattive derivanti dall'aria che si mescola al flusso di elio.
- Potenza dissipata: 0.4 W. Flusso: 1.5 l/min



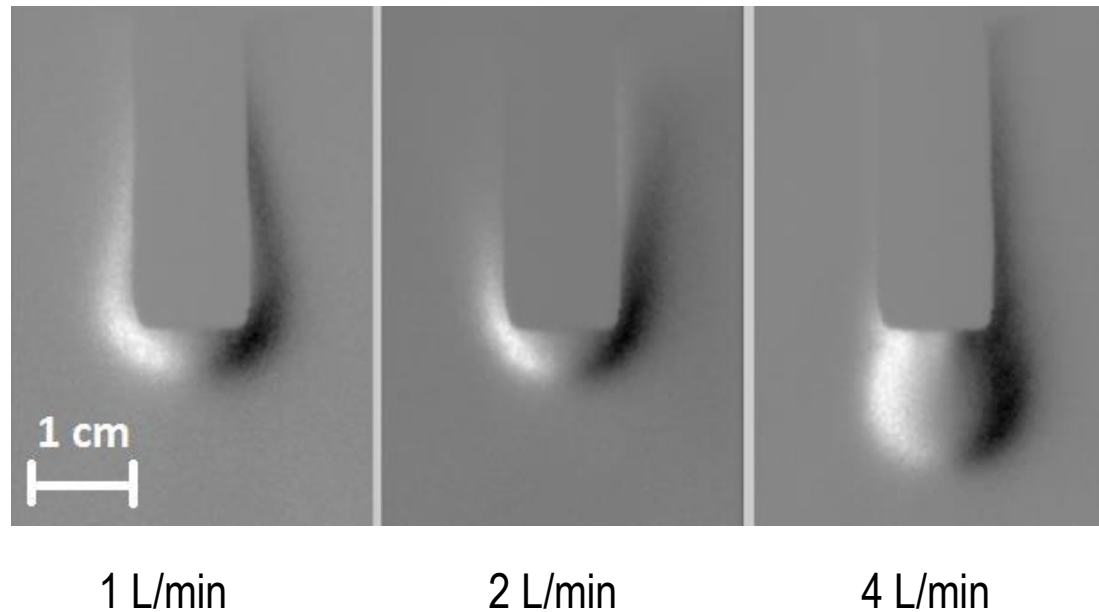
La tensione e la corrente sono state misurate tenendo conto del ritardo di propagazione del cavo.



La potenza media dissipata nel plasma risulta essere di **300÷400 mW**, a seconda della portata del gas.



La tecnica Schlieren è un metodo di visualizzazione delle disomogeneità ottiche dei campi di moto dei fluidi e sfrutta la variazione dell'indice di rifrazione conseguenza di gradienti di densità.



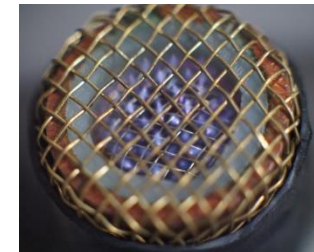
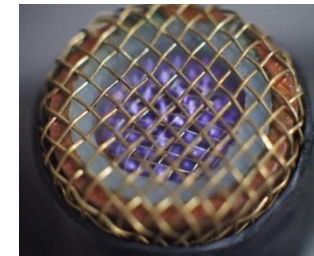
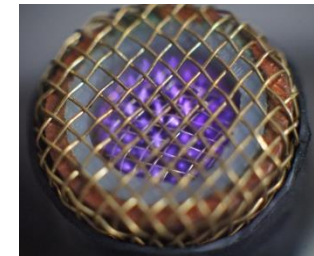
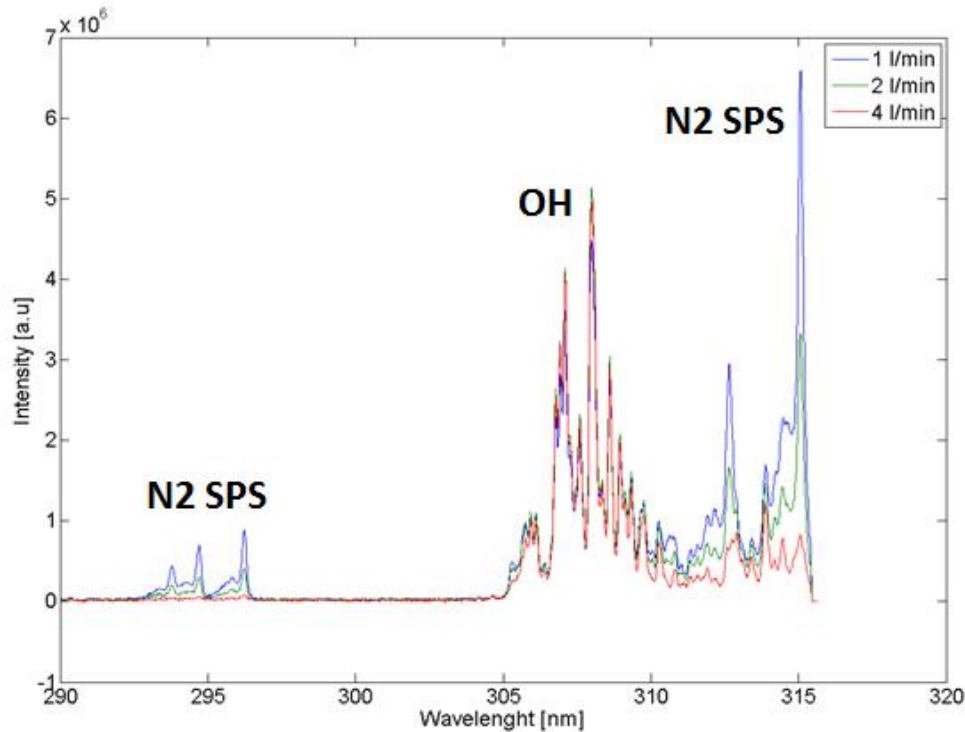
Osservazioni:

- non si notano differenze nella dinamica del gas con e senza plasma;
- il getto di elio si propaga verso il basso fino a 1,5 cm (a 4 L/min).

Lo spettro di emissione del plasma è dominato dalle righe di He, N₂ e OH.

