

Tesi di dottorato in Immunologia Oculare, di Velika Deligianni,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 15/03/2010.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Immunologia Oculare
XXII ciclo anno 2007

**Applicazione di plasma freddo per il trattamento
delle cheratiti infettive**

Velika Deligianni

Coordinatore
Prof. Stefano Bonini

Tutore
Dott. Andrea Leonardi

15 marzo 2010

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE: LA CORNEA E LE SUE PATOLOGIE	5
1.1 Anatomia e fisiologia della cornea	5
1.2 Patologie infettive della cornea	7
1.3 Trattamento delle cheratiti infettive	10
2. PLASMA: IL QUARTO STATO DELLA MATERIA	12
2.1 Il plasma: proprietà	12
2.2 Il plasma a bassa temperatura e sue applicazioni biomediche	16
2.3 Meccanismi d'azione del plasma	18
3. STRESS OSSIDATIVO	21
3.1 Definizione	21
3.2 ROS	21
3.3 Formazione dei ROS	22
3.4 Produzione dei ROS all'interno della cellula	24
3.5 Danni generati dai ROS	25
3.6 Antiossidanti	27
4. SCOPO DELLO STUDIO	31
5. LA SORGENTE DI PLASMA	32
5.1 Il "plasma tube"	32
5.2 Misura dello spettro d'emissione del "plasma tube"	36
5.3 Spettro d'emissione dalla sorgente di plasma	37
6. MATERIALI E METODI	40
6.1 Colture batteriche e loro trattamento con plasma freddo	40
6.2 Colture di <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus</i> e loro trattamento con il plasma freddo	41
6.3 Colture di fibroblasti congiuntivali e loro trattamento con plasma freddo	42
6.4 Analisi della vitalità cellulare mediante test dell'MTT	43
6.5 Determinazione dei livelli di ROS	44
6.6 Determinazione della concentrazione proteica	45
6.7 Colture di cornee umane in toto	46
6.8 Trattamento delle cornee con plasma freddo	46
6.9 Analisi morfologica delle cornee trattate con plasma freddo	47
6.10 Analisi della presenza di dimeri di timina nel DNA delle cellule trattate con il plasma	48
6.11 Analisi statistica	49
7. RISULTATI	50
7.1 Effetti del plasma freddo su microrganismi patogeni	50
7.2 Esposizione del plasma freddo di colture in monostrato di fibroblasti umani di congiuntiva	53
7.3 Determinazione dei livelli di ROS prodotti dai fibroblasti umani di congiuntiva, in seguito al trattamento	53

7.4 Determinazione dei livelli di ROS prodotti dalle cellule batteriche e fungine, in seguito al trattamento	55
7.5 Effetto delle radiazioni UV contenute nel plasma sulle colture di fibroblasti umani della congiuntiva	55
7.6 Esposizione al plasma freddo delle cornee umane: analisi istologica e ultrastrutturale	58
7.7 Altri test preliminari	61
CONCLUSIONI E DISCUSSIONE	62
BIBLIOGRAFIA	66

RIASSUNTO

Nel presente lavoro di tesi vengono descritti lo sviluppo di una sorgente di plasma “freddo” a pressione atmosferica e gli effetti del trattamento tramite tale plasma di superfici biologiche, con particolare interesse dedicato alla superficie oculare.

Il plasma a bassa temperatura è un gas parzialmente ionizzato, costituito da molecole, frammenti molecolari, radicali liberi con associata emissione di radiazione UV, avente un buon effetto antimicrobico. Dai primi studi effettuati, sembra che tale effetto sterilizzante sia dovuto principalmente ai radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Le radiazioni UV emesse dal plasma in esame sembrano avere un ruolo secondario nel processo antimicrobico. In questo lavoro di tesi, grazie ad una collaborazione tra la Clinica Oculistica dell'Università di Padova e il Consorzio RFX del CNR di Padova è stata progettata e realizzata un'innovativa sorgente di plasma di elio, denominata “plasma tube”, in grado di sterilizzare superfici molto piccole, senza danneggiarle, né riscaldarle.

Scopo della ricerca oggetto della tesi è di studiare le potenzialità dell'applicazione del plasma freddo di elio in campo biomedico e, in particolare, in oftalmologia, per la cura di infezioni corneali, difficilmente trattabili con le terapie convenzionali.

A tal fine l'effetto del plasma freddo è stato analizzato sulla base di uno studio di vitalità dei microrganismi patogeni, in particolare su batteri Gram-negativi *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sul Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e sui funghi *Candida albicans* e *Aspergillus*. L'influenza del trattamento sulla vitalità delle cellule umane, è stata verificata con il test MTT. La presenza di ROS nelle colture di cellule umane esposte al plasma e di eventuali dimeri di timina nel loro DNA, sono state analizzate con test specifici. La valutazione degli effetti del plasma su cornee umane in coltura, è stata effettuata mediante analisi istologiche ed ultrastrutturali.

Tra i risultati principali si è osservato che l'esposizione, di pochi minuti, al plasma dei microrganismi patogeni ha ridotto in modo significativo sia la vitalità delle

specie batteriche analizzate, che quella della Candida e dell'Aspergillo; il tasso di riduzione è correlato al tempo di esposizione. Lo stesso trattamento non ha influenzato invece, né la vitalità di fibroblasti umani di congiuntiva in coltura, né ha provocato danni al loro DNA. La quantità di ROS nelle colture delle cellule trattate, è risultata alta subito dopo il trattamento. Tuttavia, tale quantità è stata ridotta del 100%, già dopo 30 minuti. Il trattamento con il plasma delle cornee umane in coltura, non ha evidenziato alcun rilevante danno, sia dal punto visto morfologico che ultrastrutturale. Test preliminari di trattamento di cornee umane espiantate con infezione indotta sembrano indicare come il plasma prodotto dalla sorgente proposta sia in grado di abbattere la carica batterica senza provocare danni evidenti alle componenti cellulari della cornee stesse.

Il plasma freddo da noi studiato, riducendo notevolmente la vitalità dei microrganismi patogeni, ma non quella dei fibroblasti, può essere quindi considerato un candidato come agente terapeutico per il trattamento delle patologie oculari infettive.

1. INTRODUZIONE: LA CORNEA E LE SUE PATOLOGIE

1.1 Anatomia e fisiologia della cornea

La cornea è una membrana trasparente che costituisce il sesto anteriore dell'involucro più esterno del bulbo oculare, o tonaca fibrosa, a contatto con l'ambiente esterno (Figura 1.1). I rimanenti 5/6 posteriori, sono costituiti dalla sclera, opaca. Il confine tra le due strutture prende il nome di orlo sclerocorneale o limbus.

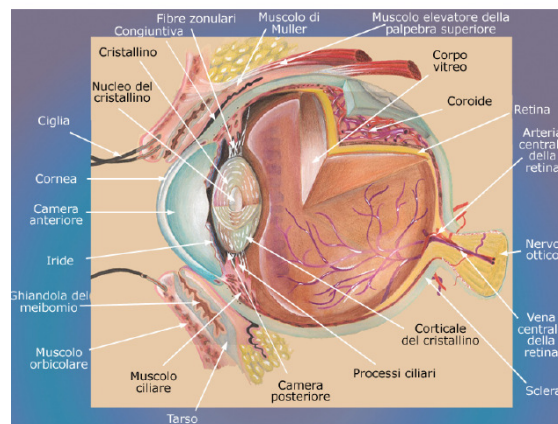


Figura 1.1: Sezione trasversale del bulbo oculare.

Oltre a rifrangere la luce, la cornea fornisce protezione all'occhio sia dalle infezioni causate da microrganismi patogeni, che dai traumi. L'idratazione e l'architettura regolare della cornea contribuiscono alla sua trasparenza, caratteristica essenziale per la trasmissione della luce visibile alla retina e quindi per la visione.

La cornea si compone di cinque strati, costituiti, a loro volta, da tessuti diversi (Figura 1.2): l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma corneale, la

membrana di Descemet e l'endotelio corneale. Complessivamente lo spessore totale della cornea è di circa 550 μm .

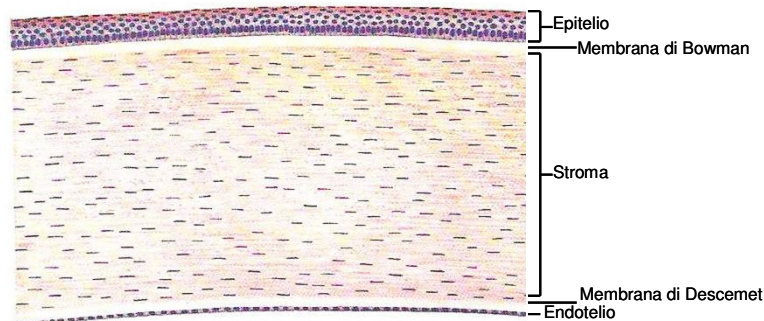


Figura 1.2: Microfotografia di una sezione di cornea umana.

L'epitelio ha uno spessore di circa 50 μm , è di tipo pavimentoso, non cheratinizzato, composto da 5-6 strati di cellule che si rinnovano completamente in pochi giorni e si continua con quello congiuntivale. È rivestito esternamente da un film lacrimale, importante per la corretta visione. A diretto contatto con l'epitelio, vi è il muco, prodotto dalle cellule caliciformi della congiuntiva, che permette la distribuzione uniforme del film lacrimale sulla superficie esterna. Lo strato più profondo dell'epitelio, è formato da una singola fila di cellule basali che, insieme alle cellule staminali situate al limbus, sono responsabili del rinnovo delle cellule dell'epitelio stesso. Tali cellule sono ancorate alla sottostante membrana basale, o membrana di Bowmann, per mezzo di emidesmosomi. La membrana di Bowman è molto spessa (circa 12 μm) e costituita da fibre di collagene, proteoglicani e proteine adesive.

Lo stroma della cornea occupa il 90% dello spessore dell'intera struttura; è un tessuto connettivo di tipo fibroso, in cui le fibre di collagene sono perfettamente allineate e si dispongono in più strati. La membrana di Descemet è una membrana basale che si trova tra lo stroma e il sottostante endotelio, costituita da collagene, proteoglicani e proteine adesive (laminina e fibronectina).

L'endotelio corneale è un epitelio di circa 5 μm , costituito da un solo strato di cellule poligonali, il cui ruolo principale è la regolazione dell'idratazione stromale. Tale funzione si esplica grazie alle pompe sodio-potassio ATP-asiche di membrana, che pompano acqua dallo stroma all'umore acqueo sottostante. L'endotelio non è in grado di rigenerarsi ma, quando una delle cellule che lo

costituisce viene danneggiata, gli elementi adiacenti aumentano di volume riempiendo gli spazi lasciati dalle cellule morte.

1.2 Patologie infettive della cornea

Nonostante che temperatura, pH, ricchezza di nutrienti ed osmolarità della superficie oculare favoriscano la crescita di microrganismi patogeni, le caratteristiche anatomico-fisiologiche della cornea ne impediscono la proliferazione e la conseguente infezione dei tessuti sottostanti. Infatti, la superficie corneale, oltre ad essere costituita da cellule epiteliali strettamente unite le une alle altre, che fanno da barriera contro l'invasione dei microbi, è anche ben protetta dalle palpebre. Anche l'ammiccamento regolare contribuisce alla eliminazione dei detriti eventualmente intrappolati nello strato di mucina delle lacrime. Alle barriere meccaniche, fanno seguito le risposte immunitarie aspecifiche di tipo fagocitico e le risposte legate alla produzione di molecole secretorie da parte di cellule monocitico-macrofagiche e di cellule proprie dei tessuti oculari. Infatti nell'area vascolarizzata peri-corneale, il limbus, e nella congiuntiva, la mucosa che riveste le palpebre e si riflette sulla sclera, sono presenti linfociti, plasmacellule, macrofagi, cellule T e quindi molti tipi di immunoglobuline da esse prodotte (IgG, IgA ed IgM). La congiuntiva contiene inoltre mastociti che, una volta attivati, inducono l'aumento della permeabilità e della dilatazione vascolare, con conseguente rilascio di sostanze antimicrobiche. Le lacrime contengono inoltre sostanze immunoattive come lattoferrina, lisozima, albumina specifica e IgA (Gilger, 2008). In situazioni normali, la componente maggiore, e cioè il 60% delle proteine totali, è rappresentata dalle IgA secretorie (sIgA). Nella secrezione lacrimale riflessa, invece, sono maggiormente presenti altre proteine: lisozima (33%), lattoferrina (21%), lipocalina specifica lacrimale (TSL) (25%), con le sIgA di conseguenza in quota minore. Tutti questi fattori svolgono attività antibatterica, antivirale, e antiproteasica, con lo scopo quindi di inibire la crescita batterica in diverse condizioni fisiologiche. Numerosi altri agenti antimicrobici, comunemente chiamati *antimicrobial peptides* (AMPs), sono stati identificati anche a livello della superficie oculare, come la famiglia delle defensine e delle catelicidine. Tuttavia, nonostante la presenza di tutti questi meccanismi di difesa della cornea, in particolari situazioni, i microrganismi patogeni possono prendere il sopravvento causando specifiche patologie oculari, quali le cheratiti.

Le cheratiti infettive sono delle emergenze oculistiche che, se non trattate adeguatamente, portano alla perdita permanente della funzione visiva o della funzionalità corneale. Sono patologie caratterizzate da infezioni ed infiammazioni della cornea dovute a batteri, virus, parassiti e funghi. Si distinguono dalle forme non-infettive per le caratteristiche cliniche che le contraddistinguono: occhi rossi e dolenti, sensazione di presenza di corpo estraneo a livello oculare, fotofobia marcata, lacrimazione riflessa, cambiamenti della visione, ulcerazione corneale epiteliale e stromale, infiltrazione corneale di polimorfonucleati e rischio di perforazione corneale nei casi più gravi (Mueller, McStay, 2008). I fattori di rischio maggiori nell'insorgenza delle cheratiti infettive, sono i traumi e l'uso di lenti a contatto (Thomas, Geraldine, 2007), ma anche comuni condizioni patologiche, quali anomalie della palpebra (entropion e trichiasi), che possono causare la lesione dell'epitelio protettivo della cornea. L'occhio secco e le disfunzioni lacrimali possono inoltre portare a danni, quali metaplasia e cheratinizzazione epiteliale congiuntivale e corneale, ed alla riduzione delle componenti antimicrobiche delle lacrime. Blefariti, alterazioni dell'innervazione corneale, erosioni corneali, cheratiti bollose, abrasioni e irritazioni chimiche corneali, rappresentano ulteriori fattori di rischio per l'insorgenza di infezioni della cornea (McLeod, 2003).

Cheratiti virali. I virus che causano cheratiti con una morbilità oculare significativa includono l'Herpes simplex (HSV), il virus della varicella-zoster (VZV), il virus Epstein-Barr (EBV), e l'Adenovirus. E' stata anche descritta la cheratite da Citomegalovirus (CMV), che può insorgere in associazione alla sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). L'infezione oculare da virus erpetici è una delle principali cause di cecità corneale nei paesi sviluppati. La formazione di cicatrici corneali e la diminuzione dell'acutezza visiva di solito sono il risultato di una malattia ricorrente piuttosto che primaria.

Cheratiti batteriche. Le cheratiti batteriche causate da *Stafilococchi* e *Pseudomonas*, costituiscono un'emergenza crescente tra le infezioni ospedaliere e sono considerate patologie di particolare gravità, perché possono portare alla perforazione dei tessuti corneali.

Gli Stafilococchi, sono cocchi Gram-positivi considerati patogeni opportunisti, che si incontrano comunemente su pelle, palpebre e congiuntiva. L'infezione tende a presentarsi in cornee compromesse, come quelle con cheratopatia bollosa,

malattia herpetica e difetti epiteliali persistenti. C'è solitamente un infiltrato stromale ben definito, di color crema, o grigio-bianco che implica un difetto epiteliale. Qualche volta possono svilupparsi focolai di ascesso multipli che assomigliano a lesioni satelliti fungine. Col tempo può estendersi profondamente nello stroma, portando alla necrosi dei tessuti, con conseguente perforazione della cornea (McLeod, 2003). Possono presentarsi un ipopion ed una placca endoteliale.

Lo *Pseudomonas (P.) aeruginosa* è il patogeno Gram-negativo più frequentemente isolato dalle ulcere corneali e rappresenta una frequente causa di cheratite associata all'uso di lenti a contatto.

Come gli altri microorganismi patogeni, *P. aeruginosa* provoca dapprima un danno superficiale e, successivamente, invade il tessuto corneale sottostante. L'infezione tende a progredire rapidamente in quanto questo batterio necessita di pochi nutrienti, può adattarsi a varie condizioni ecologiche e nicchie, così come può proliferare nelle soluzioni oftalmologiche e in generale nell'ambiente ospedaliero. La patologia è inizialmente caratterizzata dalla presenza di una secrezione purulenta congiuntivale, infiltrato infiammatorio, talvolta necrosi di tipo coagulativo, giallastra/verdastra, circondata da edema epiteliale. Le cellule epiteliali, stromali e infiammatorie, rilasciano enzimi (proteasi, lipasi, elastasi ed esotossine) che provocano dapprima infiammazione e, successivamente, produzione di radicali liberi dell'ossigeno e di enzimi lisosomiali (elastasi, collagenasi e mieloperossidasi) che causano la distruzione dello stroma, rompendo le fibre di collagene, digerendo i glicosaminoglicani e perforando le membrane cellulari dei cheratociti, con conseguente perdita di tessuto (Hazlett, 2004). L'ulcera in sviluppo si estende perifericamente e profondamente e, nel giro di poche ore, può coinvolgere l'intera cornea. Le ulcere possono evolversi ad anello e l'epitelio esterno corneale può assumere un aspetto opaco, simile al vetro smerigliato, di color grigio. L'ulcera suppurativa frequentemente si assottiglia in un deschemetocoele perforante. La cheratite può ampliarsi al limbus e produrre una sclerite infettiva.

