

Оптимизация параметров холодной плазменной струи при возбуждении синусоидальным напряжением для эффективного подавления жизнеспособности раковых клеток

Аннотация

Проведено исследование параметров генерации холодной плазменной струи при синусоидальном возбуждении. Определены параметры облучения, позволяющие эффективно снижать жизнеспособность раковых клеток и применять оптимизированные условия в экспериментах на животных.

Введение

Воздействие плазменных образований на различные биологические объекты является современным трендом в развитии плазменной медицины. В зоне распространения плазменного образования и в области взаимодействия с объектом заряженные частицы вступают в химические реакции внутри и на поверхности клетки, изменяя ее свойства. Наблюдаемое увеличение концентрации радикалов, содержащих кислород и азот, является существенным стрессовым фактором, способным индуцировать клеточную гибель [1]-[3]. В биомедицине исследуют применение различных типов газового разряда, однако наибольшее распространение получили источники плазменных струй атмосферного давления. Плазменная струя формируется последовательностью стримеров, распространяющихся в потоке газа, прокачиваемого через разрядную зону устройства.

Специфика применения плазменных струй в биомедицине основана на воздействии холодной плазмы на биологические объекты в широком диапазоне энергетических режимов. На сегодняшний день плазменное воздействие используется для заживления ран, стерилизации в области стоматологии, лечения различных дерматологических заболеваний, таких как грибковые поражения, псориаз, экзема, герпес и т. д. [4], [5].

Получены положительные результаты лабораторных экспериментов по облучению клеток различных опухолевых линий и модельных опухолей у животных, что подчеркивает значимость изучения механизмов воздействия плазменных струй для развития технологии лечения злокачественных образований [6], [7].

Воздействие холодной плазменной струи атмосферного давления на биологический объект сопровождается не только химическими реакциями на поверхности тканей и внутри клеток, но и изменениями энергетических параметров плазменной струи вблизи зоны взаимодействия, которые зависят от условий эксперимента, таких как амплитуда и частота прикладываемого напряжения, расстояние до облучаемого объекта и его типа. В зависимости от этих параметров частота и величина импульсов тока, регистрируемых вблизи области взаимодействия, могут меняться [8]. Неоднозначность параметров функционирования источников плазмы и соответственно неопределенность параметров облучения биологических объектов не позволяют транслировать метод плазменного воздействия в биофизические эксперименты и клиническую практику.

Для применения холодной плазменной струи в биомедицинских приложениях требуется качественное и полное исследование функциональных особенностей устройств генерации