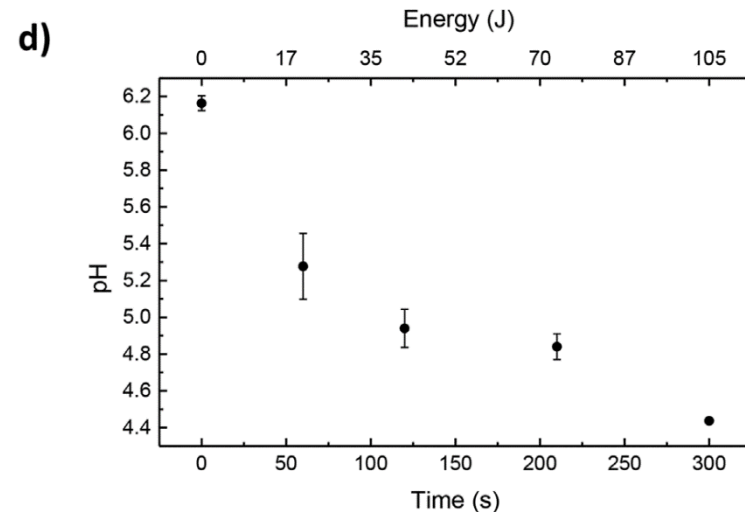
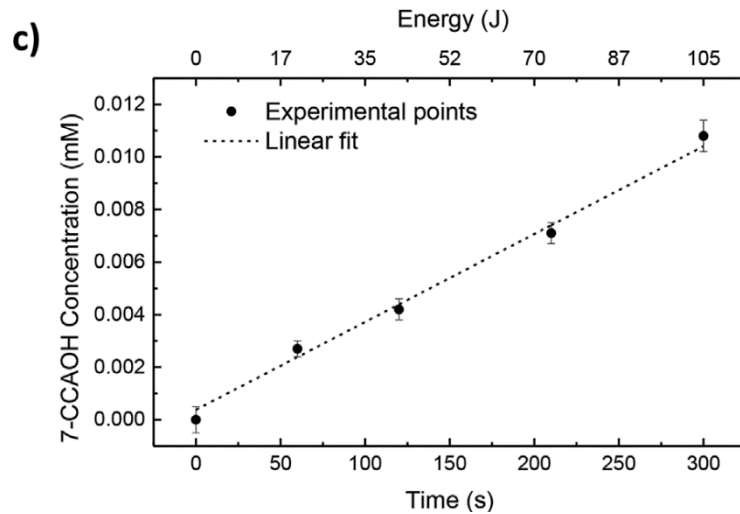
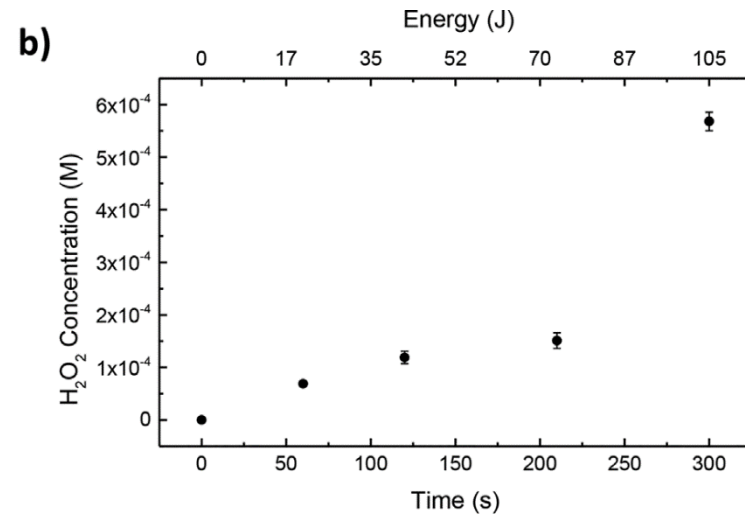
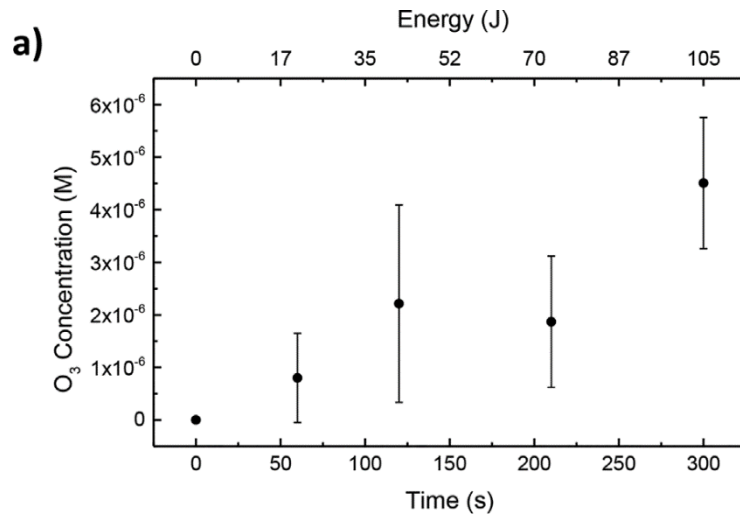
Aumentando la portata del gas, la frazione di N₂ decresce, mentre la quantità di OH rimane imperturbata.

La quantità più elevata di N₂ è responsabile per il colore viola a basse portate.



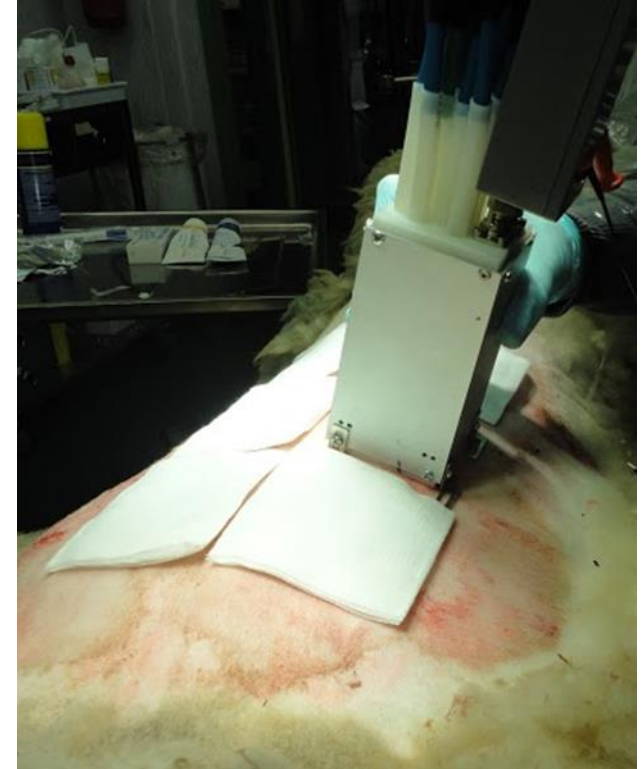
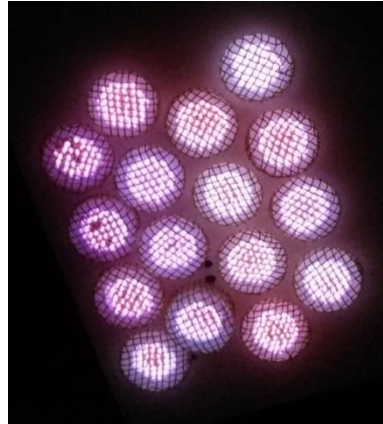
Non è stato rilevato ozono.

Risultati ottenuti trattando un volume noto di acqua demineralizzata.



Schema a tubi multipli

Per trattare ferite di 4x4 cm, è stata costruita una matrice di 16 sorgenti singole.