Cheratite fungine. Le infezioni fungine tendono ad insorgere in cornee traumatizzate di individui immuno-depressi e sono caratterizzate dalla presenza di lesioni suppurative ed ulceranti. Si riconoscono due diverse forme di cheratiti

fungine, quelle causate da funghi filamentosi (specialmente *Fusarium* e *Aspergillus*), e quelle da funghi lievito-simili (in particolare da *Candida*).

Le cheratiti da *Candida (C.) albicans* insorgono generalmente sulla base di una lesione oculare pre-esistente (per esempio un'insufficienza nella secrezione lacrimale o un difetto di chiusura palpebrale), oppure possono essere la conseguenza di una malattia sistemica come il diabete, di uno stato di immunodepressione, di un difetto epiteliale, secondario a sua volta ad una cheratite virale (più frequentemente da *Herpes*) o ad abrasioni causate dall'uso di lenti a contatto contaminate (Thomas, 2003).

1.3 Trattamento delle cheratiti infettive

Il trattamento delle cheratiti inizia con l'adozione di terapie antimicrobiche ad ampio spettro. Infatti, fino a quando non si ha la risposta degli esami microbiologici istituiti prima dell'inizio della terapia, (che generalmente richiedono qualche giorno d'attesa), si assume che le infezioni siano di origine batterica. La terapia topica antibatterica dovrà poi essere eventualmente modificata in base al risultato dell'antibiogramma.

In caso di infiltrati corneali di modesta entità, il trattamento prevede l'uso di antibiotici topici ad ampio spettro, ogni 2-4 ore. In caso di moderata o grave infiammazione, è necessario istituire terapie con colliri a base di tobramicina o gentamicina "fortificati" (cioè preparati in laboratorio a concentrazioni superiori rispetto a quelle presenti nei colliri commerciali), alternati con cefazolina o vancomicina "fortificati". Nei casi più gravi, quando vi è il pericolo di perforazione, possono essere somministrate iniezioni sottocongiuntivali degli stessi antibiotici. Tuttavia, spesso si verificano resistenze alle terapie antibiotiche, che rendono inefficace il trattamento. Inoltre, gli occhi che presentano un assottigliamento della cornea, devono essere riparati con uno scudo protettivo.

Le complicanze principali delle cheratiti infettive riguardano sia alterazioni strutturali della cornea che altri disturbi, tra i quali il glaucoma secondario e la cataratta. Sono generalmente causate dalla risposta infiammatoria dell'ospite, dall'azione delle tossine batteriche, ma anche dagli effetti collaterali dei trattamenti farmacologici (antibiotici e corticosteroidi). E' necessaria l'ospedalizzazione quando il paziente non è in grado di eseguire correttamente la terapia, se c'è rischio di perforazione (ed è quindi necessario il trattamento con

antibiotici per via sistemica), se c'è una compromissione della sclera o se è presente una endoftalmite.

Nel caso di infezioni di comprovata natura fungina, il trattamento prevede l'uso topico di anfotericina B o miconazolo in collirio, sottoforma di preparazioni estemporanee e/o galeniche, in quanto non sono disponibili commercialmente farmaci antifungini in collirio, associati a chetoconazolo o altro antifungino mirato, somministrato per via sistemica.

Purtroppo, le cheratiti negli stadi più avanzati e in presenza di perforazione della cornea, spesso sono resistenti ai trattamenti disponibili (Mannis, 2002). In questi casi, l'unica alternativa per evitare la perdita della vista ai pazienti è rappresentata dal trapianto urgente di cornea "a caldo". Per ripristinare la funzione visiva in esiti di cheratiti che si sono risolte con una cicatrice (leucoma) corneale che compromette la opacità e la struttura corneale, si deve necessariamente ricorrere ad un trapianto di cornea con tutte le possibili conseguenze ed inconvenienti che questo tipo di trattamento può creare. Per il miglioramento del trattamento di queste patologie è quindi necessaria, da una parte, una conoscenza più approfondita dei meccanismi attraverso cui i patogeni inducono le cheratiti, e dall'altra lo sviluppo razionale di nuove strategie terapeutiche.

2. PLASMA: IL QUARTO STATO DELLA MATERIA

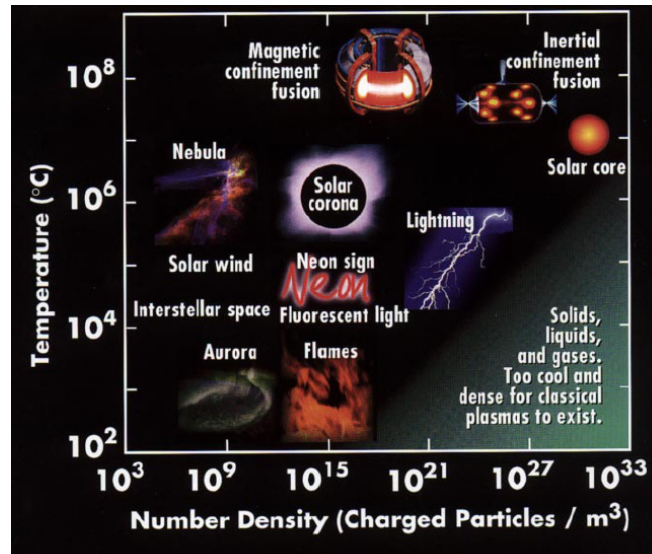
2.1 Il plasma: proprietà

Un plasma è un gas totalmente o parzialmente ionizzato, i cui atomi sono separati nei loro componenti fondamentali, ioni ed elettroni, ma che globalmente è neutro, quindi presenta carica elettrica totale nulla (Goldston 1997). Per essere definito tale un plasma deve soddisfare alcune proprietà, la più importante delle quali è che le proprietà collettive devono dominare su quelle locali delle singole particelle. Il plasma è considerato il quarto stato della materia dopo quelli solido, liquido e gassoso. In particolare, è noto che se si scalda un solido si ottiene un liquido, transizione nella quale si rompono i legami rigidi che legano le molecole nello stato solido; se si scalda un liquido si ottiene uno stato gassoso, fatto di molecole che interagiscono tra loro tramite urti prevalentemente di tipo elastico. Meno noto, normalmente è ciò che succede alla materia, allo stato di gas, quando la si scalda portandola a temperature superiori a circa 20000 gradi. In tali condizioni si ha un'ulteriore transizione di fase, nella quale viene rotto il legame che tiene l'elettrone (o, in generale, gli elettroni delle orbite atomiche più esterne nel caso di atomi con numero atomico maggiore di 1) nella sua orbita attorno al nucleo: si forma così un plasma.

Mentre sulla terra la presenza di materia allo stato di plasma è relativamente rara, per le basse condizioni di temperatura che si misurano nel nostro pianeta, nell'universo essa costituisce più del 99% della materia conosciuta: di plasma sono fatti, ad esempio, il Sole, le stelle, le nebulose e la materia nello spazio interstellare (Petrasso, 1990). Tra le manifestazioni naturali di plasmi più comuni sulla terra sono i fulmini, le fiamme e le aurore boreali. Plasmi possono essere, inoltre, prodotti in laboratorio mediante un sufficiente riscaldamento di un gas. Poiché le temperature necessarie alla transizione di fase sono molto elevate, normalmente in laboratorio si produce plasma mediante trasformazione di energia elettromagnetica in energia cinetica degli elettroni. Tale energia deve essere superiore a quella potenziale di legame degli elettroni stessi affinché questi

possano liberarsi dell'attrazione elettrostatica (coulombiana) del nucleo. Tipicamente in laboratorio l'energia elettromagnetica viene trasferita agli elettroni o mediante l'applicazione di campi elettrici o l'induzione di onde elettromagnetiche in opportuni intervalli di frequenza.

La materia si trova nello stato di plasma in un intervallo estremamente vasto di condizioni di densità di particelle cariche e di temperatura. In figura 2.1 sono rappresentate nel piano che ha in ascissa la densità elettronica, espressa in particelle per metro cubo, ed in ordinata la temperatura le regioni occupate da diversi tipi di plasmi presenti in natura o prodotti in laboratorio. Nonostante in figura 3 la temperatura sia espressa in gradi centigradi °C, l'unità di misura usata normalmente in fisica del plasma è l'elettronvolt (eV), in sostituzione di quella del sistema internazionale, il grado Kelvin ($1\text{ }^{\circ}\text{C} = 273\text{ K}$). Ricordiamo che 1 elettronvolt è l'energia acquistata da una particella con carica e quando è accelerata da una differenza di potenziale di 1 Volt. La scelta dell'uso da parte dei fisici del plasma dell'elettronvolt invece del grado Kelvin, K, è determinata dalle elevate condizioni di temperatura che essi si trovano a studiare: il fattore di conversione, infatti, è tale per cui 1 eV equivale ad una temperatura di circa 11600 K. Come si osserva dalla figura 2.1, viene definito plasma un ampio spettro di condizioni della materia, che varia da quella a temperature di oltre 100 milioni di gradi centigradi, prodotta negli esperimenti per la produzione di energia da processi di fusione termonucleare controllata a confinamento magnetico, a quella molto rarefatta delle nebulose e del vento solare che presentano temperature dell'ordine delle decine di migliaia di gradi.



Contemporary Physics Education Project (CFEP)

Figura 2.1: Densità e temperatura tipiche di alcuni plasmi esistenti in natura o prodotti in laboratorio.

Per i plasmi “spontanei” esistenti nell’universo vale normalmente la condizione di cosiddetta equipartizione: gli ioni e gli elettroni sono caratterizzati dalla stessa temperatura. Nei plasmi di laboratorio non sempre tale condizione è verificata. In particolare, a causa dell’enorme diversità di massa tra ioni ed elettroni, è possibile che il plasma sia formato da ioni ed elettroni cui sono associate temperature molto diverse tra loro. Ricordiamo che la temperatura di una famiglia di particelle è associata al moto disordinato (il cosiddetto moto termico) delle particelle stesse. La temperatura di una famiglia di particelle è quindi determinata dalla loro energia cinetica media. Nel processo di formazione di un plasma in laboratorio normalmente l’energia elettromagnetica introdotta dall’esterno viene convertita in energia termica agli elettroni, i quali, mediante collisioni di tipo coulombiano (collisioni elettrostatiche) trasferiscono parte della loro energia agli ioni. Nei plasmi in cui il numero di collisioni è sufficientemente alto e le temperature in gioco sufficientemente elevate gli ioni e gli elettroni si dice che termalizzano (si portano, cioè alla stessa temperatura). Nei plasmi molto rarefatti o caratterizzati da temperature elettroniche basse, poiché nell’urto elettrone-ione, come detto in precedenza, le masse in gioco differiscono per vari ordini di grandezza, il processo di termalizzazione è meno efficace e le due popolazioni (ioni ed

elettroni) rimangono in condizioni di energia cinetica media significativamente diversa. Tali plasmi sono detti in uno stato di “non-equilibrio” termico. Non tutti i plasmi prodotti in laboratorio si trovano in non-equilibrio, ad esempio i già citati plasmi studiati per la fusione termonucleare controllata si trovano in uno stato di equilibrio termico. La condizione di non-equilibrio è invece caratteristica dei plasmi di interesse più applicativo, i più importanti dei quali verranno elencati in seguito. Il plasma i cui effetti sulla materia vivente sono oggetto di studio in questa tesi si trova in uno stato estremamente lontano dall'equilibrio termico, essendo caratterizzati da temperature elettroniche dell'ordine dell'eV (circa 10000-20000 K) e temperature ioniche prossime a quella ambiente (20 °C, che nell'unità della fisica del plasma corrisponde a circa 0.025 eV).

Oggi le tecnologie basate sul plasma trovano molteplici ambiti di applicazione. Grazie alla possibilità di accelerare gli ioni, mediante l'applicazione di relativamente modeste differenze di potenziale, ad energie non facilmente raggiungibili attraverso il semplice riscaldamento di un gas neutro, e alla possibilità di impartire questa energia in maniera direzionale, i plasmi risultano particolarmente adatti per il trattamento di materiali, e in particolare delle superfici dei materiali stessi. Tra le principali applicazioni vi sono l'erosione (sputtering) di atomi di un materiale e la successiva rideposizione di essi su di un substrato, che consente la formazione di strati (film) sottili che modificano le proprietà delle superfici. Un altro processo molto utilizzato, specie nell'industria microelettronica, è lo scavo (etching) di trincee di grandezza micrometrica e forma molto regolare, reso possibile dall'unidirezionalità degli ioni accelerati dal campo elettrico. I plasmi risultano utili non solo dal punto di vista fisico, ma anche da quello chimico, in quanto l'elevata temperatura degli elettroni, favorisce reazioni che sarebbero altrimenti difficili da ottenere. Altre applicazioni industriali sono l'uso del plasma nelle lampade al neon, gli schermi al plasma per televisori e computer, le applicazioni nel campo della sterilizzazione, quelle nel settore dell'eliminazione di rifiuti pericolosi, e l'uso nel campo della propulsione spaziale, dove i propulsori basati sull'espulsione di plasma sono destinati a soppiantare gli attuali propulsori chimici per molti tipi di utilizzo (Zuin, 2004).

2.2 Il plasma a bassa temperatura e sue applicazioni biomediche

Il plasma a bassa temperatura è un gas parzialmente ionizzato (il livello di ionizzazione, definito come il rapporto tra la densità di particelle cariche e di quelle neutre, è stimato essere al di sotto dell'uno per mille) ottenuto mediante l'azione di un campo elettrico. E' costituito da molecole, frammenti molecolari e radicali liberi. Come detto, a bassi livelli di potenza esso si caratterizza per la presenza di una popolazione di elettroni di alta temperatura, che crea condizioni particolarmente favorevoli per lo sviluppo di reazioni chimiche normalmente sfavorite, a fronte di una temperatura degli ioni e del gas molto vicina alla temperatura ambiente (da cui anche la denominazione di "plasma freddo"). Ha trovato ampia applicazione nella microelettronica, dove le sue caratteristiche sono state sfruttate per la pulizia dei chip di silicio e per rendere più efficaci i processi di deposizione chimica in fase di vapore. Negli ultimi anni, il plasma freddo ha avuto un ruolo sempre più importante nella ricerca e nella produzione di materiali modificati in superficie, così come nelle tecnologie biomediche per il rivestimento di protesi artificiali per aumentarne la biocompatibilità (Klein et al., 1994), per il trattamento delle piastre da coltura per aumentarne l'adesione cellulare (Ohl, Schroder, 1999) e per la sterilizzazione di utensili chirurgici (Moisan et al., 2001). In generale questi risultati sono ottenuti operando in condizioni di bassa pressione, compresa tra 10^{-3} e 10^{-4} mbar prodotta all'interno di opportune camere da vuoto, in quanto in tali condizioni risulta più facile ionizzare il gas. E' stato però da tempo dimostrato che la produzione di un plasma a bassa temperatura stabile può anche essere ottenuta a pressione atmosferica (Laroussi et al., 1996), condizione che rende possibile l'uso del plasma per applicazioni in vivo. Condizioni considerate necessarie per l'interazione di un plasma con i tessuti viventi è che la sorgente di plasma stesso debba operare a pressione atmosferica, essere chimicamente ed elettricamente sicura e non causi alcun danno termico. Di particolare rilevanza per il trattamento di materiale biologico è stato lo sviluppo di una sorgente di plasma denominata "plasma needle" (Figura 2.2) da parte di un gruppo di ricerca dell'università di Eindhoven (Stoffels et al., 2002) con lo scopo di introdurlo come strumento di alta precisione per operazioni di microchirurgia in tessuti patologici senza indurre reazioni infiammatorie.

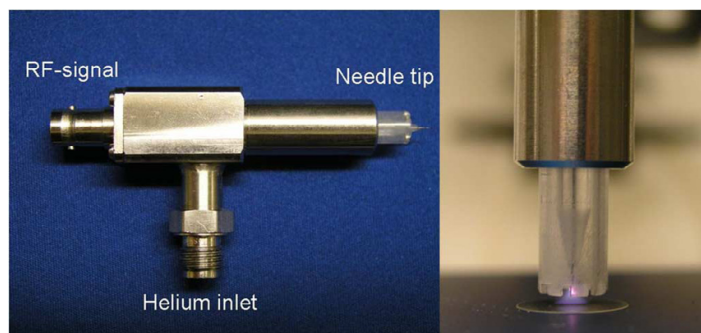


Figura 2.2 : Sorgente di plasma freddo denominata “plasma needle” (Stoffels et al., 2002)

I primi studi su colture in monostrato di cellule CHO-K1 (Chinese hamster ovarian cells) hanno dimostrato che le cellule trattate con il plasma si staccano dalla superficie di supporto e perdono le interazioni cellula-cellula, in seguito ad un danno provocato dal plasma alle molecole di adesione cellulare (CAM) quali caderine ed integrine, probabilmente causato da reazioni di tipo ossidativo (Kieft et al., 2004). Ulteriori esperimenti su cellule endoteliali e cellule di muscolo liscio vascolare hanno dimostrato che il processo di distacco delle cellule l'una dall'altra e dalla matrice extracellulare è comunque rapidamente reversibile (Kieft et al., 2005). Un altro effetto proposto del trattamento con il plasma è l'induzione dell'apoptosi. L'azione del plasma freddo, su cellule 3T3, fibroblasti murini, porta alla formazione di un numero di cellule apoptotiche tra il 20 e il 40% in 16-24 ore ed alla necrosi cellulare solo se utilizzato ad elevate potenze (Kieft et al., 2006). Inoltre, è descritto in letteratura che il plasma ottenuto con la sorgente del “plasma needle”, attraverso l'applicazione di un voltaggio a radiofrequenza ad un flusso di gas, principalmente elio mescolato ad una frazione d'aria, è capace di sterilizzare la superficie a cui è applicato senza danneggiare o riscaldare la superficie stessa. L'effetto sterilizzante è dovuto principalmente alla formazione di radicali atomici e molecolari, quali O ed OH, prodotti dall'influenza degli elettroni ad elevata temperatura presenti nel plasma sulle molecole volatili di ossigeno, azoto ed acqua che si mescolano al flusso di elio. I raggi UV, prodotti anch'essi in piccola quota nel plasma, sembrano possedere un ruolo minoritario nell'effetto sterilizzante (Sosnin et al., 2004). In particolare è stato proposto l'uso del “plasma needle” per il trattamento delle carie dentarie, con l'aspettativa che la disinfezione

della cavità dentale ottenuta con l'applicazione del plasma possa sostituire la trapanazione. I primi studi parametrici condotti su film di *Escherichia (E.) coli*, in terreno solido, hanno evidenziato la distruzione di 10^4 - 10^5 unità formanti colonia con soli 10s di trattamento con il plasma freddo (Sladek, Stoffels, 2005). Film di *Streptococcus mutans*, il più importante microrganismo in grado di causare le carie dentarie, possono essere ridotti con trattamenti di 20s di plasma freddo (Goree et al., 2006). Inoltre il trattamento con il plasma è in grado di aumentare l'idrofilicità delle superfici trattate, misurata dalla riduzione dell'angolo di contatto delle gocce d'acqua sulle superfici stesse. Questa proprietà può essere sfruttata per aumentare l'adesione e la crescita di colture batteriche nelle piastre di uso comune nei laboratori (Sladek et al., 2005).