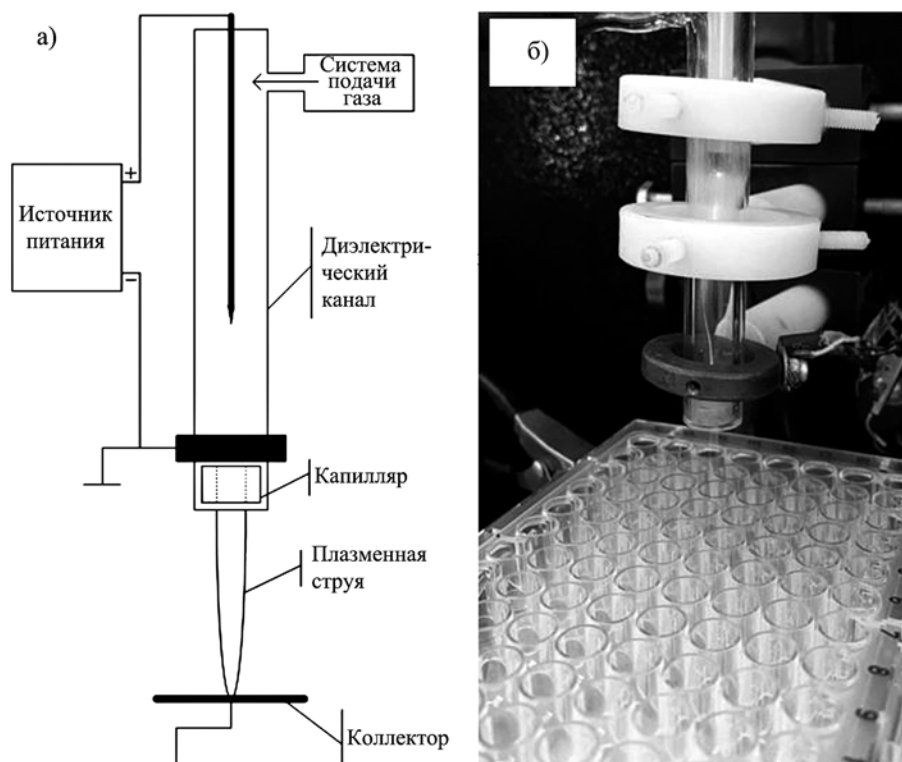


Рис. 1. Плазменное устройство: а) конструкция; б) дизайн эксперимента

холодной плазменной струи при взаимодействии с объектами различной природы. **Целью рассматриваемой работы** является исследование частотных параметров плазменной струи и определение оптимальных параметров для цитотоксического воздействия на раковые клетки.

Материалы и методы

В рассматриваемой работе использовалась газоразрядная ячейка, представляющая собой коаксиальный диэлектрический канал длиной 100 мм с внутренним диаметром 8 мм, на выходе из которого размещен диэлектрический капилляр с диаметром 2,3 мм, формирующий сопло. Внутри канала соосно размещен стержневой электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм. У сопла диэлектрического канала расположен кольцевой заземленный электрод, который вместе с внутренним потенциальным электродом формирует разрядную зону. Для инициирования плазменной струи использовался источник синусоидального напряжения с регулируемой резонансной частотой в диапазоне $f_U \approx 11 \dots 52$ кГц и напряжением $U = 2 \dots 6$ кВ, ограниченным безопасными условиями воздействия плазменной струи на живые объекты.

В электрофизическое устройство подается поток газа гелия (содержание гелия – 99,995 %) со скоростью потока $v = 0,5 \dots 15$ л/мин. Последовательность стримеров, генерирующихся на положительной полуоволне прикладываемого синусоидального напряжения и распространяющихся по потоку газа, прокачиваемого через разрядную зону, формирует плазменную струю. Конструкция плазменного устройства представлена на *рис. 1а*.

Для измерения напряжения U использовался высокоомный делитель. В качестве коллектора использовалась медная подложка. Заземление коллектора через малоиндуктивное сопротивление позволяло регистрировать частоту и амплитуду импульсов тока I , достигающих подложки. Показанием к использованию медной подложки является создание конфигурации электрического поля повышенной напряженности, что позволяет интенсифицировать генерацию активных радикалов в зоне взаимодействия плазменной струи с объектом [3]. Для обеспечения эффективных условий воздействия холодной плазменной струи на мишень планшет с биологическими материалами размещали на медной подложке, установленной перпендикулярно оси распространения плазменной струи. Расстояние

от сопла до подложки определялось эффективными условиями экспериментов, при которых воздействие плазменной струи на раковые клетки обеспечивало максимальное подавление их жизнеспособности и безопасные параметры воздействия на лабораторных животных [9]. На *рис. 1б* представлен дизайн эксперимента по исследованию воздействия холодной плазменной струи на раковые клетки.

Результаты

Процесс воздействия на биологические объекты является сложным и многофакторным. Интенсивность протекания химических реакций на поверхности биологических объектов напрямую зависит от величины импульса тока, доставляемого в зону взаимодействия, и частоты касания мишени плазменным образованием.

Исследована генерация плазменной струи при синусоидальном возбуждении с частотой прикладываемого напряжения $f_U \approx 51$ кГц. В результате экспериментов продемонстрировано, что частота тока f_I – частота касания плазменного образования медной подложки, расположенной на расстоянии 35 мм от сопла, в зависимости от условий эксперимента может быть равной либо кратной частоте прикладываемого напряжения $f_U / 2, f_U / 4, f_U / 8$. В качестве иллюстрации на *рис. 2а* показано, что при амплитуде прикладываемого напряжения $U = 3,5$ кВ, частоте $f_U \approx 51$ кГц и скорости потока газа $v = 9$ л/мин регистрируемая частота касания медной подложки плазменной струей была равна $f_I = f_U / 2$. В дальнейшем режим функционирования плазменной струи изменился на $f_I = f_U / 4$, а затем стабилизировался с $f_I = f_U / 8$. Исследования показали, что изменение амплитуды иницирующего напряжения U способно обеспечить стабильный режим функционирования плазменной струи с фиксированной и предсказуемой частотой f_I .