L'ambiente di lavoro (stalla) e l'applicazione su animali viventi (sotto terapia antidolorifica!) hanno costituito una sfida relativamente all'affidabilità e robustezza della sorgente.

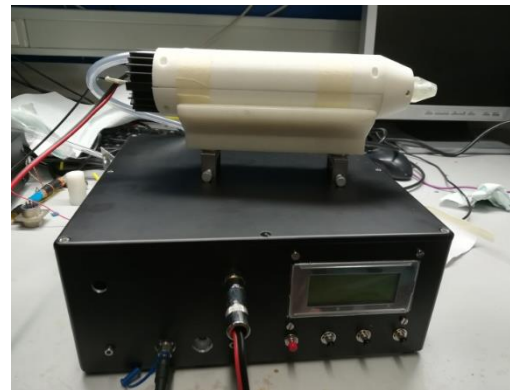
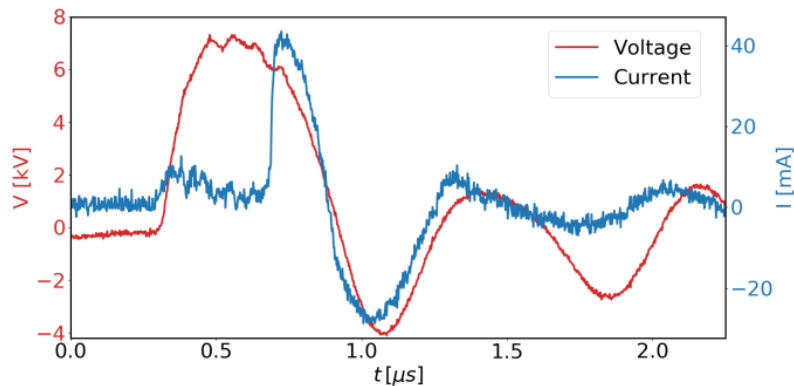
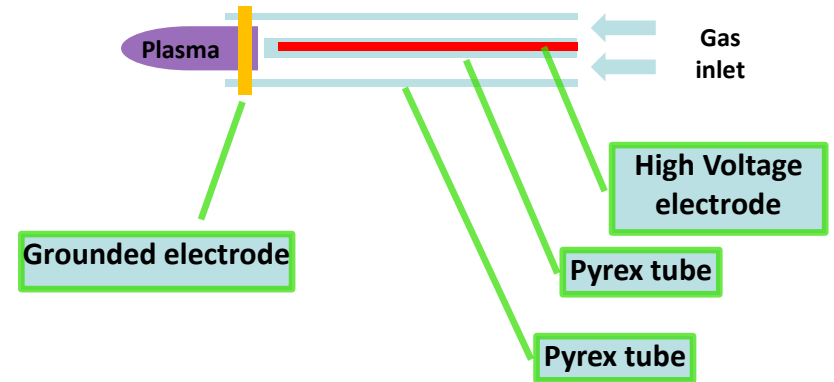
La sorgente DBD-jet di Padova (ora a Unimib)

Alimentatore controllato da un Arduino.

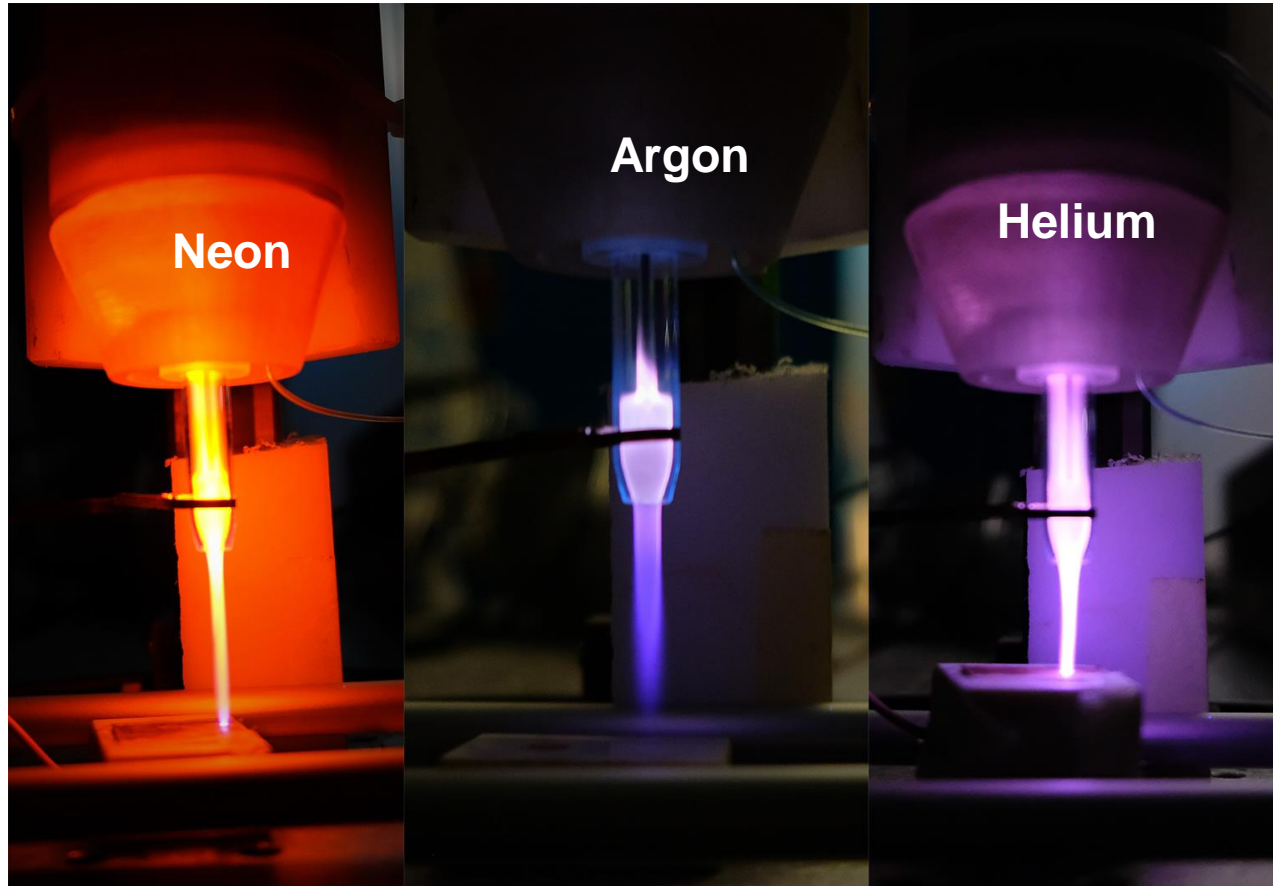
Tensione applicata: 6 - 10 kV (impulsata)