Di particolare interesse è anche lo sviluppo di una nuova sorgente chiamata "plasma pencil" (Figura 2.3) da parte di un gruppo di ricerca della Old Dominion University. La sorgente "plasma pencil" differisce dal "plasma needle" poiché non usa un elettrodo a punta ma conserva gli effetti sterilizzanti senza danneggiare le superfici a cui è applicata (Laroussi et al., 2006).

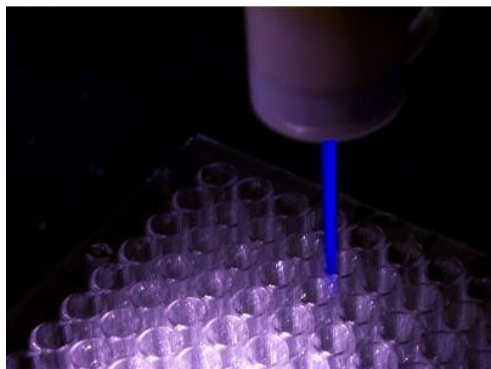


Figura 2.3 : Sorgente di plasma freddo denominata "plasma pencil" (Laroussi et al., 2006)

2.3 Meccanismi d'azione del plasma

Un plasma è composto principalmente da elettroni, ioni positivi e negativi, radicali e vari atomi eccitati; inoltre le sorgenti di plasma freddo di recente costruzione generano emissioni UV in proporzione variabile.

Il contributo dei vari componenti del plasma nel processo di sterilizzazione ed uccisione degli agenti microbici non è chiaro, ma i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) hanno un ruolo essenziale nel suo effetto germicida. La concentrazione dei radicali presenti nel plasma freddo è stimata essere pari a 10^{19} m^{-3} e le specie presenti comprendono ossigeno atomico $\text{O}\cdot$, ozono O_3 , ossido nitrico NO , ossidi di azoto NO_x , perossido d'idrogeno H_2O_2 , radicale idrossilico $\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$ e perossinitrito ONOO^- (Sladek et al., 2006). In presenza di umidità, le molecole di OH possono attaccare le strutture esterne delle cellule batteriche, elevati livelli di NO e NO_x sono letali e l'ozono interferisce con la respirazione cellulare, incrementando l'effetto battericida. Le altre componenti del plasma, ad azione antimicrobica, sono costituite dalle radiazioni UV (principalmente UVA ed una piccola quota di UVB ed UVC) e da altre particelle cariche, quali elettroni e ioni molecolari (Laroussi, Leipold, 2004). Quando gli UV colpiscono le cellule, inducono la formazione di dimeri di timina nel DNA, che vanno ad inibire la replicazione cellulare, bloccando la DNA polimerasi (Besaratina et al., 2005). Tuttavia, gli UV non sembrano essere gli agenti antimicrobici principali del plasma. Infatti, da esperimenti di trattamento di *Escherichia coli* con plasma in cui gli altri componenti del gas venivano bloccati da una finestra di quarzo (Hermann et al., 1999), si è visto che gli UV sono in grado di inattivare i processi cellulari solo a lunghezza d'onda comprese tra 220 nm e 280nm e a dosi (espresse in $\text{watt}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$) elevate, mentre gli UV generati dalle sorgenti di plasma freddo a pressione atmosferica non soddisfano queste condizioni e di conseguenza le radiazioni non hanno un effetto pronunciato sulle cellule batteriche. Le lunghezze d'onda emesse sono minori e sembrano non avere profondità di penetrazione sufficienti a causare un danno letale (Laroussi, 2002), in quanto sono ristrette a solo 1 μm dalla sorgente (Sladek et al., 2006).

Le particelle cariche presenti nel plasma sicuramente sono in grado di interagire con le pareti batteriche, provocandone la rottura. Infatti, l'accumulo di elettroni ed ioni sul lato esterno della cellula, produce delle forze elettrostatiche che possono superare la forza elastica della membrana stessa, rompendola. Questo meccanismo è particolarmente efficace per i batteri Gram-negativi, che possiedono una superficie irregolare (Mendis et al., 2000). Quando il trattamento al plasma è effettuato su sospensioni cellulari in terreno liquido la formazione di radicali può avvenire anche nella fase liquida per azione diretta delle molecole di elio, gas

prevalentemente usato nelle sorgenti per usi biomedici, sulla dissociazione delle molecole di H₂O. In ogni caso l'emivita delle singole specie reattive è molto breve, nell'ordine dei millisecondi (Kieft et al., 2006), sufficiente tuttavia per attivare nelle cellule trattate le vie metaboliche dello stress ossidativo.

3. STRESS OSSIDATIVO

3.1 Definizione.

Il metabolismo cellulare include numerose reazioni di ossidoriduzione. Uno squilibrio in senso ossidativo, cioè un aumento di specie chimiche elettronegative o la rimozione di elementi elettropositivi o elettroni, comporta quello squilibrio nei meccanismi omeostatici cellulari che prende il nome di stress ossidativo. Lo stress ossidativo è un tipo particolare di stress chimico indotto dalla presenza, in un organismo vivente, di un eccesso di specie chimiche reattive, generalmente centrate sull'ossigeno (specie reattive dell'ossigeno, ROS), secondario ad un'aumentata produzione delle stesse e/o una ridotta efficienza dei fisiologici sistemi di difesa antiossidanti. Oltre ai ROS, possono essere prodotte anche specie reattive dell'azoto (RNS) e tra le specie redox possono essere inclusi anche il monossido di carbonio (CO) e il solfuro d'idrogeno (H₂S).

3.2 ROS

I ROS sono molecole derivate dall'ossigeno molecolare che comprendono specie radicaliche e non. I radicali liberi sono molecole contenenti un elettrone spaiato nell'orbitale esterno; la necessità di raggiungere una configurazione elettronica più stabile, li rende particolarmente adatti a catturare elettroni da altre molecole o a formare con esse legami covalenti.

I principali radicali dell'ossigeno sono: HO· (radicale idrossilico); O₂⁻ (anione superossido); HO₂· (radicale idroperossido); NO· (monossido di azoto).

Le specie reattive non radicaliche comprendono: O· (ossigeno atomico); ¹O₂ (ossigeno singoletto); O₃ (ozono); H₂O₂ (perossido d'idrogeno); HOCl (acido ipocloroso) ONOO⁻ (anione perossinitrito).

Queste molecole, pur non essendo radicali di per sé vengono facilmente convertite in radicale idrossilico.

L'ossigeno è un diradicalo stabile che presenta due elettroni spaiati negli orbitali π di antilegame (Figura 3.1); un' importante conseguenza di ciò è che le molecole organiche con elettroni appaiati possono trasferire solo un elettrone alla volta all'ossigeno. Poiché l'ossigeno è un accettore di elettroni relativamente debole e molte molecole organiche sono donatori di elettroni deboli, l'ossigeno non è capace di ossidare in maniera efficiente gli amminoacidi e gli acidi nucleici, tuttavia reagisce facilmente con gli elettroni spaiati di metalli di transizione e di radicali organici. Al contrario i potenziali di riduzione di O_2^- , H_2O_2 e $OH\cdot$ mostrano come essi siano ossidanti molto più forti dell' O_2 (Figura 3.2).

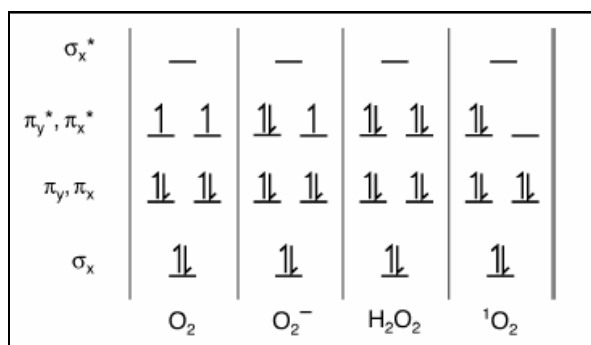


Figura 3.1: diagramma degli orbitali molecolari dell'ossigeno (O_2), del radicale superossido (O_2^-), del perossido di idrogeno (H_2O_2) e dell'ossigeno singoletto (1O_2)

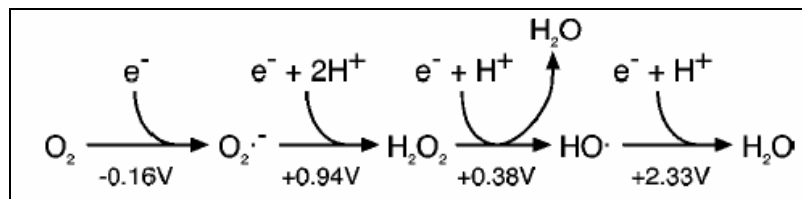
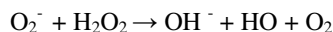


Figura 3.2: potenziali di riduzione dell'ossigeno molecolare e delle sue specie

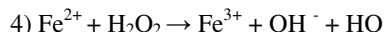
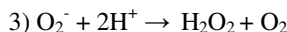
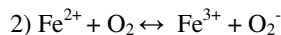
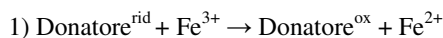
3.3 Formazione dei ROS

I ROS sono generalmente prodotti durante il normale metabolismo cellulare, ma la loro formazione può essere incrementata da particolari condizioni dell'ambiente esterno quali ad esempio l'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'incremento della pressione dell'ossigeno o la presenza nel mezzo di agenti ossidanti.

La tossicità del O_2^- dipende soprattutto dall'interazione di quest'ultimo con l' H_2O_2 . Infatti, secondo la reazione di *Haber-Weiss* l'interazione tra O_2^- e H_2O_2 può portare alla formazione del $OH\cdot$, la più reattiva delle specie parzialmente ridotte dell'ossigeno:



La costante di questa reazione in soluzione acquosa è vicina allo zero ed essa non può avvenire alle basse concentrazioni di O_2^- e di H_2O_2 presenti *in vivo*. Tuttavia la presenza *in vivo* di Fe^{+2} può catalizzare la formazione del OH . In presenza di un donatore di elettroni, il Fe^{3+} viene ridotto a Fe^{2+} (1) e l'ossidazione di questo ione mediante ossigeno porta alla formazione di O_2^- (2); quest'ultimo, in seguito ad una reazione di dismutazione, forma H_2O_2 (3) che a sua volta può reagire con Fe^{2+} mediante la reazione di Fenton per formare OH (4):



Il Fe^{2+} potrebbe essere prodotto, come era stato dimostrato da studi preliminari (Imlay, 2003), dalla reazione inversa a quella mostrata nell'equazione (2), tuttavia *in vivo* questa reazione ha poca importanza a causa della bassa concentrazione di O_2^- ($\sim 10^{-10}$ M) (Imlay, Fridovich, 1991). La riduzione del Fe^{3+} *in vivo*, come dimostrato da Rowley e Halliwell (1982), potrebbe essere dovuta all'azione di agenti riducenti intracellulari come il NAD(P)H (nicotinammide adenosin dinucleotide fosfato ridotto) e il glutatione che sono molto più abbondanti anche se meno reattivi del O_2^- (Winterbourn, 1979). Recenti studi hanno mostrato che sia il $FADH_2$ (flavin adenina dinucleotide) che i residui di cisteina riescono a ridurre velocemente il Fe^{3+} *in vitro* (Park, Imlay, 2003 e Woodmansee, Imlay, 2003), inoltre trattamenti che incrementano i loro livelli *in vivo*, aumentano i danni derivati dalla formazione di OH anche di un ordine di grandezza.

Come mostrato dall'equazione (3), O_2^- , in seguito ad una reazione di dismutazione, forma O_2 e H_2O_2 . Quest'ultimo è capace di ossidare alcuni composti organici come residui di cisteina e metionina ma l'ossidazione avviene

solo quando *in vivo* sono presenti alte concentrazioni di questo composto. Perciò la tossicità dell' H_2O_2 dipende dalla sua capacità di generare $\text{OH}\cdot$ in presenza di $\text{O}_2\cdot^-$ e di Fe^{2+} .

3.4 Produzione dei ROS all'interno della cellula

La fonte dei ROS è per lo più metabolica, in ciascun compartimento cellulare, infatti, esistono numerose attività enzimatiche coinvolte nella generazione dei ROS.

Le cellule producono energia riducendo l'ossigeno molecolare in acqua, attraverso la riduzione "univalente" dell'ossigeno (Figura 3.3). Il complesso IV della catena respiratoria, citocromo c ossidasi, è una deidrogenasi aerobica che accetta 4 elettroni dal citocromo c e li utilizza per ridurre l' O_2 in H_2O in una serie di passaggi che coinvolgono trasferimenti di singoli elettroni con produzione di anione superossido, perossido d'idrogeno e radicale idrossilico come inevitabili sottoprodotti della respirazione mitocondriale.

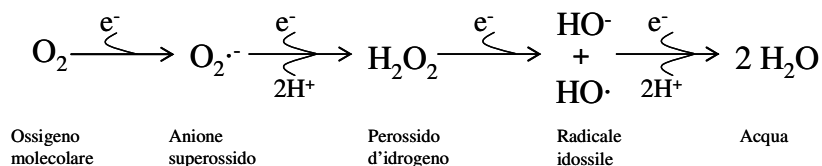


Figura 3.3: Riduzione dell'ossigeno molecolare

Numerose ossidasi intracellulari quali la NADH deidrogenasi, la ciclossigenasi, la succinato deidrogenasi e la xantina ossidasi producono ROS, in particolare $\text{O}_2\cdot^-$ e H_2O_2 . Anche l'ossidazione di piccole molecole come flavine, catecolamine e tetraidrofolato può portare alla formazione di queste specie reattive dell'ossigeno. Nei perossisomi l'enzima aminoacido ossidasi catalizza la deaminazione ossidativa, tramite cofattori FMN (flavin mononucleotide) e FAD, di aminoacidi nei relativi α -chetoacidi con produzione di H_2O_2 . Nel reticolo endoplasmico il complesso del citocromo P450 può liberare anione superossido.

Metalli di transizione come ferro e rame donano o accettano elettroni liberi durante le reazioni intracellulari e catalizzano la formazione di radicali liberi, come avviene nella reazione di Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}\cdot$).

Un esempio di incremento enorme della produzione di anione superossido è quello che si verifica nei leucociti polimorfonucleati durante il processo infiammatorio. La fagocitosi da parte di queste cellule sviluppa un improvviso aumento del consumo di ossigeno, della glicogenolisi, un aumento dell'ossidazione del glucosio attraverso lo shunt degli esoso-monofosfati e la produzione di ROS dovuta alla rapida attivazione della NADPH ossidasi che ossida il NADPH e, in questo processo, riduce l'ossigeno ad anione superossido che è quindi convertito in perossido d'idrogeno soprattutto per dismutazione spontanea. La NADPH ossidasi è un enzima complesso formato da almeno sette proteine. Nei neutrofili a riposo, differenti componenti proteiche della NADPH ossidasi sono localizzate a livello della membrana plasmatica e del citoplasma. In risposta a stimoli di attivazione, le componenti proteiche del citosol si spostano sulla membrana plasmatica o su quella del fagosoma, dove si assemblano e formano il complesso enzimatico funzionante (Nathan, Shiloh, 2000). Pertanto, gli intermedi reattivi dell'ossigeno sono prodotti all'interno dei fago-lisomi dove le sostanze ingerite sono segregate e gli organuli della stessa cellula sono protetti dagli effetti dannosi dei ROS. Un sistema enzimatico simile genera intermedi reattivi dell'azoto, soprattutto ossido nitrico, coinvolti anch'essi nell'uccisione dei microbi.

La quantità di H_2O_2 generato dal sistema della NADPH ossidasi in genere non è sufficiente per uccidere efficientemente i microbi. Tuttavia, i granuli azzurofilari dei neutrofili contengono l'enzima mieloperossidasi (MPO), che, in presenza di un alogenuro come il Cl^- , converte l' H_2O_2 in ipoclorito (HOCl). Quest'ultimo è un potente agente antibiotico che distrugge i microbi tramite alogenazione (nel quale l'alogenuro viene legato covalentemente a costituenti cellulari batterici) o ossidazione delle proteine e dei lipidi.

3.5 Danni generati dai ROS

I radicali liberi sono specie chimiche che hanno un singolo elettrone spaiato sull'orbitale esterno. L'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata attraverso reazioni con le molecole adiacenti, quali sostanze inorganiche ed organiche, proteine, lipidi, carboidrati, in particolare con molecole chiave di membrana e con gli acidi nucleici. Inoltre i radicali liberi innescano reazioni

autocatalitiche, per mezzo di molecole con cui essi reagiscono, le quali vengono a loro volta trasformate in radicali liberi che propagano la catena del danno.

Gli effetti di queste specie reattive sono a largo spettro, anche se per il danno cellulare sono particolarmente importanti la perossidazione lipidica delle membrane, le alterazioni ossidative alle proteine e i danni al DNA.