Frequenza degli impulsi: 1 - 40 kHz

Corrente media verso il substrato: 1 mA

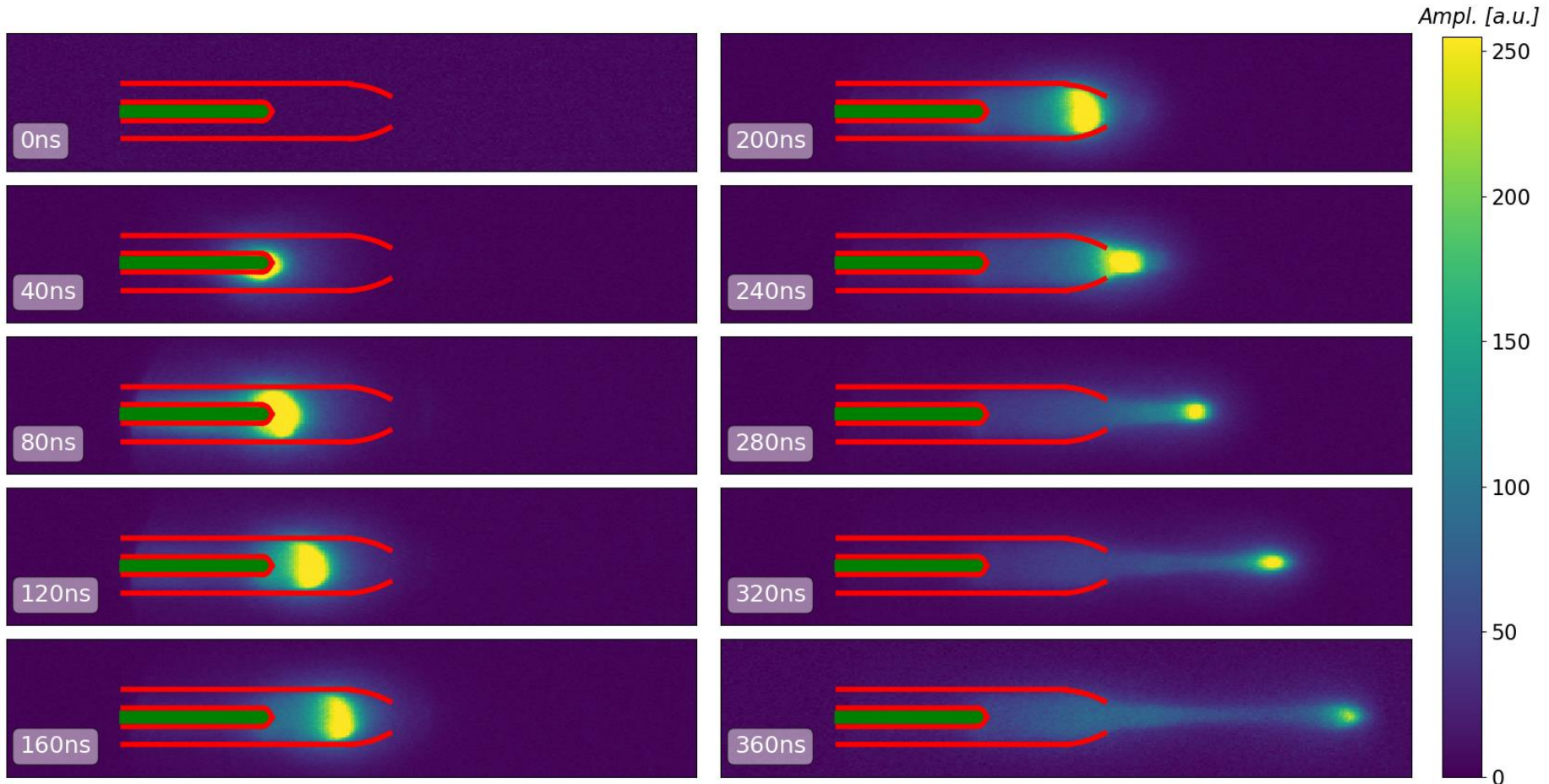


Operazione con diversi gas

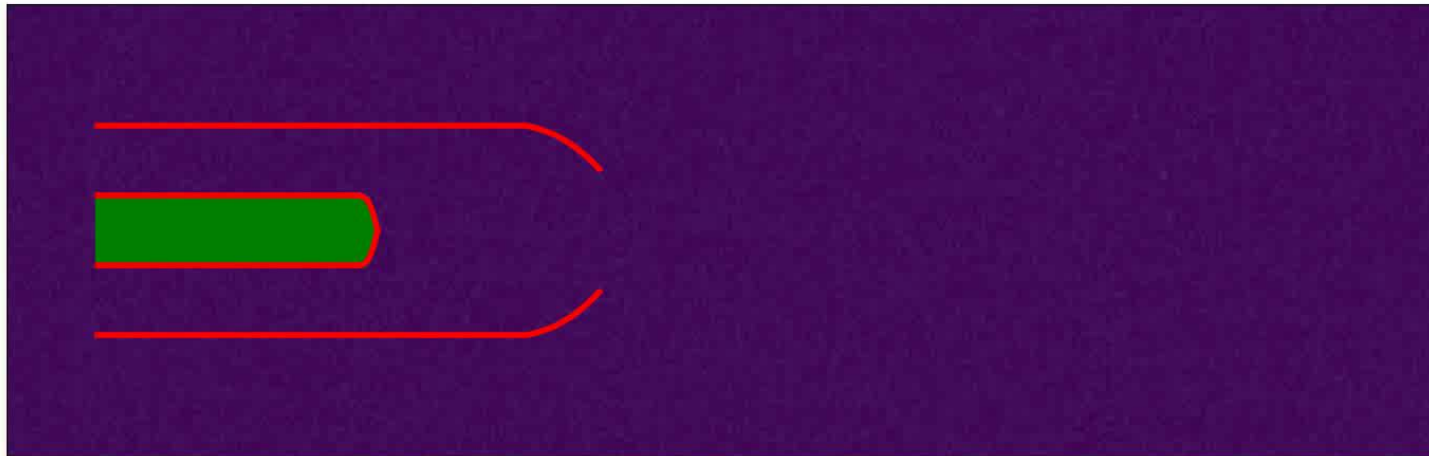
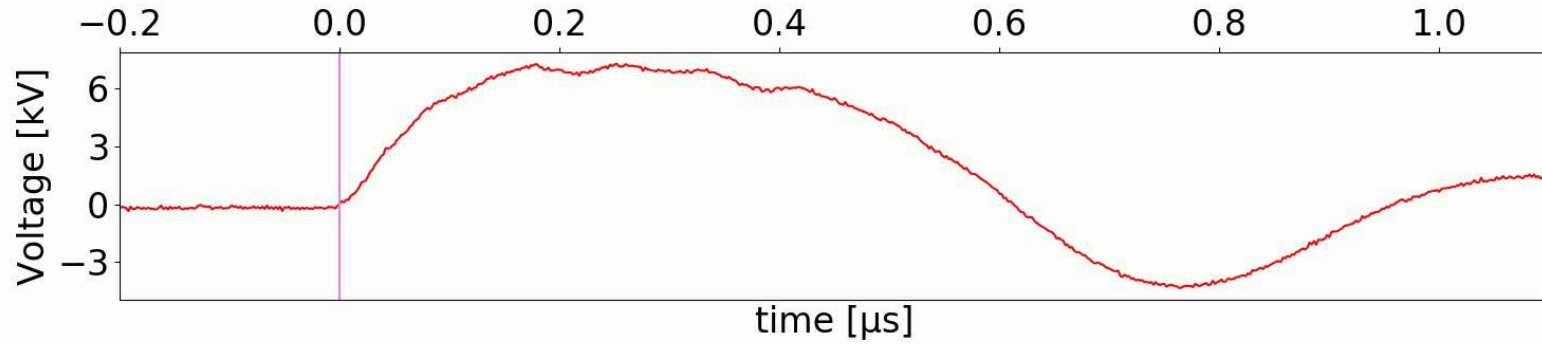


Visualizzazione degli «streamer»

Il getto di plasma, apparentemente stazionario, è in realtà composto da «streamer» discreti, associati agli impulsi di tensione, che si propagano a velocità di decine di km/s.

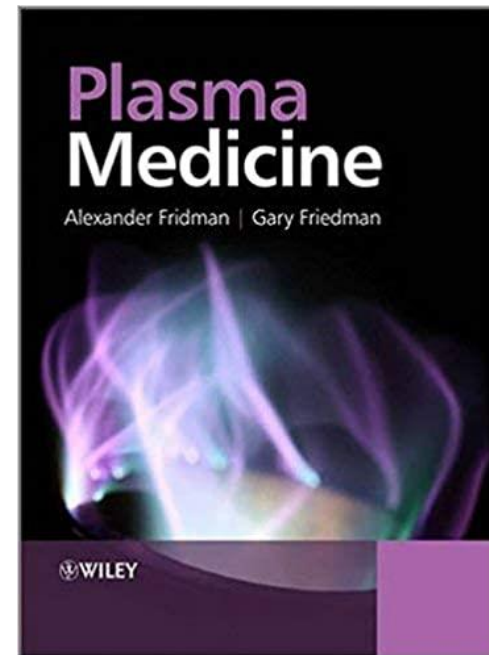
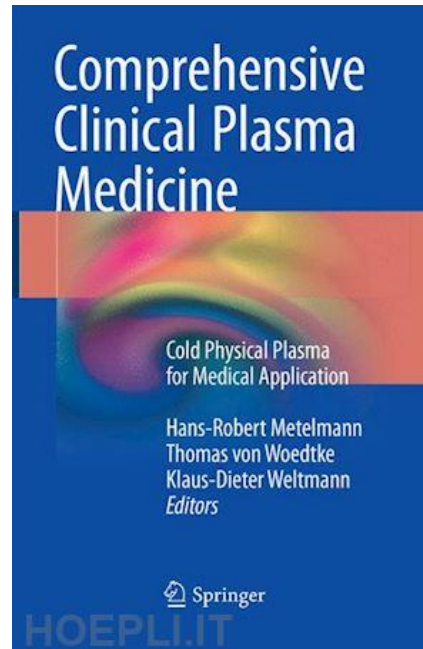
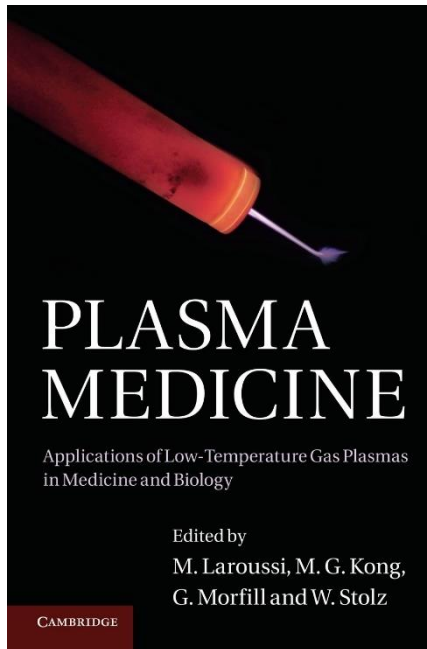


Visualizzazione degli «streamer»



Fra le principali applicazioni dei plasmi in ambito medico annoveriamo:

- **disinfezione** (da batteri, funghi, e anche virus);
- stimolazione della **guarigione delle ferite** («wound healing»);
- effetto **antitumorale**;
- **trasfezione** (inserimento di materiale genetico nelle cellule).



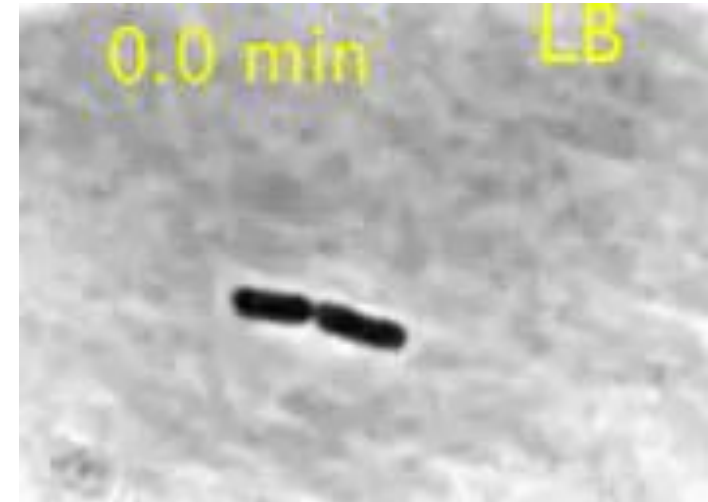
Disinfezione (batteri)

I batteri vengono inattivati in seguito all'**ossidazione** e conseguente **perforazione della membrana** che li racchiude.

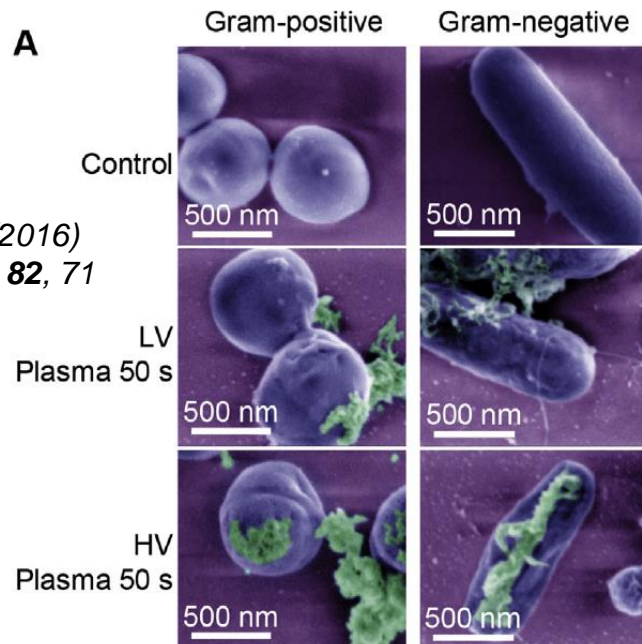
Le cellule eucariotiche, invece, hanno meccanismi di difesa nei confronti dello stress ossidativo, che consentono la loro sopravvivenza.