In presenza di ossigeno i radicali liberi possono causare perossidazione dei lipidi della membrana plasmatica e delle membrane degli organelli. Il danno ossidativo inizia quando i doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi dei lipidi di membrana vengono attaccati dai ROS, in particolare dal radicale idrossilico. Le interazioni tra lipidi e radicali liberi generano la formazione di perossidi, che sono a loro volta instabili e reattivi, e inducono una reazione autocatalitica a catena (detta propagazione), che determina danni ingenti a carico della membrana, degli organelli e dell'intera cellula. La struttura del doppio strato fosfolipidico viene destabilizzata e si ha la formazione di prodotti tossici come le aldeidi (Li, Jackson, 2002). Particolarmente suscettibili alla perossidazione sono gli acidi grassi poliinsaturi come l'acido linoleico ed arachidonico.

I radicali liberi promuovono l'ossidazione delle catene laterali dei residui amminoacidici; gli aminoacidi più sensibili sono la Prolina, l'Arginina e l'Istidina, le cui modificazioni tendono a frammentare le catene aminoacidiche. Inoltre il danno ossidativo può causare la formazione di legami crociati tra due o più proteine, mediante l'ossidazione di gruppi sulfidrilici delle cisteine. Nell'insieme queste alterazioni comportano l'abolizione della funzione e la prematura degradazione delle proteine danneggiate.

Infine, i danni al DNA, particolarmente da parte del radicale idrossilico che è capace sia di sottrarre elettroni alle basi azotate e al deossiribosio, sia di aggiungere elettroni alle basi con la conseguente produzione di radicali che possono determinare diversi tipi di danni come la rottura dei filamenti o la generazione di mutazioni. Tra i vari addotti che si possono formare il più caratteristico è l'8-idrossi-2-deossiguanosina (8-OHdG) che è stato dimostrato essere mutageno causando una transversione G → T sia in cellule di mammifero che batteriche (Franco et al., 2008).

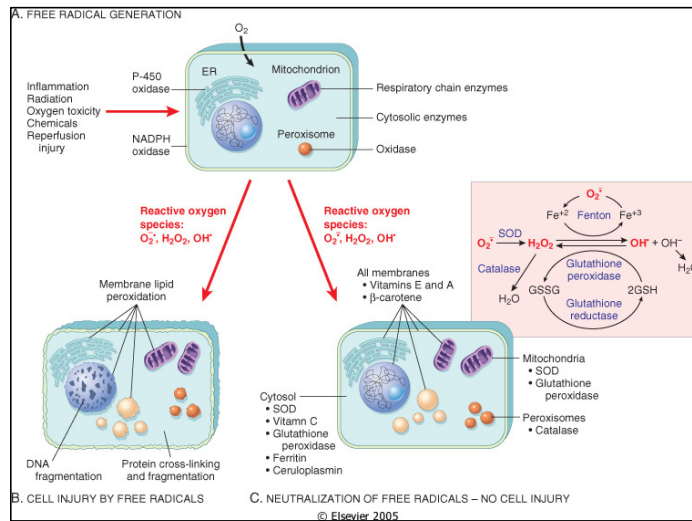


Figura 3.4: Ruolo dei ROS nel danno cellulare (tratta da Robbins & Cotran, Le basi patologiche delle malattie, 2007).

3.6 Antiossidanti

Le cellule hanno sviluppato diversi meccanismi per rimuovere i radicali liberi e minimizzare il danno. I radicali liberi sono intrinsecamente instabili e, in genere, decadono spontaneamente. L'anione superossido, per esempio, è instabile e in presenza di acqua dismuta spontaneamente in ossigeno e perossido di idrogeno. Ci sono, tuttavia, molti sistemi enzimatici e non, che contribuiscono all'inattivazione delle reazioni da radicali liberi. Gli antiossidanti sono sostanze che, in concentrazioni basse rispetto ad un substrato ossidabile, ne inibiscono o ritardano significativamente l'ossidazione. Non sono una categoria di sostanze omogenee, ma ne fanno parte enzimi, vitamine e peptidi che possono essere intracellulari ed extracellulari contenuti nei fluidi biologici. Inoltre, vi sono antiossidanti endogeni ed esogeni, introdotti con la dieta, tra cui le vitamine liposolubili A ed E (α -tocoferolo), la vitamina C (acido ascorbico), polifenoli e carotenoidi. Tra gli antiossidanti endogeni vi sono numerosi enzimi antiossidanti, albumina, transferrina, ferritina, lattoferrina, ceruloplasmina, bilirubina, coenzima Q10 (ubiquinone), glutazione (GSH) ed altri tioli a basso peso molecolare, metallothioneine e l'acido lipoico (Hensley K et al., 2000). Nella tabella 3.1 vengono elencati i principali antiossidanti endogeni ed esogeni.

Endogeni	Esogeni (dieta)
Enzimi antiossidanti	Polifenoli
Albumina	Carotenoidi
Transferrina, ferritina, lattoferrina	Vitamina A
Ceruplasmina	Vitamina C (acido ascorbico)
Proteine tioli	Vitamina E (α -tocoferolo)
Bilirubina	
Coenzima Q ₁₀ (ubiquinone)	
Glutazione (GSH) ed altri tioli a basso peso molecolare	
Acido lipoico	
Metallotioneine	

Tabella 3.1: antiossidanti esogeni ed endogeni

Il glutatione, γ -glutamminil cisteinil glicina, è un tripeptide non convenzionale, poiché il legame amidico tra glutammina e cisteina coinvolge il gruppo γ -carbossilico della glutammina. Può presentarsi come tripeptide in forma ridotta (GSH), o come dimero di due tripeptidi in forma ossidata (GSSH) in cui due molecole di glutatione sono legate tra loro dai gruppi sulfidrilici delle cisteine. La coppia redox GSH/GSSG indica lo stato ossidoriduttivo in cui si trova la cellula. Il rapporto tra GSH e GSSG non è però costante durante il ciclo cellulare, ma varia a seconda del momento in cui si trova la cellula: in fase proliferativa aumenta significativamente il GSH mentre se la cellula è costretta all'apoptosi, si assiste ad un incremento del GSSG, e se la cellula è in una condizione di arresto della crescita si ha un'uguaglianza tra quantità di GSH e di GSSG con rapporto uguale ad 1 (Droge, 2002).

Le funzioni del glutatione sono molteplici, oltre ad avere attività antiossidante, svolge anche attività citoprotettiva, detossificante ed ha un ruolo importante nel trasporto e nell'immagazzinamento delle cisteine. Può fungere da antiossidante diretto o essere utilizzato come substrato di numerosi enzimi deputati al controllo dello stato redox della cellula, come la glutaredossina, la tioredossina e la famiglia delle glutatione perossidasi (GPx). Ossidando il glutatione, le GPx tetrameriche degradano perossidi inorganici. Le GPx catalizzano la rimozione di H₂O₂ e di lipidi perossidi (ROOH) usando il glutatione per ridurre H₂O₂ o ROOH ad acqua o ROH, rispettivamente, secondo le reazioni:



Le GPx contengono un residuo di selenocisteina, in ciascuna delle 4 subunità identiche, che è essenziale per la loro attività. La glutatione perossidasi coopera

con la glutatione reduttasi, che catalizza la riduzione di GSSG a spese del NADPH: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$.

Quindi la presenza di H_2O_2 nella cellula attiva la GSH perossidasi, la quale trasforma due molecole di GSH in una molecola di GSSG, con tale meccanismo si forma acqua. Successivamente il GSSG viene riportato alla sua forma originale, due molecole di GSH, dalla GSH reduttasi NADPH dipendente. Quando la cellula è in una condizione di stress ossidativo severo, si ha un aumento dei livelli di GSSG e una diminuzione dei livelli di GSH, in tal modo il citoplasma risulta più ossidato rispetto all'assenza di stress ossidativo.

La coppia redox maggiormente presente a livello extracellulare e la coppia Cys/CySS. Tale coppia è presente ad una concentrazione più alta rispetto alla coppia GSH/GSSG. La forma predominante nel plasma umano è CySS. Infatti, la Cys plasmatica si trova in concentrazioni di 8-10 μM , mentre la CySS in concentrazioni $> 40 \mu M$.

Come già detto, ferro e rame possono catalizzare la generazione di specie reattive dell'ossigeno. Le concentrazioni di queste forme reattive sono minimizzate grazie al legame degli ioni alle proteine di deposito e di trasporto quali la transferrina, ferritina e lattoferrina che limitano la formazione di radicali $HO\cdot$.

Diversi enzimi agiscono come sistemi di disinnesco dei radicali liberi, inattivando il perossido d'idrogeno e l'anione superossido. Questi enzimi sono localizzati in prossimità delle sedi di produzione di questi ossidanti e mantengono l'ambiente riducente all'interno della cellula. Gli enzimi antiossidanti più importanti sono la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi: essi tendono a rimuovere direttamente l'ossidante e non intervengono dunque nel controllo delle modificazioni indotte dai ROS sulle macromolecole biologiche.

La SOD catalizza la riduzione e l'ossidazione di $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e ossigeno: $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Nei mammiferi sono presenti tre isoforme di superossido dismutasi, tutte richiedono un metallo di transizione nel sito attivo per poter attuare la loro funzione, e si differenziano quindi in base ai cofattori e alla loro localizzazione cellulare.

La Cu-Zn SOD presenta un atomo di rame ed uno di zinco come cofattori ed è prevalentemente localizzata nel citosol o nel nucleo; la Mn-SOD con il

manganese come cofattore è mitocondriale. Esiste anche una forma secretata di Cu-Zn SOD che si trovano negli spazi interstiziali dei tessuti e nei fluidi extracellulari, è la forma maggiormente presente nel plasma, nella linfa e nel fluido sinoviale (Zelko et al., 2002).

La Fe-SOD è invece batterica, è presente ad esempio in *Escherichia coli* (Dubrac, Touati, 2002) e tra i cianobatteri sono state scoperte anche altre isoforme di SOD che utilizzano il nickel nel proprio sito attivo (Eitinger, 2004).

La catalasi è una dismutasi che riduce una molecola di H_2O_2 ad acqua e ossida una seconda molecola di H_2O_2 ad ossigeno molecolare: $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$.

La catalasi è un enzima tetramericamente contenente eme ed è localizzata esclusivamente nei perossisomi dove rimuove il perossido d'idrogeno prodotto principalmente durante l' α -ossidazione degli acidi grassi.

Numerosi altri enzimi sono coinvolti nella risposta allo stress ossidativo come le perossiredoxine (Prxs) e la metionina sulfossido reduttasi (MSR). Le perossiredoxine sono enzimi che catalizzano la riduzione di H_2O_2 , acidi grassi e ROOH e che sono distribuite largamente nei compartimenti intracellulari cioè nel citoplasma, mitocondri, perossisomi, reticolo endoplasmico e membrana plasmatica.

In molti processi patologici, l'effetto finale indotto dai radicali liberi dipende dall'equilibrio risultante tra la formazione e la degradazione dei radicali liberi stessi. A basse concentrazioni, i ROS svolgono dei ruoli fondamentali nelle cellule e sono le cellule stesse, in particolari e controllate condizioni, a produrre la quantità di ROS necessaria per lo svolgimento di funzioni biologiche quali la crescita cellulare, la morte per apoptosi, il differenziamento e la risposta immunitaria. In alcuni casi queste molecole sembrano comportarsi come veri e propri secondi messaggeri. Questi meccanismi sono stati messi in evidenza in processi riguardanti tanto l'espressione genica, attraverso l'attivazione o l'inattivazione di fattori trascrizionali, quanto la trasduzione del segnale.

4. SCOPO DELLO STUDIO

L'oggetto di ricerca alla base della presente tesi è quello di studiare le potenzialità in ambito oculistico dell'applicazione di un plasma freddo a pressione atmosferica e bassi livelli di potenza, per la cura di infezioni corneali difficilmente trattabili con le terapie convenzionali. A tal fine è stata progettata e realizzata un prototipo (non ottimizzato) di una innovativa sorgente di plasma, nella quale un flusso di elio viene ionizzato. Si è quindi analizzato l'effetto del plasma sia in vitro, su microrganismi patogeni e colture di fibroblasti di congiuntiva, sia in vivo, su cornee umane in toto. Si è voluto inoltre verificare l'andamento nel tempo e la dipendenza dai tempi di applicazione, del contenuto di ROS delle cellule umane trattate con il plasma. Poiché il plasma prodotto dalla sorgente qui proposta emette parte del proprio spettro nell'intervallo di lunghezze d'onda proprio delle radiazioni UV, è stata studiata la presenza di eventuali dimeri di timina nel DNA delle cellule trattate.

5. LA SORGENTE DI PLASMA

5.1 Il “plasma tube”

Questo lavoro di tesi ha prodotto lo sviluppo, in collaborazione con un gruppo di fisici del plasma che operano presso il Consorzio RFX della sezione di fisica del CNR di Padova, di un prototipo di un'innovativa sorgente al plasma che opera a bassa potenza e a pressione atmosferica (Martines, 2009).

La necessità di un nuovo tipo di sorgente, diverso da quelle già esistenti prodotti da altri gruppi di ricerca, come ad esempio il *plasma-needle* descritto nei capitoli precedenti, è nata dall'osservazione che tali sorgenti non garantivano un livello di sicurezza adeguato nel trattamento delle delicate superfici oculari, oggetto di questa tesi. I primi test eseguiti riproducendo ed utilizzando tale tipo di sorgenti hanno, infatti, evidenziato come il tipo di plasma prodotto da sorgenti a singolo elettrodo, in cui l'effetto punta di amplificazione del campo elettrico è fondamentale per la ionizzazione del gas, una volta applicato sulle cornee facilmente dà origine a scariche elettriche nella quale una corrente concentrata si chiude sulla superficie da trattare, provocando seri danni termici. Tale effetto è, ad esempio, alla base del funzionamento dei bisturi ad argon utilizzati già ampiamente nella chirurgia dell'addome e del torace.

L'effetto di concentrazione della scarica (arco elettrico) prodotto da una sorgente a singolo elettrodo è evidente in figura 5.1, nella quale è ritratta un'immagine ricavata durante il trattamento di un occhio porcino enucleato. La fascia intensamente luminosa che si estende dall'estremità della sorgente alla cornea è indice della presenza di una scarica elettrica.

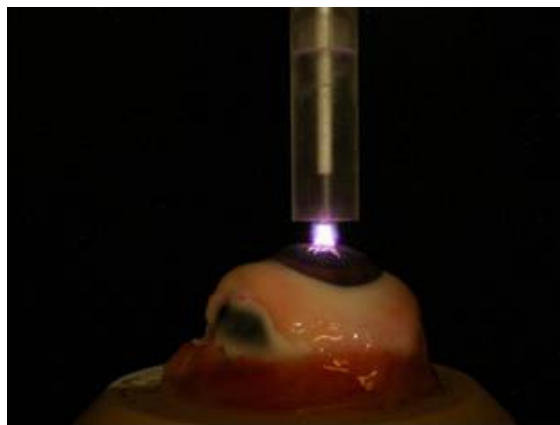


Figura 5.1: Immagine di una fase di trattamento di un occhio porcino mediante una sorgente di tipo *plasma-needle*. È evidente la formazione di un arco elettrico (scarica) che si estende dall'estremità della sorgente alla cornea. Tale tipo di sorgente non risulta adeguato alle necessità oculistiche.

È stato quindi necessario, con l'obiettivo di eseguire test in ambito oculistico, ideare e sviluppare un nuovo modello di sorgente che garantisse l'assenza di tale tipo di effetti potenzialmente pericolosi per l'occhio umano.

È stata quindi progettata una nuova sorgente (Figura 5.2), denominata "plasma tube", in grado principalmente di ionizzare un flusso di elio, di purezza pari a 99.9999%, che, mescolandosi con l'aria, produce il plasma freddo, all'estremità di un braccio di acciaio. La temperatura raggiunta dal gas rimasto neutro nel processo all'estremità della sorgente, è compresa tra i 17 e i 20 gradi ed è proporzionale alla potenza applicata e alla distanza dal substrato trattato. Tali valori, confrontabili con la temperatura ambiente sono un dato fondamentale per garantire la sicurezza da eventuale danno termico del trattamento, poiché lo scambio di calore tra il flusso di plasma e il substrato da trattare avviene tramite il gas neutro che costituisce la frazione predominante del flusso incidente.

Il plasma prodotto dalla sorgente ha l'aspetto di una sferetta, di qualche millimetro di diametro, che emette una luce bluastra, che cambia intensità e di colore a seconda delle condizioni sperimentali.

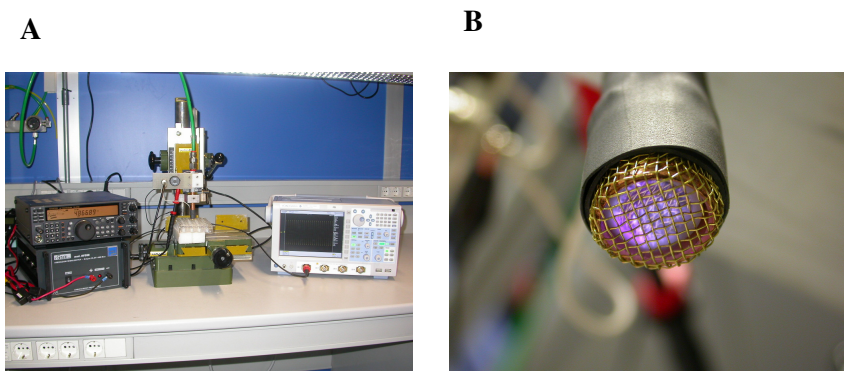


Figura 5.2: Sorgente di plasma freddo denominata “plasma tube” sviluppata in collaborazione tra la Clinica Oculistica dell’Università di Padova e il Consorzio RFX, del CNR di Padova: (A), immagine comprensiva dell’apparato di controllo meccanico; (B) dettaglio dell’estremità della sorgente, regione nella quale è prodotto il plasma, evidente sotto forma di una luce blu-violetta.