Si ha quindi la possibilità di disinfettare tessuti viventi senza danneggiarli in modo apprezzabile.

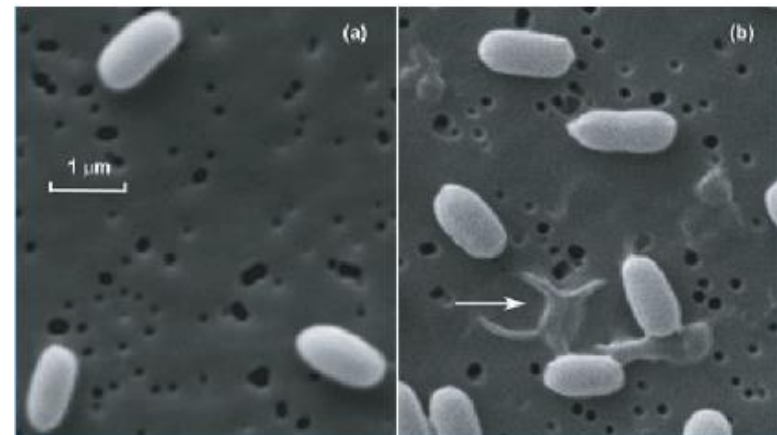
Effetto su batteri dell'aggiunta di «plasma treated water»



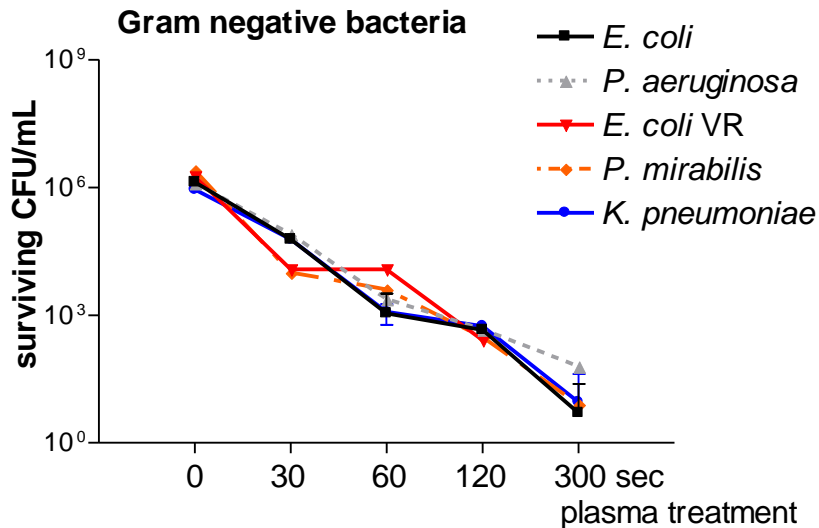
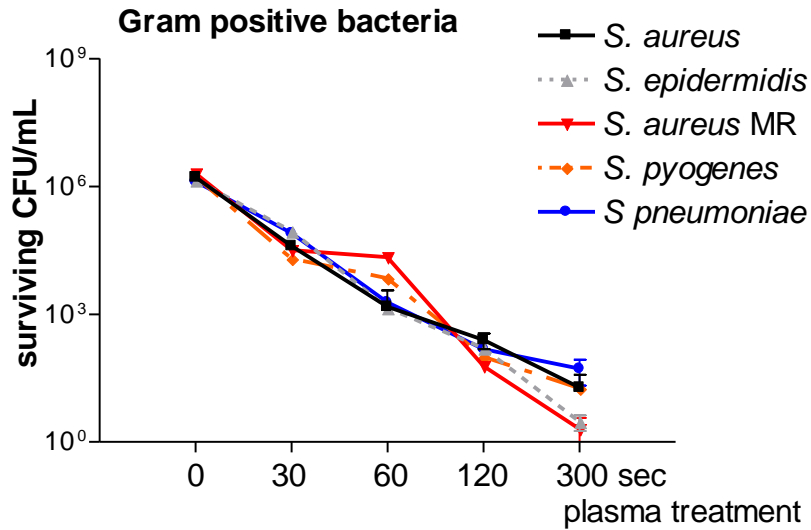
video realizzato da EPFL-Losanna



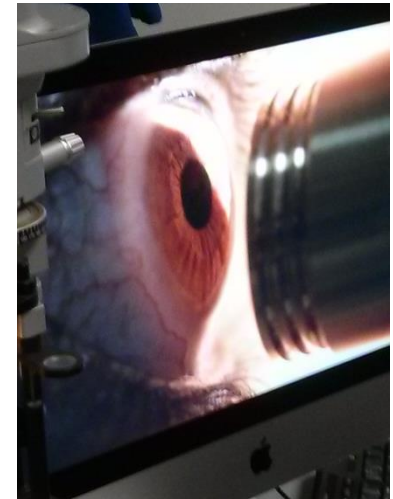
Lunov et al (2016)
Biomaterials **82**, 71



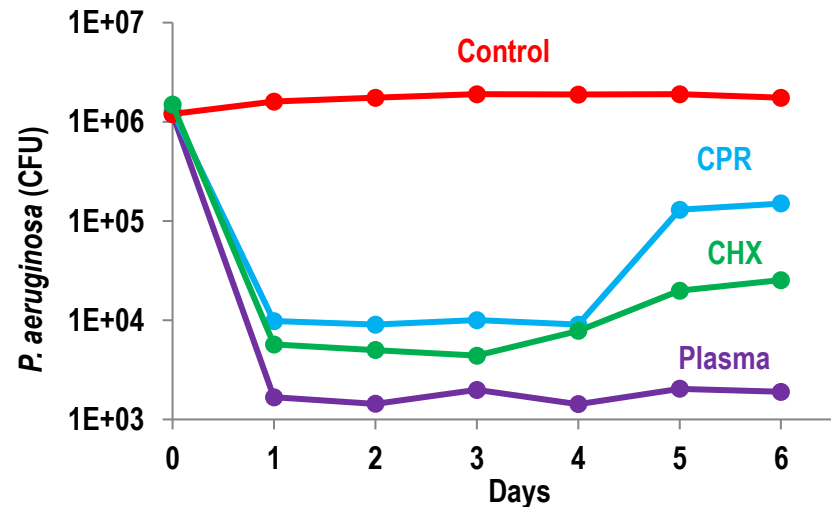
Disinfezione (batteri)



La sorgente RF di Padova è stata sviluppata per il trattamento delle **infezioni della cornea**.



L'azione del plasma non sembra indurre **resistenza**.



P. Brun et al. (2018) J. Appl. Microbiol. 125, 398

Il problema delle infezioni fungine è una **minaccia emergente** in ambito sanitario.