Per la produzione del plasma di elio, misto ad aria a pressione atmosferica, viene impiegata una tensione a radiofrequenza. In Figura 5.3 è mostrato uno schema che riproduce la sorgente del plasma. Come si può osservare, la sorgente è composta principalmente da due tubi coassiali di acciaio, del diametro di 10 mm e 12 mm rispettivamente, chiusi ad una estremità da griglie metalliche. I due tubi possono essere fatti scorrere uno rispetto all’altro per mezzo di una vite micrometrica, in modo da regolare con precisione la distanza tra le due griglie. I tubi sono separati da un ulteriore tubo di materiale isolante, che impedisce la formazione di plasma fra le pareti laterali dei tubi. In tal modo, le due griglie fungono da elettrodi. Per la produzione del plasma, un flusso di elio in un intervallo compreso tra 0.5 e 5 litri/minuto (il valore più utilizzato durante i test che sono descritti nella presente tesi è di 1.75 litri/minuto), viene fatto fluire nel tubo più interno; l’elio passa attraverso le due griglie e fuoriesce dall’estremità del dispositivo. Il tubo più esterno e la relativa griglia, sono connessi a terra, in modo da prevenire qualunque accidentale interazione elettrica fra il substrato da trattare e le parti in tensione. Il tubo più interno e la griglia ad esso connessa sono invece collegati ad un generatore di radiofrequenza operante ad una potenza di 5 W attraverso un opportuno circuito di accoppiamento (“matching network”). Il circuito di accoppiamento ha la doppia funzione di ridurre la potenza riflessa verso il generatore e di elevare il valore della tensione fino a valori dell’ordine dei 1000 V

picco-picco, che consentono l'innesco del plasma. Poiché la distanza tra le griglie che fungono da elettrodi è dell'ordine del mm, il campo elettrico indotto tra le griglie stesse e che provoca l'accelerazione degli elettroni raggiunge il valore di 1 MV/m. Nel prototipo usato per lo studio, il circuito di accoppiamento è costituito da un induttore da 100 μH e dalla capacità parassita del dispositivo, stimata intorno a 10 nF. In tal modo, la frequenza di risonanza viene a collocarsi intorno ai 4 MHz. Il plasma si forma nello spazio compreso tra le due griglie, dove all'elio va a mescolarsi anche una certa quantità di aria. Le specie chimiche reattive prodotte in questa regione vengono poi trasportate dal flusso di elio fino al substrato, che viene tipicamente posizionato 1-2 mm al di sotto della griglia esterna. La sorgente è montata su un supporto che ne consente una traslazione orizzontale e verticale per mezzo di opportune viti.

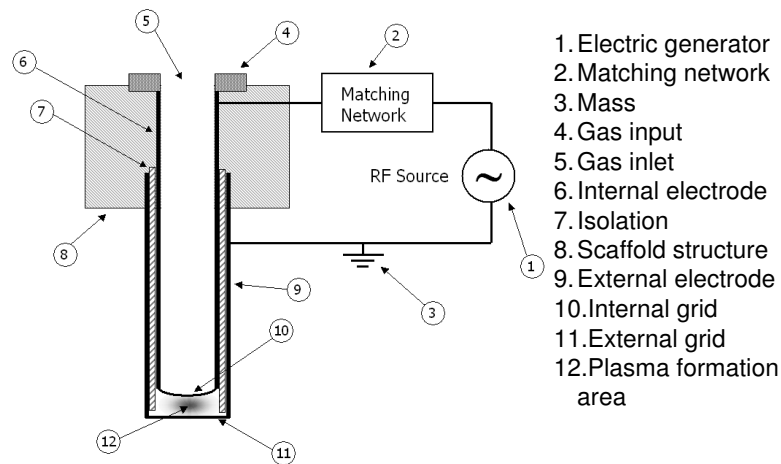


Figura 5.3: Schema tecnico della sorgente "plasma tube".

In Fig. 5.4 si osserva come il valore della tensione applicata alle griglie per un dato valore della potenza generata dalla sorgente a radiofrequenza dipenda dal valore del flusso di elio impostato. In particolare si osserva come a bassi valori di tale flusso (< 1 l/min) corrispondano elevati valori del campo applicato. Tale condizione corrisponde ad un livello di ionizzazione particolarmente scarsa del gas e quindi di una frazione di plasma prodotto estremamente modesta. Dal punto di vista visivo ciò corrisponde ad un plasma localizzato a spot sulla superficie

della sorgente. La transizione di oltre 60 V che si osserva nel passaggio a valori del flusso di elio superiori a un litro al minuto corrisponde invece alla generazione di un plasma diffuso su tutta la sezione della sorgente. Il valore di 1.75 l/min che è stato utilizzato durante le sperimentazioni qui descritte è stato quindi scelto come un buon compromesso tra l'avere un plasma diffuso ed un valore di flusso non eccessivo, in modo da ottenere un risparmio del gas in utilizzo.

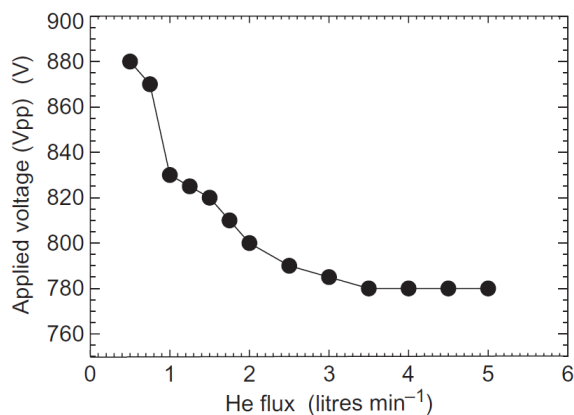


Figura 5.4: Tensione applicata tra le griglie in funzione del flusso di He utilizzato per un dato valore della potenza generata dalla sorgente a radiofrequenza.

5.2 Misura dello spettro d'emissione del "plasma tube"

La radiazione emessa dal plasma è stata misurata per mezzo di un Mini-spettrometro (Hamamatsu C10082 CA), integrato con una camera CCD del tipo "back-thinned" (2048 pixels) utilizzata come detector. Lo spettrometro misura in un intervallo di lunghezze d'onda comprese tra 200 e 830 nm in un singolo spettro, e presenta una dispersione circa costante al variare della lunghezza d'onda. Per raccogliere la radiazione emessa dalla sorgente di plasma è stata utilizzata una fibra ottica in quarzo del diametro di 1 mm, adattata allo spettrometro. Nella fase di misura essa è stata posizionata di fronte alla griglia esterna della sorgente stessa, ad una distanza di 2 mm, come mostrato in figura 5.5 dove è rappresentata un'immagine ripresa durante la raccolta dello spettro.

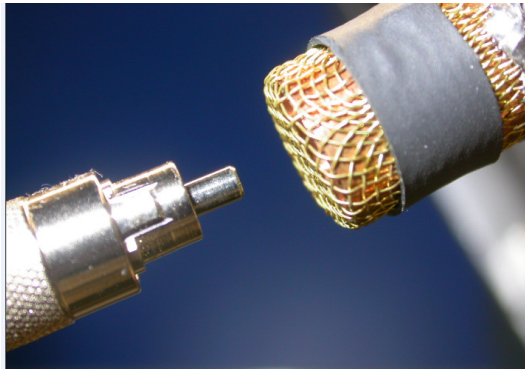


Figura 5.5: Immagine della tecnica di misura della radiazione emessa. Sulla sinistra si vede la fibra ottica utilizzata per la raccolta della radiazione posizionata di fronte alla griglia esterna della sorgente di plasma.

5.3 Spettro d'emissione dalla sorgente di plasma

Due tipici spettri ottenuti a temperatura ambiente, con un influsso di He pari a 1,751 l/min e 4.5 l/min impostando un tempo di integrazione pari a 300 ms, sono mostrati in Figura 5.6.

Gli spettri mostrano la presenza delle righe di emissione di molecole N₂ caratteristiche della banda vibrazionale, assieme ad un'alta concentrazione di radicali OH (306.357 nm), con la maggior parte delle righe concentrate nella regione dell'ultravioletto (UV).

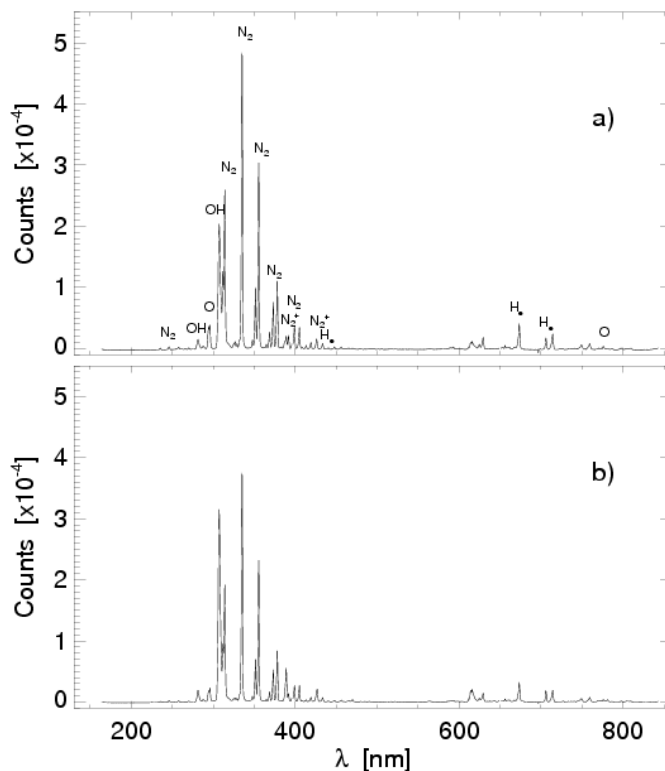


Figura 5.6: Spettri di emissione del plasma che mostrano un'alta intensità di radiazione nella regione degli UV. Le diverse linee spettrali sono indicate a seconda della loro origine: a) spettro ottenuto con un flusso di elio pari a 1.75 l/min; b) spettro ottenuto con un flusso di elio pari a 4.5 l/min.

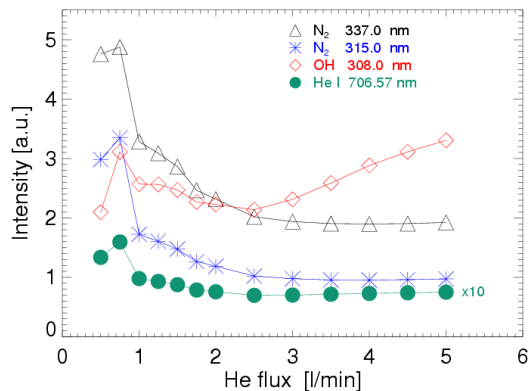


Figura 5.7: Intensità di alcune delle principali linee di emissione plottate in funzione del flusso di elio. L'intensità della riga di He I è moltiplicata per 10.

L'intensità di alcune righe selezionate (ottenuta tramite un fit gaussiano dei picchi presenti negli spettri di emissione) si osserva in Fig. 5.7 dipendere dal flusso di He. Nelle condizioni sperimentali corrispondenti ad un flusso di gas pari a 0.5 l/min l'intensità delle righe selezionate è bassa a causa dello scarso livello di ionizzazione di cui si è accennato in precedenza, e che dà luogo a regioni limitate di plasma a spot.

Per flussi di He superiori a 0.75 l/min si osserva la decrescita della riga dell' N_2 ed un aumento di quella del He accompagnati da un aumento delle righe associate ai radicali liberi dell'ossigeno OH e un aumento lieve delle righe di He I. Poiché non è stata considerata nella misura in oggetto la correzione data dalla calibrazione assoluta dello spettrometro utilizzato, l'intensità della riga di He I è stata moltiplicata per 10. Ciò si è reso necessario a causa di una sensibilità dello strumento che è particolarmente bassa per lunghezze d'onda dell'ordine dei 700 nm.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Colture batteriche e loro trattamento con plasma freddo

I ceppi di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizzati in questo studio sono stati isolati da campioni umani e forniti dal Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università degli Studi di Padova in colture su agar solido.

Una singola colonia batterica è stata quindi inoculata in terreno Luria-Bertani (LB) liquido per *E. coli* o terreno Brain Heart Infusion (BHI) liquido per *S. aureus* e *P. aeruginosa* ed incubata per 16 ore alla temperatura di 37°C sotto lenta agitazione. Il terreno LB liquido è stato preparato solubilizzando 1 g di Bactotriptide, 0,5 g Yeast Extract (entrambi forniti dalla ditta Becton Dickinson), 1 g di NaCl (Carlo Erba) ed aggiungendo NaOH 10 mM in 100 ml di acqua deionizzata. Il terreno BHI liquido è stato invece preparato solubilizzando 3,5 g di BHI (Becton Dickinson) in 100 ml di acqua deionizzata. Le soluzioni sono state quindi sterilizzate mediante ciclo in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Nella coltura è stata quindi valutata la concentrazione batterica mediante misura della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 590 nm. A tale scopo, la coltura batterica è stata diluita in LB o BHI fino ad ottenere una OD pari 0,1. Esperimenti condotti precedentemente sui tre diversi ceppi batterici hanno infatti evidenziato come a tale OD corrisponda una concentrazione batterica di 1×10^6 unità formanti colonia (cfu)/ml. La sospensione batterica è stata quindi diluita nel rispettivo terreno liquido fino alla concentrazione di 100 colonie batteriche in un volume finale di 100 μ l. La sospensione è stata quindi posta in pozzetti di piastre sterili da 24 pozzetti (100 colonie in 100 μ l su ogni pozzetto). In seguito è stato effettuato il trattamento con plasma freddo per 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 5 minuti. La distanza della sorgente del plasma dalla superficie della coltura in terreno liquido all'interno di ogni singolo pozzetto era pari a 1,5 mm. Un'immagine ripresa durante una delle fasi del trattamento è riportato in figura 6.1.

Al termine del trattamento con plasma, la sospensione batterica presente in ciascun pozzetto è stata prelevata e piastrata su LB o BHI solido ed incubata per 16 ore a 37°C. I terreni solidi sono stati preparati mediante aggiunta di 1g di agar (Becton Dickinson) in 100ml di LB o BHI liquido. La vitalità batterica in ogni campione è stata quindi determinata mediante conta delle colonie sviluppate.

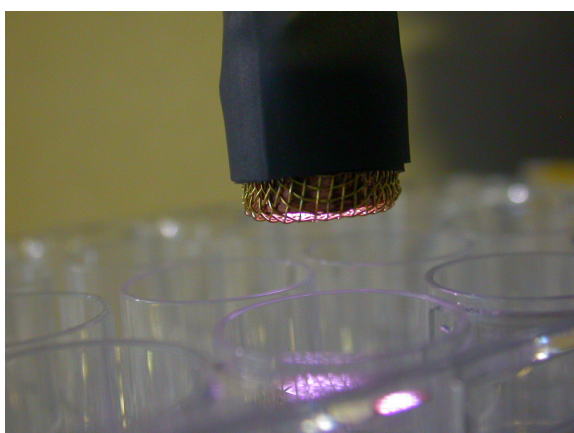


Figura 6.1: Immagine del *plasma-tube* durante una delle fasi dei trattamenti di colture cellulari in pozzetti.

6.2 Colture di *Candida albicans* e *Aspergillus* e loro trattamento con il plasma freddo

I ceppi di *Candida albicans* e *Aspergillus* utilizzati in questo studio sono stati isolati da campioni umani e forniti dal Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università degli Studi di Padova in colture su agar solido.

Una singola colonia fungina è stata quindi inoculata in terreno Breath Heart Infusion (BHI) liquido aggiunto di 0,1 mM ampicillina (Inalco) ed incubata per 24 ore alla temperatura di 37°C sotto lenta agitazione.

Nella coltura è stata quindi valutata la concentrazione fungina mediante misura della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 590 nm. A tale scopo, la coltura fungina è stata diluita in BHI fino ad ottenere una OD pari 0,1. Esperimenti condotti precedentemente hanno infatti evidenziato come a tale OD corrisponda una concentrazione di 1×10^5 unità formanti colonia (cfu)/ml. La sospensione

cellulare è stata quindi diluita nel rispettivo terreno liquido fino alla concentrazione di 100 colonie in un volume finale di 100 μ l. La sospensione è stata quindi posta in pozzetti di piastre sterili da 24 pozzetti (100 colonie in 100 μ l su ogni pozzetto). In seguito è stato effettuato il trattamento con plasma freddo per 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 5 minuti. La distanza della sorgente del plasma dalla superficie della coltura in terreno liquido all'interno di ogni singolo pozzetto era pari a 1,5 mm.

Al termine del trattamento con plasma, la sospensione cellulare presente in ciascun pozzetto è stata prelevata e piastrata su BHI solido ed incubate per 24 ore a 37°C. La vitalità fungina in ogni campione è stata quindi determinata mediante conta delle colonie sviluppate.

6.3 Colture di fibroblasti congiuntivali e loro trattamento con plasma freddo

Per lo studio esposto, sono state impiegati fibroblasti congiuntivali perché sono cellule che hanno caratteristiche molto simili a quelle dei cheratociti, i fibroblasti corneali, e sono di più facile reperibilità. I fibroblasti, sono stati estratti da biopsie di congiuntiva ottenute presso il Dipartimento di Neuroscienze, sezione di Oculistica, in seguito a operazioni chirurgiche in interventi per strabismo, cataratta o distacco di retina. Allo scopo, i campioni di tessuto sono stati tagliati con un bisturi in piccoli frammenti (2-3 mm²) che, ancora umidi, venivano messi sul fondo di una piastra Petri lasciati aderire per circa 30 minuti. E' stato quindi aggiunto delicatamente il terreno di coltura DMEM completo (DMEM 90% v/v, siero fetale bovino (FCS) 10% v/v, L-glutamina 4mM, Penicillina-Streptomicina 1% v/v) in volume sufficiente a coprire appena i pezzi di tessuti. Dopo circa due settimane di coltura, i primi fibroblasti migravano dai frammenti congiuntivali e (colonizzavano l'intera piastra) comparivano adesi al fondo della piastra. Controlli giornalieri venivano effettuati tramite visione al microscopio ottico invertito (OLYMPUS).

Le colture sono state successivamente espanse in vitro, alle opportune condizioni di coltura in terreno DMEM completo. Tutti i procedimenti sono stati effettuati in condizioni di sterilità in una cappa a flusso verticale (BIOHAZARD). Le colture sono state mantenute in incubatore (HERAEUS) a 37 °C, con una concentrazione di CO₂ al 5% ed una umidità relativa del 90%. Le cellule sono state lasciate

crescere fino a che non era raggiunta la confluenza, dopodiché sono state staccate dalla piastra di coltura mediante trattamento con tripsina. Il terreno è stato aspirato, e il monostrato è stato prima lavato con PBS (soluzione salina composta da Na_2HPO_4 40 mM, NaH_2PO_4 10 mM e NaCl 200 mM a pH 7.4) per eliminare i residui di siero, quindi trattato con una miscela di tripsina 0,05% v/v ed EDTA 0,02% v/v. Tale soluzione è stata lasciata agire a 37°C per 5 minuti; al termine dei quali l'azione dell'enzima è stata bloccata aggiungendo un uguale volume di terreno DMEM completo. Il contenuto della fiasca è stato raccolto in una provetta conica e centrifugato a 1200 rpm per 4 minuti. Il surnatante è stato poi aspirato, le cellule risospese in terreno di coltura completo, contate con l'ausilio della Camera di Burkner e riseminate alla densità voluta.

Il giorno precedente l'esperimento i fibroblasti sono stati quindi seminati in numero di 1×10^5 per pozzetto in piastre da 24, per il successivo trattamento con il plasma freddo per 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 5 minuti. Durante il trattamento la quantità di terreno per ogni singolo pozzetto era pari a 100 μl . Ogni trattamento è stato eseguito in triplo o quadruplo e sono stati predisposti svariati controlli.

6.4 Analisi della vitalità cellulare mediante test dell'MTT

Al fine di determinare gli effetti del trattamento con il plasma freddo sul tasso di proliferazione cellulare è stato effettuato il test dell' MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-dipheniltetrazolium bromide, SIGMA). Il saggio MTT misura in modo quantitativo la presenza di attività succinico-deidrogenasica nelle cellule in coltura. L'attività di questo enzima, presente nei mitocondri delle cellule vitali, viene normalmente utilizzata quale marker per verificare l'attività metabolica, la vitalità e/o la crescita delle cellule in coltura.

Il test si basa sulla conversione del composto chimico MTT, un colorante azolico di colore giallo, in sali di formazano, di colore blu, ad opera della succinico-deidrogenasi mitocondriale. La quantità di formazano, determinata spettrofotometricamente, è proporzionale alla presenza di tale enzima nella coltura e quindi, indirettamente, al numero delle cellule vitali.

Per valutare la vitalità cellulare una soluzione di 4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-dipheniltetrazolium bromide (MTT) (0,5 mg/ml) è stata aggiunta alle cellule dopo il trattamento con il plasma. La piastra di coltura è stata lasciata ad incubare per 3 ore a 37°C. La soluzione di MTT è stata quindi rimossa dai pozzetti e sostituita

con una quantità equivalente di soluzione estraente (isopropanolo 90% v/v, DMSO 10% v/v) per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo un'accurata risospensione si procedeva alla lettura spettrofotometrica (Pertkin Elmer) a 540 nm e 660 nm.

6.5 Determinazione dei livelli di ROS

In questi esperimenti è stato utilizzato un indicatore per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) denominato 2',7'-diclorodididrofluoresceina diacetato (H₂DCFDA). Questo composto risulta non fluorescente e permeabile alla membrana cellulare. Una volta entrato all'interno delle cellule esso viene deacetilato dalle esterasi intracellulari a formare il composto 2',7'-diclorodididrofluoresceina (H₂DCF) ed ossidato in presenza di ROS. L'ossidazione della sonda può essere individuata mediante l'aumento di fluorescenza rivelabile al fluorimetro (Hitachi F2000 Fluorescence Spectrophotometer, Japan) con lunghezza d'onda di eccitazione pari a 485 nm e di emissione di 530 nm.

Per effettuare l'esperimento le cellule sono state seminate in numero di 1×10^5 per pozzetto in piastre per coltura cellulare da 24 pozzetti. Il giorno seguente il fluoroforo H₂DCFDA è stato risospeso in volume opportuno di DMSO anidro per ottenere una concentrazione di 10 μ M ed è stato così aggiunto alle cellule precedentemente lavate e poste in una soluzione isotonica (NaCl 121 mM, HEPES 10 mM, HNaCO₃ 5 mM, KCl 4.7 mM, H₂KPO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1.25 mM, glucosio 10 mM). Il terreno di coltura cellulare è stato rimosso per evitare che le amine e gli indicatori presenti interferissero con la determinazione. Le cellule rimanevano a temperatura ambiente con la sonda per 30 minuti, allo scadere dei quali venivano lavate per 3 volte con il buffer isotonico. In seguito in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di terreno DMEM senza siero e le cellule sono state trattate con il plasma freddo per 2 minuti. Successivamente sono stati addizionati altri 300 μ l di terreno DMEM senza siero per ogni pozzetto e le cellule sono state lasciate incubare per tempi di attesa differenti pari a 2, 5, 30, 60 minuti, allo scadere dei quali il terreno è stato rimosso, le cellule lavate per tre volte con il buffer isotonico, permeabilizzate con il buffer implementato con Triton X-100 allo 0.5% v/v e staccate con l'ausilio di uno scraper. Il lisato cellulare ottenuto è stato centrifugato a 1200 rpm a 4°C per 10 minuti ed il sovranatante analizzato al fluorimetro.

I risultati ottenuti sono stati normalizzati ad un controllo negativo interno ad ogni esperimento costituito dalle cellule incubate solo con la sonda H₂DCFDA ma non trattate.

Per verificare se i ROS presenti nelle colture cellulari, dopo il trattamento con il plasma, fossero prodotti dalle cellule stesse, è stato eseguito un esperimento in cui veniva inibita la produzione di ROS da parte delle cellule stesse, da parte dell'N-acetil-cisteina (Sigma). L'N-acetil-cisteina possiede dirette capacità antiossidanti grazie alla presenza di gruppi tiolici che interagiscono direttamente con i gruppi elettrofili dei ROS. Inoltre l'N-acetil-cisteina ha anche un effetto antiossidante indiretto, essendo un precursore del GSH e causando quindi l'aumento a livello intracellulare del glutatione ridotto.

A tal fine, dopo il trattamento con il fluoroforo H₂DCFDA delle colture di fibroblasti, e ai successivi lavaggi, è stato aggiunto il composto N-acetil-cisteina 5mM, per 30 minuti a temperatura ambiente. I pozzetti di coltura sono stati quindi lavati per 2 volte con il buffer isotonico; successivamente è stato aggiunto il terreno DMEM senza siero e si è proceduto con il trattamento con il plasma e la successiva rivelazione dei livelli di ROS al fluorimetro (BMG LABTECH).

6.6 Determinazione della concentrazione proteica

Al fine di normalizzare i risultati ottenuti con la sonda H₂DCFDA, il lisato cellulare utilizzato per quantificare la presenza di ROS è stato sottoposto a determinazione della concentrazione proteica mediante saggio con acido bicinconinico (BCA). A tale scopo, 25 µl del surnatante di ogni campione sono stati trasferiti in piastra da 96 pozzetti ed addizionati di pari volume di reagente fornito nel kit Micro BCA Protein assay (Pierce). La reazione è stata incubata al buio a 37°C per 30 minuti circa e quindi analizzata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 620 nm. La concentrazione proteica in ogni campione è stata quindi calcolata mediante regressione lineare con i valori ottenuti da una curva standard allestita mediante diluizioni successive a concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA, Sigma) e saggiata parallelamente ai campioni.

6.7 Colture di cornee umane in toto

Le cornee umane utilizzate provenivano dalla Fondazione Banca degli Occhi (situata a Venezia Mestre), centro di riferimento nazionale per la raccolta e la distribuzione di tessuti corneali per i trapianti. Per questo studio sono stati utilizzati innesti corneali considerati non idonei al trapianto.

I motivi di esclusione possono essere dovuti a: controindicazioni del donatore (per esempio comportamenti a rischio, possibilità di infezioni batteriche o virali nel periodo finestra, neoplasie maligne o malattie del sistema nervoso centrale); traumi meccanici insorti durante il prelievo; contaminazioni della cornea; inadeguato campione di sangue del donatore; inadeguata densità cellulare endoteliale; inadeguata morfologia endoteliale; mortalità endoteliale; anomalie stromali o esiti di chirurgia della cornea.

Gli anelli corneo-sclerali umani sono stati prelevati entro 24 ore dalla morte del donatore in seguito ad un trattamento oculare con iodio-povidone 0.5% (p/v) per 2 minuti e lavaggio con una soluzione salina sterile. Gli anelli corneo-sclerali sono stati poi conservati a 4 °C in terreno Corneal Chamber (AL.CHI..MI.A., Padova, Italy) composto da MEM-Earle, Hepes 25 mM e destrano-T500 al 6%.

Il processamento delle cornee in coltura è stato effettuato sotto cappe a flusso laminare in stretta asepsi.

Le cornee, dopo essere state visionate per escludere anomalie strutturali, sono state poste in contenitori di vetro immerse in liquido di conservazione a base di MEM-Earle (Tissue-C, AL.CHI..MI.A., Padova, Italy) con Hepes 25 mM, bicarbonato di sodio 26 mM, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM e siero di vitello 2% (v/v). Per evitare contaminazioni da funghi e batteri il terreno è stato addizionato con amfotericina B 0.25 mg/ml, penicillina G 60 mg/ml e streptomycina 100 mg/ml.

La temperatura di conservazione delle colture corneali è stata pari a 31 °C con umidità pari a quella ambientale secondo quanto descritto in Zanetti et al., 2005.

6.8 Trattamento delle cornee umane con plasma freddo

Prima dell'esposizione al plasma, le cornee umane complete sono state osservate al microscopio invertito (Zeiss Axiovert 25), per verificarne l'integrità strutturale.

Per gli esperimenti, sono state utilizzate coppie di cornee gemelle, una per il trattamento e l'altra, la contro laterale, per il controllo. Fino al momento dell'esposizione al plasma, le cornee sono state mantenute in coltura in sospensione, in terreno DMEM, contenente il 5% di siero fetale bovino. Per il trattamento, le cornee sono state poste all'interno di capsule di coltura *Petri*, con PBS. L'esposizione è avvenuta per 5 minuti, la distanza tra la sorgente del plasma e l'organo è stata di circa 2 mm e il flusso di gas elio di 1,75 litri /minuto. Un'immagine ripresa durante uno di tali trattamenti è riportata in figura 6.2. L'esperimento è stato eseguito in triplo, con tre differenti coppie di cornee. Dopo il trattamento, ogni cornea è stata tagliata in 2 parti uguali: una fissata in formalina per poi essere inclusa in paraffina per l'analisi istologica e l'altra è stata inclusa in glutaraldeide all'1,5%, v/v, per l'indagine ultrastrutturale al microscopio elettronico.

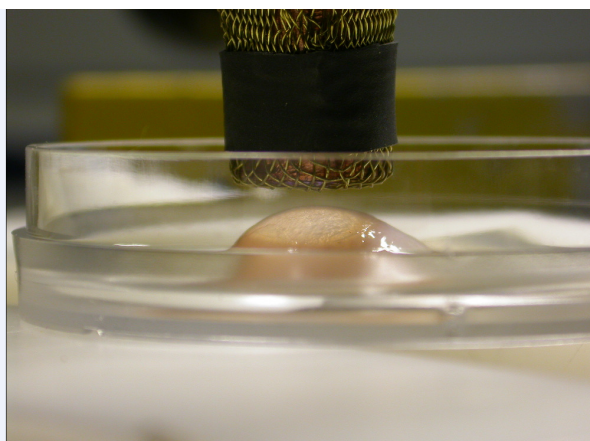


Figura 6.2: Immagine ripresa durante il trattamento mediante plasma freddo di cornea umana.

6.9 Analisi morfologica delle cornee trattate con plasma freddo

a) Analisi istologica

I pezzi di cornea inclusi in paraffina sono stati sezionati in fette dello spessore di 5 μm con il microtomo (Zeiss), colorati con ematossilina ed eosina ed esaminati al microscopio ottico (Zeiss), al fine di rilevare eventuali lesioni tissutali causate dal plasma.

b) Analisi dell'ultrastruttura dei tessuti mediante microscopia elettronica

Per l'indagine ultrastrutturale al microscopio elettronico (ME), la parte di cornea trattata e fissata in glutaraldeide 3%, è stata lavata con in tampone di Na-Cocodilato 0,1 M a pH 7,2, fissata nuovamente con 1% di OsO₄ (in tampone cocodilato) per 1 ora, lavata con la soluzione tampone, risciacquata in acqua distillata e disidratata attraverso una serie ascendente di alcoli (30-100%). Il pezzo di cornea in analisi è stato successivamente incluso in Durcupan (Fluka), tagliato all'ultramicrotomo (Ultracut, REICHTER-JUNG), per ottenere le sezioni semifini (0.5 µm). Tali sezioni semifini sono state colorate con blu di toluidina-O (MERCK) all'1% e impiegate nella scelta delle parti del preparato da osservare al ME. Da tali parti sono state ottenute delle sezioni ultrafini con l'ultramicrotomo e la punta di diamante. Le sezioni ultrafini sono state raccolte su griglie in rame, contrastate con citrato di piombo ed esaminate al microscopio elettronico PHILIPS M400.

6.10 Analisi della presenza di dimeri di timina nel DNA delle cellule trattate con il plasma.

Il danno più grave provocato dalle radiazioni UV è a carico del DNA ed è costituito da una modificazione chimica delle basi azotate che consiste nella formazione di dimeri di timina. Per verificare se le poche radiazioni UV presenti nel plasma di elio da noi utilizzato avessero effetti tossici sulle cellule, è stata analizzata l'eventuale presenza dei dimeri di timina nel DNA delle cellule, dopo trattamento. A tal fine, è stato utilizzato un anticorpo monoclonale in grado di reagire specificatamente con i dimeri di timina stessi (anti-TD mAb), presenti sia nel DNA doppio filamento, sia nel DNA a singolo filamento.

Il giorno precedente l'esperimento, 1×10^5 fibroblasti sono stati seminati in piastre di coltura da 12 pozzetti, su vetrini coprioggetto sterilizzati e posti sul fondo degli stessi pozzetti. Per il trattamento con il plasma, le cellule sono state lasciate nei pozzetti di coltura con 300 µl, ed esposte al plasma per 2 minuti. Successivamente, le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4%, v/v, e conservate a -20 °C.

Per mettere in evidenza eventuali dimeri di timina generati dal plasma, il monostrato cellulare sul vetrino coprioggetto è stato lavato con una soluzione di bloccaggio composta da PBS, Triton X-100 0.2% v/v ed albumina serica bovina (BSA, Sigma) 5% v/v, per 1 ora, a temperatura ambiente. Successivamente è

stato lavato con PBS e BSA 1% v/v, incubato con l'anticorpo primario anti dimeri di timina, (KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY, 1:40) per 45 minuti a 37 °C e successivamente, overnight a 4°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate per tre volte con PBS e incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con fluoresceina (VECTOR LABORATORIES, 1:100), per 1 ora a 37 °C. Dopo i lavaggi (3 di 5 minuti ciascuno in PBS e BSA 1% v/v e 2 di 5 minuti in PBS), le cellule sono state contro-colorate con una soluzione di Hoechst 5% v/v, che ne evidenzia i nuclei. Come controllo positivo, sono state utilizzati fibroblasti di congiuntiva della stessa preparazione cellulare, ed esposte ai raggi UV (lunghezza d'onda di 254 nm e potenza di 40mJ), per 10 minuti, all'interno di un UV-Tratalinker 1800 (Stratagen). I vetrini infine sono stati montati con un gel acquoso (Glycergel, DAKO).

6.11 Analisi statistica

I risultati degli esperimenti per valutare la produzione dei ROS, a tempi differenti dopo il trattamento delle cellule con il plasma, con o senza l'aggiunta dell'antiossidante, sono stati analizzati mediante analisi statistica tipo ANOVA, non parametrica, utilizzando il Kruskal-Wallis test e il Dunn's Multiple Comparison test. Sono state considerate statisticamente significative differenze con $P < 0.05$.

7. RISULTATI

7.1 Effetti del plasma freddo sui microrganismi patogeni

L'effetto antimicrobico del plasma freddo è stato analizzato su colture di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, trattate per intervalli di tempo crescenti (da 30 secondi a 5 minuti). Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è stato espresso come percentuale rispetto ai controlli non trattati, ed è stato calcolato il Decimal Reduction Time, o D-value, che corrisponde al tempo necessario alla popolazione cellulare per ridursi ad un decimo del numero originario di colonie, ossia il tempo di trattamento con il plasma tale da ottenere una riduzione microbica del 90%.

La Figura 7.1 mostra i risultati ottenuti con il trattamento al plasma di *E. coli*, protratto per tempi diversi. Si può osservare come l'effetto battericida sia quasi completo a 2 minuti, con un D-value pari a 0,94 minuti. Questo effetto è paragonabile a quello riscontrato con l'esposizione di *S. aureus* per i stessi tempi. In questo caso (Figura 7.2), si ha una riduzione della vitalità batterica al 30% già dopo soli 30 secondi di trattamento e valori vicini allo zero dopo 1,5 minuti (D-value pari a 1,64 minuti).

L'azione battericida del plasma, invece, appare meno efficace su *P. aeruginosa* (Figura 7.3). Infatti, la presenza dei batteri appare ridotta al 50% e del 100%, rispettivamente con 1 minuto e 5 minuti di trattamento. Il D-value calcolato è pari a 2,28 minuti.