E adesso gli ospedali Usa fanno i conti con il fungo killer

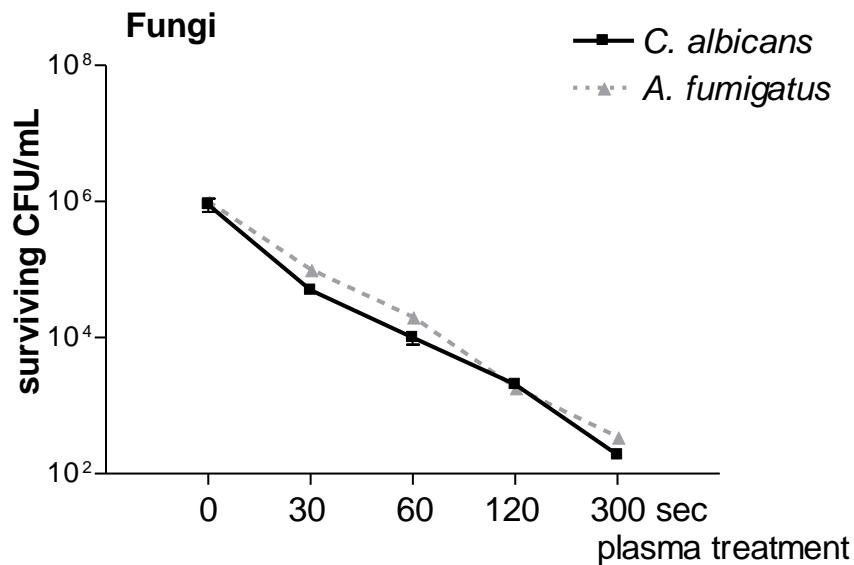
di Noemi Penna



Si chiama Candida auris, ed è parente della albicans, protagonista delle infezioni trasmesse sessualmente. Ma questo fungo, legato al sovraffollamento nelle strutture sanitarie per l'epidemia di Covid, può essere letale. Soprattutto se i farmaci che abbiamo sono armi spuntate. La situazione in Italia

03 AGOSTO 2021

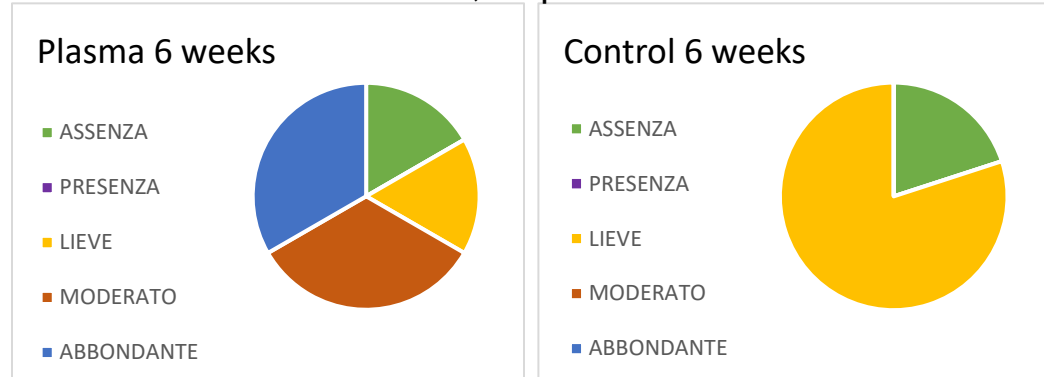
3 MINUTI DI LETTURA



La stimolazione di proliferazione e migrazione delle cellule consente di accelerare la guarigione delle ferite, incluse quelle croniche (es. ulcere diabetiche).

Si è anche osservata una riduzione dell'**infiammazione** e una più rapida **rivascolarizzazione** e **riformazione degli annessi cutanei** (ghiandole, bulbi piliferi, ecc.).

Annessi cutanei, biopsia a 6 settimane



E. Martines et al. (2020) Clinical Plasma Med. 17-18, 100095

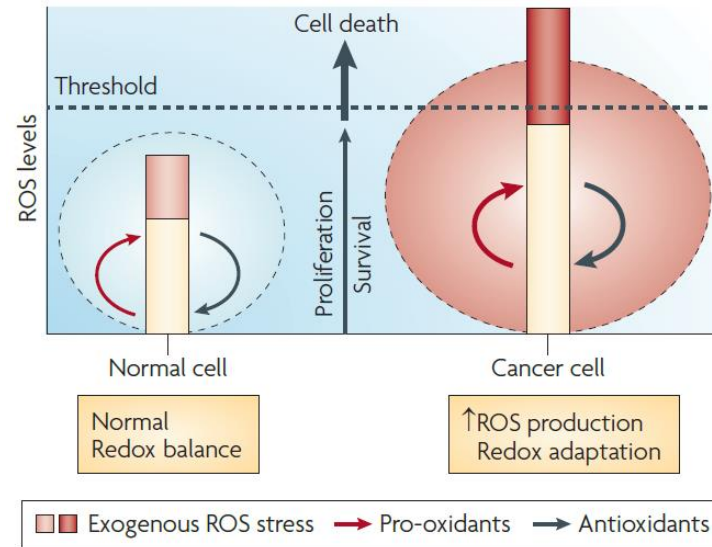
Guarigione di lesioni dermatologiche (psoriasi)



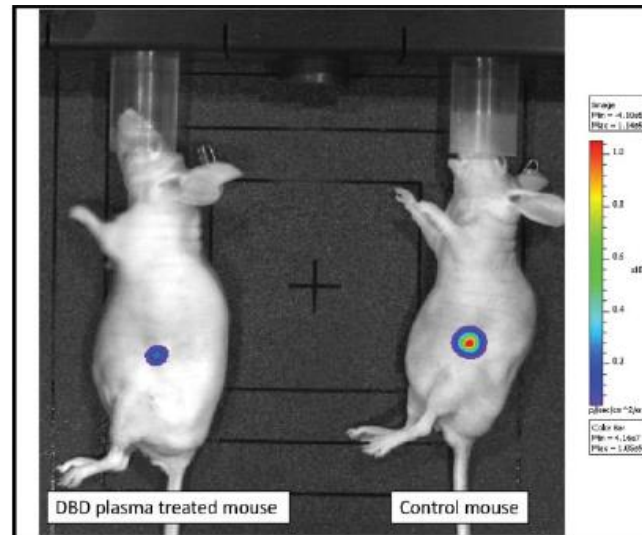
L'effetto antitumorale è legato al **più rapido metabolismo** delle cellule tumorali, che le porta ad avere un livello di **ROS endogeni** più elevato rispetto a quelle sane.

Elevando tramite l'azione del plasma questo livello, è possibile portare le cellule tumorali al di sopra della soglia letale, preservando parzialmente quelle sane.

Si tratta di un esempio delle cosiddette «**terapie Redox**».



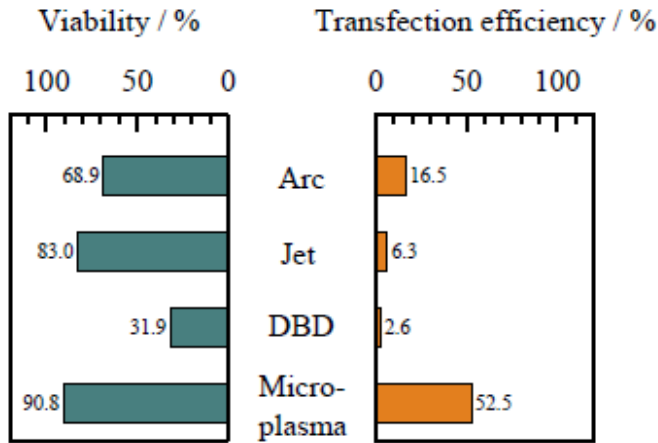
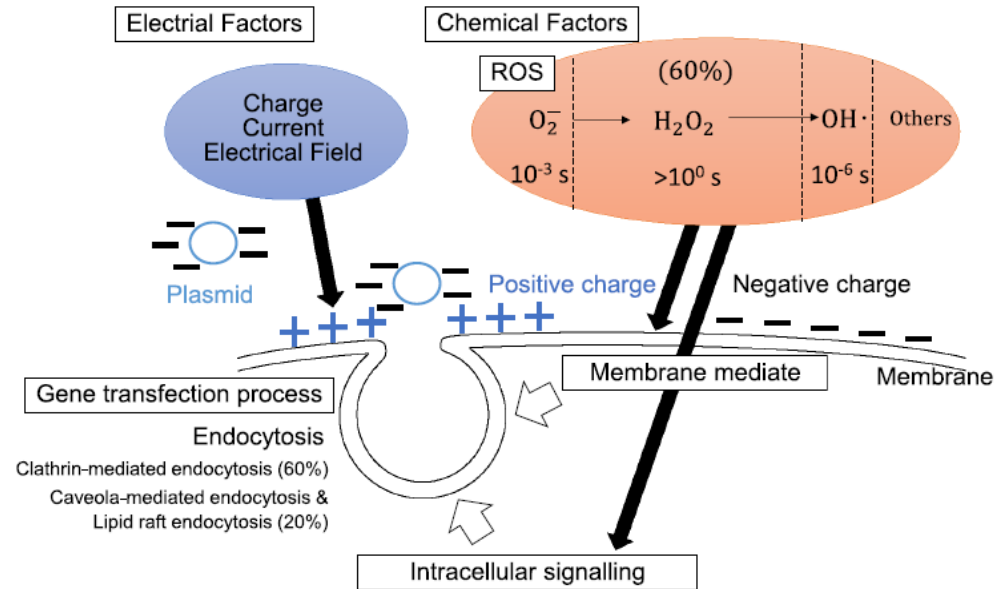
*Trachootham et al.,
Nature Reviews 2009*



*M. Vandamme et al. (2010)
Plasma Proc. Polym. 7, 264*

La trasfezione (inserimento di materiale genetico nella cellula) realizzata con il plasma è una forma di elettroporazione assistita dall'azione sulla membrana delle specie chimiche reattive.

Jinno et al. (2017) Plasma Sources Sci. Technol. 26, 056016



Per ottenere una buona efficienza è necessario progettare l'apparato in modo tale da avere un elevato campo elettrico sulla cellula.

Jinno et al. (2016) Jpn J. Appl. Phys. 55, 07LG09

Il plasma non termico generato da scariche a barriera dielettrica (DBD) in aria, elio o argon ha dimostrato di accelerare la coagulazione del sangue. I test in vitro e in vivo hanno confermato risultati incoraggianti, con una sensibile riduzione del tempo di coagulazione.

Il ruolo delle specie reattive di ossigeno/azoto (ROS e RONS) e degli ioni idrogeno prodotti nella scarica è in corso di studio.

Sono stati proposti anche diversi meccanismi sull'influenza delle specie generate dal plasma sulla cascata della coagulazione del sangue (attivazione delle proteine, formazione di fibrina).

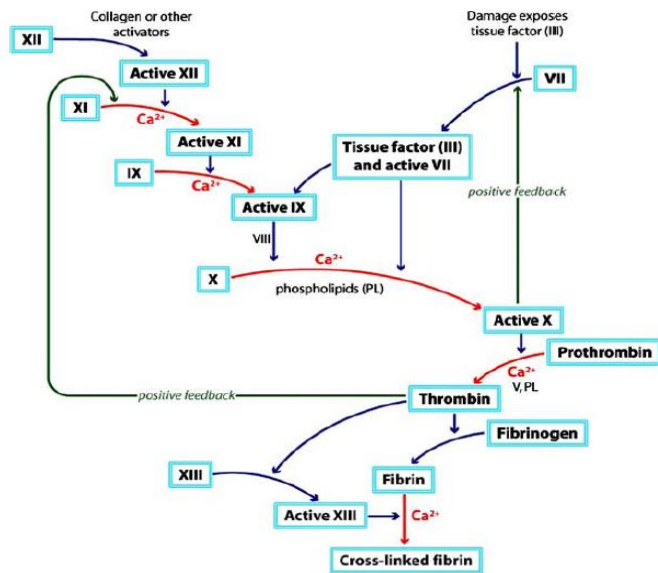


Fig. 14 Simplified coagulation cascade (adopted from D.U. Silverthorn [28])

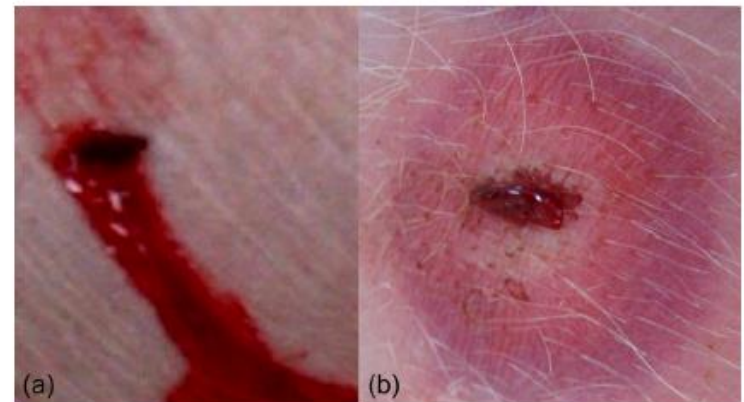


Fig. 3. Straight cuts taken (a) after more than 2-min waiting time for bleeding to stop naturally by itself and (b) after bleeding was stopped by a plasma treatment of 18 s.

La «plasma medicine» è una disciplina in espansione.

Dal punto di vista scientifico, essa presenta forti caratteri di **interdisciplinarietà**, e richiede la stretta collaborazione di fisici, ingegneri/tecnologi, chimici, biologi e medici.

Alcune sorgenti di plasma sono state certificate come **dispositivi medici** e stanno lentamente entrando sul mercato. C'è tuttavia molto lavoro da fare in termini di **ottimizzazione di dispositivi e processi**, e di **comprensione dei meccanismi** alla base degli effetti biomedici.

Il **gruppo di plasmi di Milano-Bicocca** si è posto l'obiettivo di diventare il punto di riferimento di una rete nazionale ed internazionale di laboratori attivi in questo ambito, con una forte attenzione alla collaborazione con le aziende e al trasferimento tecnologico.