L'analisi dell'effetto su *C. albicans* (Figura 7.4) ha dimostrato come questa specie fungina sia più resistente dei batteri, all'azione del plasma. Infatti, dopo 2 min di trattamento, la vitalità cellulare è ridotta del 40% e dopo 5 minuti del 60%. In questo caso, il D-value calcolato è pari a 10,89 minuti.

L'analisi dell'effetto su *Aspergillus* (Figura 7.5) ha invece dimostrato come il plasma freddo sia particolarmente efficace su questa specie fungina; tale effetto può probabilmente essere associato alla struttura filamentosa dell'*Aspergillus*

stesso. Infatti, già dopo circa 1 min di trattamento, la vitalità cellulare è ridotta del 90%.

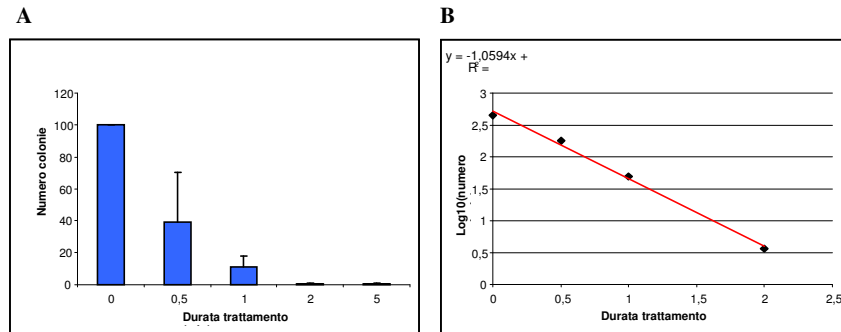


Figura 7.1: Esposizione al plasma freddo di colture di *E.coli*, per tempi diversi. Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è espresso come percentuale rispetto alle colture di controllo (A) e in funzione logaritmica (B). Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

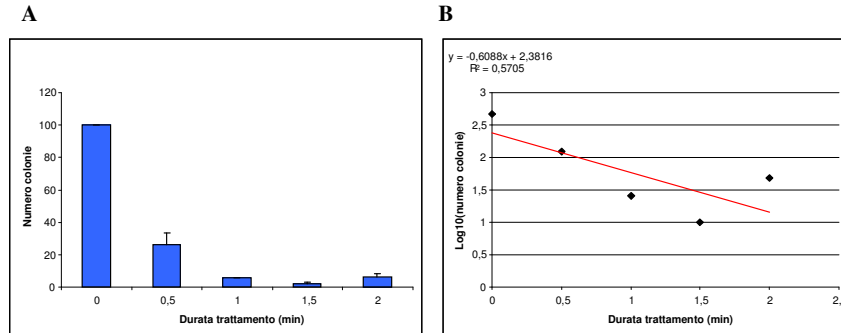


Figura 7.2: Esposizione di colture di *S.aureus* al plasma freddo per tempi diversi. Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è espresso come percentuale rispetto alle colture di controllo (A) e in funzione logaritmica (B). Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

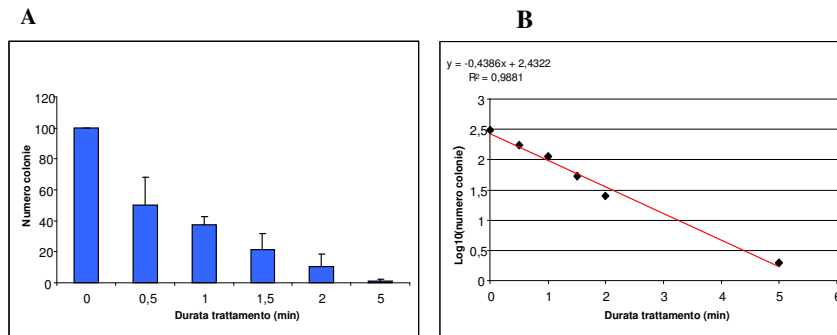


Figura 7.3: Esposizione di colture di *P.aeruginosa* al plasma freddo per tempi diversi. Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è espresso come percentuale rispetto alle colture di controllo (A) e in funzione logaritmica (B). Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

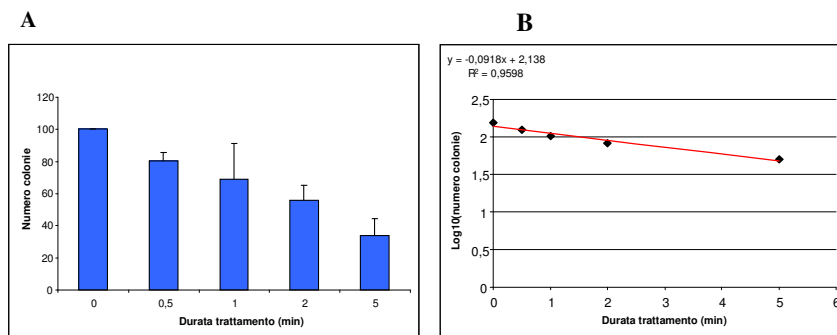


Figura 7.4: Esposizione di colture di *C.albicans* al plasma freddo per tempi diversi. Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è espresso come percentuale rispetto alle colture di controllo (A) e in funzione logaritmica (B). Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

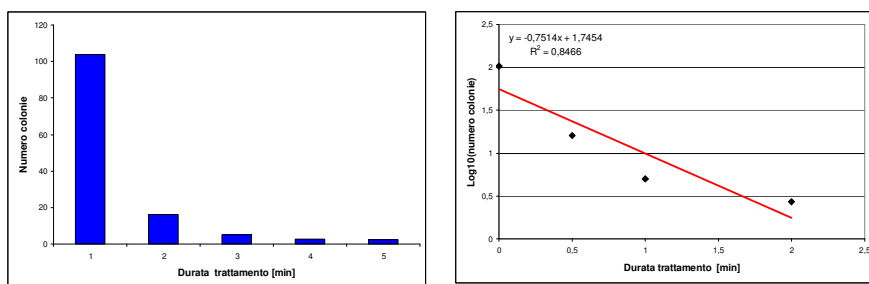


Figura 7.5: Esposizione di colture di *Aspergillus* al plasma freddo per tempi diversi. Il numero di colonie presenti dopo il trattamento è espresso in valore assoluto (A) e in funzione logaritmica (B). Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

7.2 Esposizione del plasma freddo di colture in monostrato di fibroblasti umani di congiuntiva

La vitalità delle cellule esposte al plasma freddo è stata verificata utilizzando le stesse modalità e gli stessi tempi di trattamento impiegati con i batteri. Si è potuto così evidenziare come tale esposizione non determini alcun decremento statisticamente significativo della vitalità cellulare nelle colture trattate (Figura 7.6).

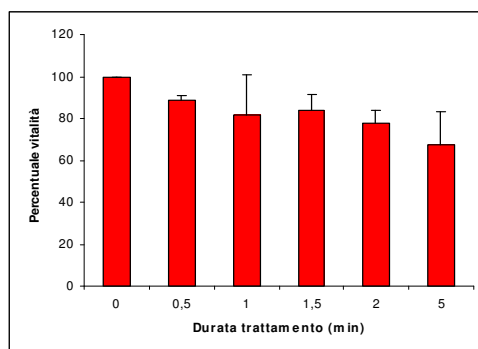


Figura 7.6 : Vitalità cellulare di colture di fibroblasti umani di congiuntiva esposti al plasma freddo per tempi diversi. Ogni trattamento è stato eseguito in triplo.

7.3 Determinazione dei livelli di ROS prodotti dai fibroblasti umani di congiuntiva, in seguito al trattamento

La quantità di ROS presenti nei fibroblasti in coltura, è stata misurata a intervalli di tempo diversi, successivamente all'esposizione al plasma per due minuti. Il grafico (Figura 7.7) mostra come vi sia un picco massimo di produzione di ROS , dopo 30 secondi dal trattamento. Successivamente, tale produzione diminuisce (5 minuti) per diventare prossima allo zero, dopo 30 minuti. La differenza di produzione risulta essere significativa tra i 30 secondi e i 30 minuti e tra i 5 minuti e i 30 minuti. Dopo un'ora dall'esposizione, si può osservare un lieve aumento di produzione di ROS, che però non risulta statisticamente significativo.

Per verificare che i ROS misurati siano principalmente prodotti dalla cellula in seguito al trattamento con il plasma, si è verificato l'effetto del l'-N-acetil-cisteina, un antiossidante, sui livelli di ROS prodotti dalle cellule trattate con plasma. La

Figura 7.8 mostra come l'aggiunta di questo antiossidante determini una significativa diminuzione dei livelli di ROS sia a 30 secondi che a 5 minuti dopo l'esposizione.

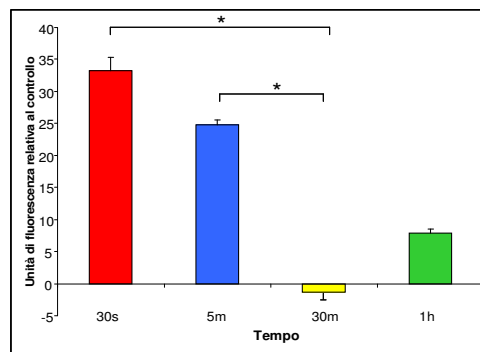


Figura 7.7: Esposizione di colture di fibroblasti umani di congiuntiva al plasma freddo per 2 minuti. Determinazione dei livelli di ROS prodotti dopo differenti tempi. Ogni trattamento è stato eseguito in triplo. *= $p < 0.01$

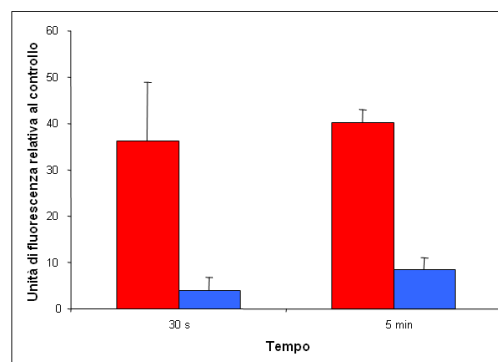


Figura 7.8: Esposizione di colture di fibroblasti umani di congiuntiva al plasma freddo per 2 minuti. Determinazione dei livelli di ROS dopo differenti tempi (rosso, $n=3$) e con l'aggiunta dell'antiossidante N-acetil-cisteina (blu, $n=2$).

* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$

7.4 Determinazione dei livelli di ROS prodotti dalle cellule batteriche e fungine, in seguito al trattamento

La quantità di ROS presenti nelle cellule batteriche e fungine in coltura, è stata misurata dopo trattamenti al plasma di durata diversa. Il grafico (Figura 7.9) mostra come la risposta di produzione di ROS sia massima per le specie per le quali il tempo di decimazione della carica batterica è risultato inferiore. In particolare, si osserva come la *Candida albicans* sottoposta al trattamento al plasma presenti una produzione di ROS estremamente bassa.

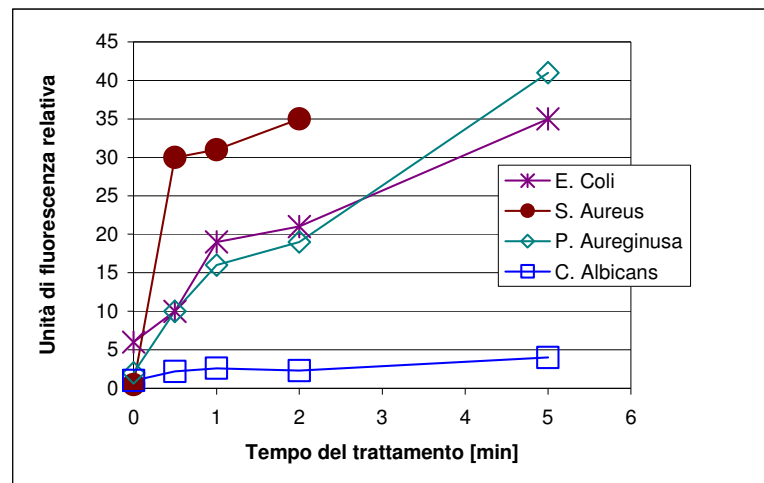


Figura 7.9: Esposizione di colture batteriche e fungine. Determinazione dei livelli di ROS dopo differenti tempi di trattamento al plasma.

7.5 Effetto delle radiazioni UV contenute nel plasma sulle colture di fibroblasti umani della congiuntiva

L'eventuale presenza di mutazioni del DNA cellulare, quali i dimeri di timina, tipiche del danno da radiazioni UV, è stata verificata con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale in grado di reagire specificatamente con i dimeri di timina stessi attraverso un'indagine di immunofluorescenza.

L'osservazione dei campioni di cellule trattate con il plasma, secondo le modalità esposte nei precedenti paragrafi, non rileva alcuna positività, con i tempi di esposizione utilizzati (Figura 7.11).

Come controllo positivo, sono state utilizzate colture in monostrato di fibroblasti umani di congiuntiva, esposti a radiazioni UV per 10 minuti (Figura 7.10).

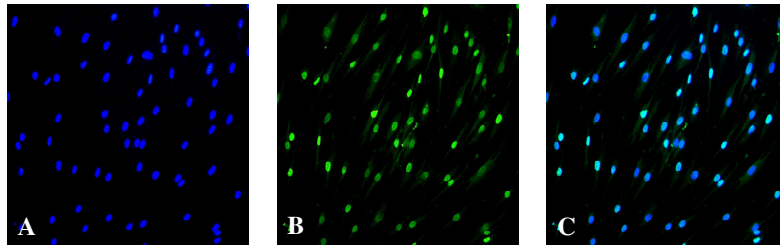


Figura 7.10: Immunofluorescenza di colture in monostrato di fibroblasti umani di congiuntiva esposti a radiazioni UV, i vetrini venivano usati come controllo positivo per le colorazioni su campioni trattati con il plasma. Colorazione con Hoechst (A), con l'anticorpo anti-dimeri di timina (B), merge (C), 20X.

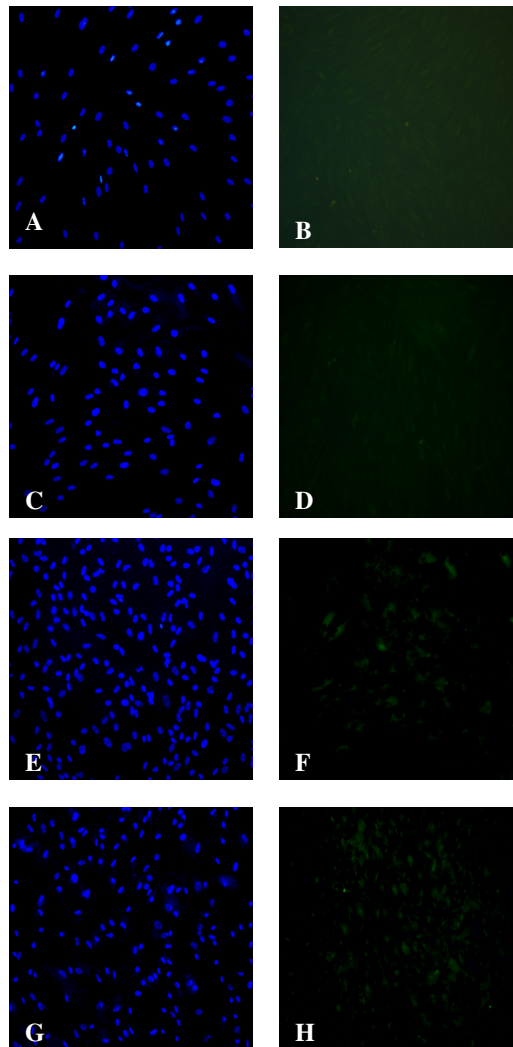


Figura 7.11: Colorazione con Hoechst (A,C,E,G) e con l'anticorpo anti-dimeri di timina (B, D, F, H) di:

- fibroblasti umani di congiuntiva non trattati, controllo negativo (A e B);
- fibroblasti umani di congiuntiva trattati con il plasma per 30 secondi (C e D);
- fibroblasti umani di congiuntiva trattati con il plasma per 2 minuti (E e F);
- fibroblasti umani di congiuntiva trattati con il plasma per 5 minuti (G e H).

20X.

7.6 Esposizione al plasma freddo delle cornee umane: analisi istologica e ultrastrutturale

Le cornee utilizzate nello studio sono state precedentemente analizzate da un punto di vista morfologico, con l'uso di un microscopio invertito che, data la trasparenza dell'organo, consente l'osservazione dei vari tipi di tessuto, componenti la cornea. Come si può osservare dalla Figura 7.12, tali cornee presentavano una normale architettura tissutale.

Dopo esposizione al plasma freddo per 5 minuti, le cornee sono state opportunamente trattate, sezionate e colorate. L'analisi istologica al MO dei preparati (Figura 7.13), ha rilevato come la struttura dei tessuti trattati sia paragonabile a quella dei controlli. Il numero degli strati epiteliali è rimasto inalterato, anche se si è notato un lieve distacco del primo strato epiteliale alla superficie delle cornee trattate, rispetto ai controlli (cornea controlaterale).

La microscopia elettronica (Figura 7.14) ha rilevato come le cellule epiteliali mantengano un' ultrastruttura paragonabile a quello dei controlli. Il numero degli strati cellulari rimane costante, anche se le cellule che li compongono perdono un po' il contatto tra di loro. L'ultimo strato epiteliale poggia su una membrana basale, alla quale è ancorato da rari emidesmosomi. Lo stroma delle cornee trattate, non appare sostanzialmente diverso da quello dei controlli. Entrambi i preparati comprendo corneociti con piccoli vacuoli interni, la cui presenza potrebbe essere imputata ad una sofferenza cellulare per i lunghi tempi di permanenza in coltura dei tessuti corneali.

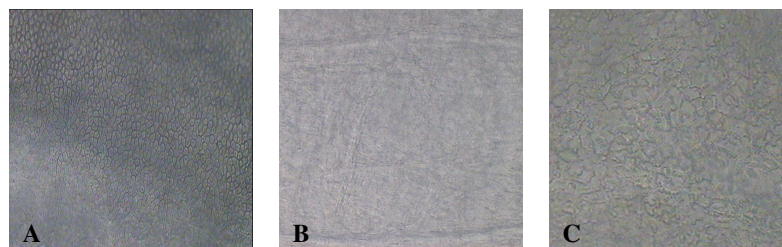


Figura 7.12: Morfologia di una cornea. Epitelio (A), stroma (B), endotelio (C). Ingrandimento 200X.

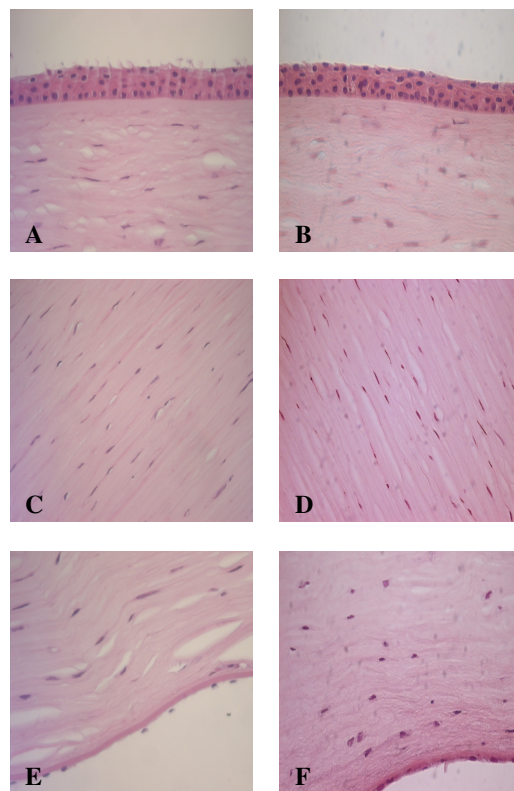


Figura 7.13: Colorazione con HE di sezioni di cornea umana trattata con il plasma (A, C, E) e della rispettiva controlaterale di controllo (B, D, F). Epitelio (A e B), stroma (C e D) ed endotelio (E ed F), 40X.

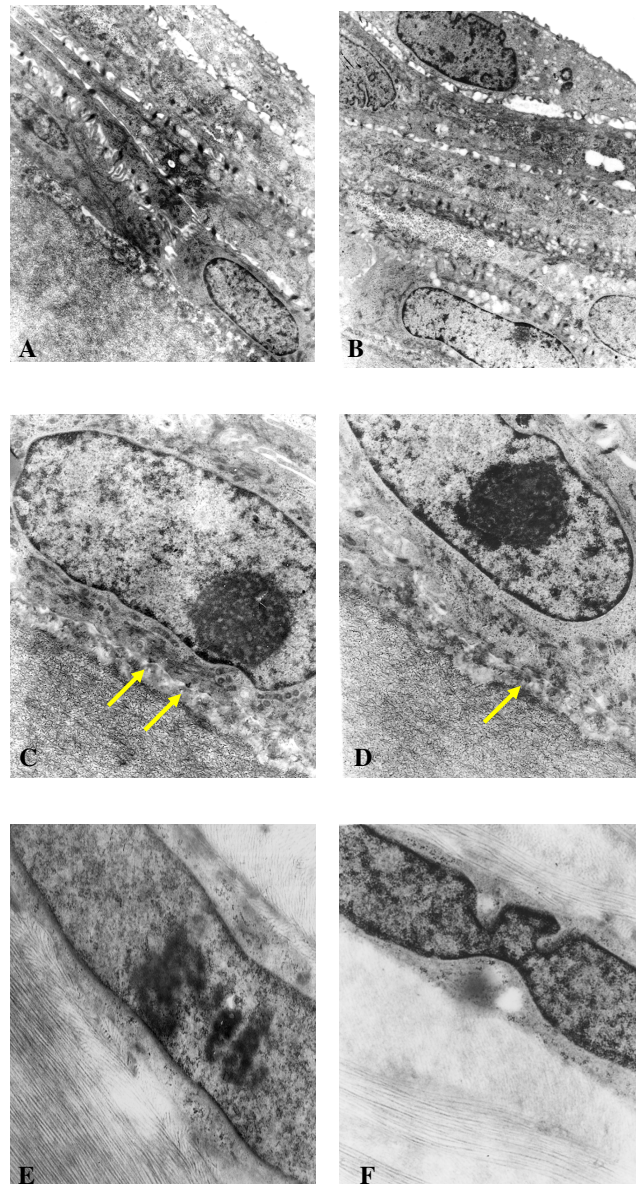


Figura 7.14: Ultrastruttura corneale: trattato (A, C, E) e controllo (A, D, F). Epitelio costituito da più strati di cellule (A e B), 4500X. Porzione di una cellula epiteliale poggiante sulla membrana basale (C e D), 10000X. Le frecce indicano gli emidesmosomi. Porzione di un fibroblasto dello stroma, o cheratocita (E ed F), 16500X.

7.7 Altri test preliminari:

Si può citare che sono stati eseguiti anche degli ulteriori test preliminari, che necessitano di un numero maggiore di indagini per il loro perfezionamento e per raggiungere una qualche validità statistica. In particolare, tra tali prove possiamo citare il trattamento mediante plasma freddo di cornee umane espianate sulle quali era stata indotta un'infezione corneale mediante inoculazione localizzata stromale dei ceppi batterici già citati e mediante abrasioni epiteliali. I risultati di tali test preliminari hanno dimostrato come la sorgente qui proposta sembra, in effetti, in grado di abbassare in modo significativo la carica batterica anche dopo soli due minuti di esposizione, rispetto a quella presente nelle cornee di controllo. Va sottolineato come nelle cornee trattate il numero di colonie batteriche sia risultato pari a zero. Tale dato, a dir poco incoraggiante, va però come detto, confermato da test più approfonditi e ripetibili dal punto di vista delle condizioni sperimentale.

E' inoltre importante riportare come test preliminari siano stati eseguiti su colture virali erpetiche (virus Herpes Simplex) in vitro, per le quali il plasma non sembra proporsi come trattamento efficace. Anche tali test necessitano di conferme per poterne dedurre una qualche significatività.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Nel presente lavoro di tesi sono stati presentati i risultati di una sperimentazione volta a investigare le potenzialità in ambito biomedico, ed in particolare oftalmologico, del trattamento di superfici biologiche mediante plasma freddo.

E' possibile dividere schematicamente la ricerca in due fasi principali. La prima dedicata alla progettazione e alla realizzazione di un'innovativa sorgente di gas ionizzato (plasma) adatta a scopi biomedici è stata svolta in collaborazione con un gruppo di fisici del plasma del Consorzio RFX del CNR di Padova, dove si studiano plasmi di interesse per la fusione termonucleare controllata a confinamento magnetico.

Il plasma prodotto dalla sorgente sviluppata è costituito da una popolazione ionica a temperatura prossima a quella ambiente ed da una elettronica ad alta energia (10000-20000 K), generate in condizioni di pressione atmosferica, e a bassi livelli di potenza. Tali condizioni rendono il plasma prodotto compatibile con le esigenze biologiche. La particolare configurazione della sorgente qui proposta la rende intrinsecamente sicura rispetto ad eventuali contatti elettrici tra il materiale da trattare e la sorgente stessa.

La seconda fase della ricerca, svolta in collaborazione estesa all'Istituto di Istologia e Microbiologia dell'Università di Padova, è stata dedicata all'analisi degli effetti del trattamento mediante il plasma prodotto dalla sorgente in esame, su un vasto campione di superfici biologiche, con particolare attenzione a quelle oculari.

I risultati ottenuti hanno dimostrato come il plasma freddo, con le caratteristiche di quello da noi utilizzato, possa essere considerato una buona terapia alternativa per il trattamento delle patologie oculari infettive, riducendo notevolmente la vitalità dei microrganismi patogeni, ma non quella dei fibroblasti umani di congiuntiva.

L'obiettivo della sperimentazione è stato di verificare, in particolare, la possibilità di proporre il trattamento mediante plasma freddo come metodo terapeutico per infezioni oculari di varia natura.

L'azione antimicrobica del plasma freddo che è stata verificata mediante una serie di esperimenti in vitro su diverse colture batteriche e fungine, è stata proposta in letteratura essere dovuta principalmente alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Laroussi et al., 2004). Con il nostro studio abbiamo dimostrato come le colture di cellule umane trattate contengano una grande quantità di ROS, che però si riduce drasticamente, già 30 minuti dopo l'esposizione e quindi, indirettamente, che i fibroblasti umani rispondono meglio dei batteri e dei funghi da noi testati, all'attacco dei ROS. Inoltre, l'aggiunta di un antiossidante come la N-acetil-cisteina, che possiede dirette ed indirette capacità antiossidanti, prima dell'esposizione al plasma, è in grado di diminuire drasticamente la presenza dei ROS, dimostrando quindi che le cellule stesse rispondono al trattamento producendo specie molecolari reattive. I risultati prodotti con i fibroblasti di congiuntiva, si possono ragionevolmente estendere ai fibroblasti di cornea (cheratociti), che hanno caratteristiche molto simili, ma anche a tutte le altre cellule eucariote umane. Possiamo quindi concludere che, in generale, le cellule eucariote umane sono in grado di difendersi efficacemente dall'azione dei ROS, siano essi contenuti nel plasma o prodotti dalle cellule in risposta al trattamento con il plasma stesso. I batteri, sia quelli Gram-positivi che quelli Gram-negativi, soccombono più rapidamente della *Candida* all'azione delle specie ossidanti. Un forte effetto del trattamento al plasma si è invece osservato sull'*Aspergillus*. Ciò potrebbe essere spiegato sia con il fatto che i procarioti posseggono solo alcuni sistemi antiossidanti, ma soprattutto con la diversa organizzazione cellulare dei diversi tipi di microrganismi. Infatti, i procarioti non hanno una compartimentazione interna (che circonda e protegge all'interno di organelli set enzimatici specifici) e hanno un DNA praticamente nudo e a filamento unico, e quindi un'informazione genica in singola copia che, una volta mutata, può difficilmente essere riparata. I fibroblasti, essendo cellule animali degli eucarioti superiori, e quindi più grandi e più complesse di quelle degli eucarioti più semplici, unicellulari, quali la *Candida*, sono in grado di difendersi dai ROS attivando in tempi brevi sistemi antiossidativi che abbassano i livelli di ROS. Inoltre, nel valutare la risposta ai ROS delle cellule umane *in vivo*, in quanto componenti di un complesso sistema pluricellulare, dobbiamo tener conto del fatto che esse si avvalgono anche di sistemi antiossidativi sistemici che arrivano a loro attraverso la corrente sanguigna.

Il nostro studio ha dimostrato come le radiazioni UV contenute nel plasma non siano dannose per le cellule, confermando così alcuni dati sperimentali già presenti in letteratura (Hermann et al., 1999; Laroussi, 2002; Sladek et al., 2006).

Tali risultati sono importanti in quanto indicano come il plasma freddo possa essere considerato una buona terapia alternativa per il trattamento delle patologie oculari infettive. Infatti, un buon trattamento terapeutico antimicrobico si basa sul principio della tossicità selettiva, e cioè sul fatto che esso possa essere utilizzato solo se è nocivo per i parassiti ma relativamente innocuo per le cellule dell'ospite. Sino ad oggi sono state scoperte migliaia di molecole ad attività antibatterica, ma solo una bassa percentuale è stata introdotta nella pratica clinica a causa del coefficiente chemioterapico non sufficientemente elevato (il coefficiente chemioterapico si ottiene dalla differenza tra il dosaggio che determina l'effetto terapeutico e quello che determina l'effetto tossico). Egualmente vi è cautela nell'utilizzare nella pratica clinica gli antibiotici e i chemioterapici che, pur essendo attivi sui batteri e non tossici per le cellule dell'ospite, vengono metabolizzati e pertanto inattivati, prima ancor di avere esercitato la loro attività antimicrobica. Comunque, anche quando un antibiotico si dimostra attivo *in vitro* sul germe responsabile dell'infezione e non tossico per le cellule dell'organismo ospite, affinché possa avere un buon effetto terapeutico è necessario che riesca a raggiungere il sito d'infezione in opportune concentrazioni, per cui è fondamentale essere a conoscenza anche della farmacocinetica del composto stesso. I disinfettanti e gli antisettici differiscono dagli antibiotici ad attività sistemica in quanto possiedono una tossicità scarsamente selettiva, cioè sono tossici non solo per i microrganismi patogeni ma anche per le cellule dell'ospite. Essi pertanto possono essere usati solamente per inattivare i microrganismi presenti nell'ambiente inanimato, oppure in misura limitata sulla superficie cutanea, mentre non devono essere somministrati per via sistemica. L'azione antimicrobica dei disinfettanti dipende dalla concentrazione, dalla durata del contatto, dalla temperatura, e la valutazione della loro efficacia può essere complessa.

Le particolari proprietà del plasma lo rendono non solo un efficace battericida che non provoca danni nelle cellule umane, ma anche di facile applicabilità sia a livello oculare che dermatologico. Il plasma freddo potrebbe quindi essere impiegato per la sterilizzazione della superficie oculare in fase pre-operatoria, per

il trattamento di infezioni localizzate della superficie oculare, quali ulcere corneali infettive batteriche, micotiche e virali, o, in prospettiva, modificando i parametri energetici della sorgente utilizzata, per il trattamento di neoformazioni tumorali, o per il rimodellamento corneale.

Lo studio iniziato con questa tesi dovrà comunque proseguire nella fase II, che attualmente è allo stato di progettazione, per confermare i dati acquisiti e per verificare l'efficacia del trattamento anche sulle cornee infettate di animali vivi, da laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

Besaratinia A, Synold TW, Chen HH, Chang C, Xi B, Riggs AD, Pfeifer GP: DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumour suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10058-10063.

Droge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

Dubrac S, Touati D: Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in Escherichia coli. *Microbiology* 2002; 148: 147-156.

Eitinger T: In vivo production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *J Bacteriol* 2004; 186: 7821-7825.

Franco R, Schoneveld, Georgakilas AG, Panayiotidis I: Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 26: 6-11.

Gilger BC: Immunology of the ocular surface. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 223-231.

Goldston R. J. and P. H. Rutherford: Introduction to Plasma Physics, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, 1997

Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E: Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34: 1317-1324.

Hazlett LD: Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:1-30.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA: Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1456-1462.

Hermann HW, Henins I, Park J, Selwyn GS: Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet. *Phys Plasmas* 1999; 6: 2284-2289.

Imlay JA: Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 395-418.

Imlay JA, Fridovich I: Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1991; 266: 6957-6965.

Kieft IE, Broers JLV, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FCS, Stoffels E: Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO K1 cells. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 362-368.

Kieft IE, Darios D, Roks AJM, Stoffels E: Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description. *IEEE Trans Plasma Sci* 2005; 33: 771-775.

Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E: Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34: 1331-1336.

Klein CP, Patka P, Wolke JG, De Blicke-Hogervorst JM, De Groot K: Long-term in vivo study of plasma-sprayed coatings on titanium alloys of tetracalcium phosphate, hydroxyapatite, and alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 1994; 15: 146-150.

Laroussi M: Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002; 30: 1409-1415.

Laroussi M, Leipold F: Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* 2004; 233: 81-86.

Laroussi M, Richardson JP, Dobbs FC: Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 1996; 24: 1188-1191.

Laroussi M, Tendero C, Lu X, Alla S, Hynes WL: Inactivation of bacteria by the plasma pencil. *Plasma Processes and Polymers* 2006; 3: 470-473.

Li C and Jackson RM: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: 227-241.

Mannis MJ: The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002; 100: 243-271.

Martines E: Corso di Fisica della fusione nucleare e applicazione dei plasmi. Ed. CLEUP 2005 : 167-183.

Martines E., M Zuin, R Cavazzana, E Gazza, G Serianni, S Spagnolo, M Spolaore, A Leonardi, V Deligianni, P Brun, M Aragona, I Castagliuolo and P Brun, A novel plasma source for sterilization of living tissues, *New J. Phys.*, Volume 11, 115014 (2009)

McLeod S: Cheratite batterica. In: Trattato di oftalmologia. Yanoff M and Duker JS eds, Antonio Delfino Editore Publ, 2003; vol 1: 8.1-8.5

Mendis DA, Rosenberg M, Azam F: A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 28: 1304-1306.

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH: Low-temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 2001; 226: 1-21.

Mueller JB, McStay CM: Ocular infection and inflammation. *Emerg Med Clin North Am* 2008; 26: 57-72.

Nathan C, Shiloh MU: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8841- 8848.

Ohl A, Schroder K: Plasma-induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review. *Surf Coating Technol* 1999; 116-119: 820-830.

Park S, Imlay JA: High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol* 2003;185: 1942-1950.

Petrasso RD: Plasmas everywhere. *Nature* 1990; 343: 21-22.

Robbins, Cotran: Le basi patologiche delle malattie. Ed. EISEIVER 2007; 17.

Rowley DA, Halliwell B: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of iron salts. *FEBS Lett* 1982;142: 39-41.

Sladek REJ, Baede TA, Stoffels E: Plasma-needle treatment of substrates with respect to wettability and growth of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34: 1325-1330.

Sladek REJ, Stoffels E: Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. *J Phys D: Appl Phys* 2005; 38: 1716-1721.

Sosnin EA, Stoffels E, Erofeev MV, Kieft IE, Kunts SE: The effects of UV irradiation and gas plasma treatment on living mammalian cells and bacteria: a comparative approach. *IEEE Trans Plasma Sci* 2004; 32: 1544-1550.

Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW, Kroesen GME: Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials. *Plasma Source Sci Technol* 2002; 11: 383-388.

Thomas PA: Fungal infections of the cornea. *Eye* 2003; 17: 852-62.

Thomas PA, Geraldine P: Infectious keratitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 129-41.

Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D: Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2005; 24: 603-607.

Zelco IN, Mariani TJ, Folz RJ: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 337-349.

Winterbourn CC: Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* 1979; 182: 625-628.

Woodmansee AN, Imlay JA: A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003; 49: 11-22.

M. Zuin et al., Kink instability in applied field magnetoplasmadynamic thruster, *Phys. Rev. Lett.* 92, 225003 (2004)