Для обеспечения максимальной эффективности воздействия плазменной струи на биологические ткани необходимо определение стабильных режимов функционирования, при которых частота касания поверхности объекта совпадает с частотой прикладываемого синусоидального напряжения $f_I = f_U$. Поэтому были исследованы параметры генерации плазменной струи при различных резонансных частотах источника напряжения. Показано, что при генерации плазменной струи с частотами прикладываемого напряжения в диапазоне $f_U = 25 \dots 52$ кГц выполнение условия $f_I = f_U$ соблюдается не для всех напряже-

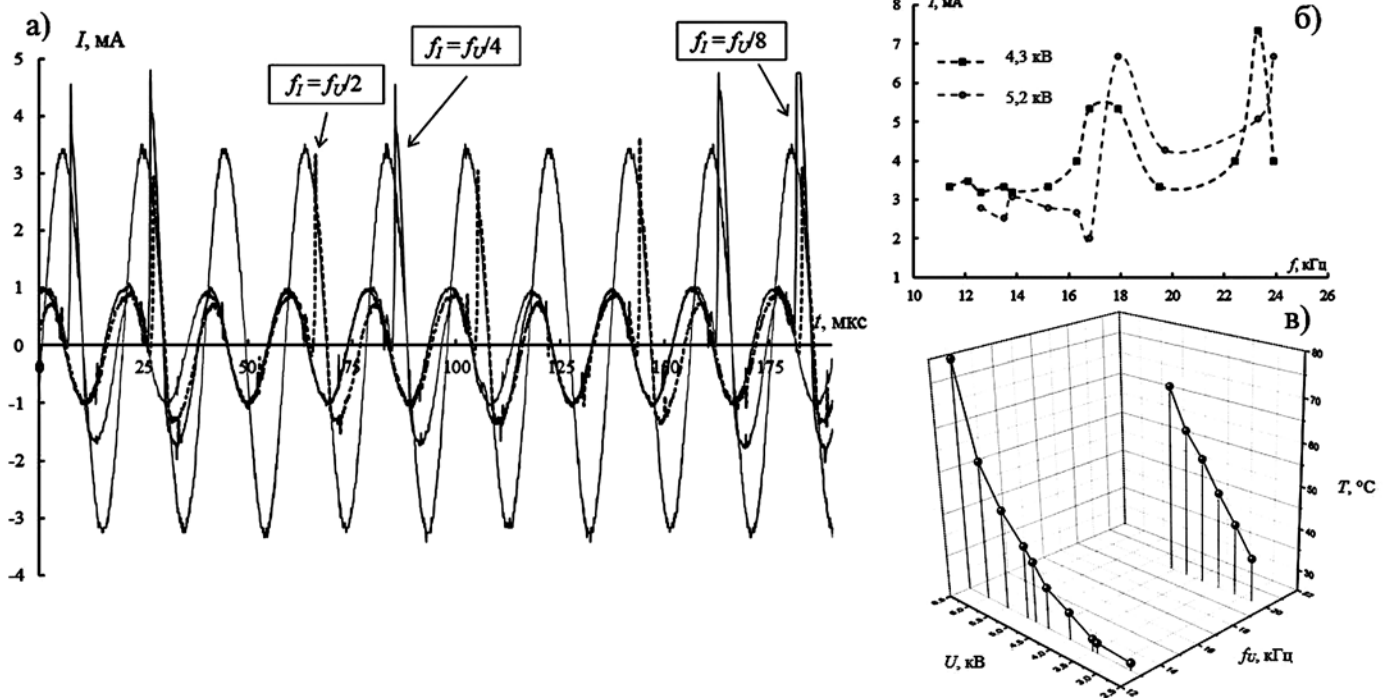


Рис. 2. Параметры плазменной струи: а) осциллограмма U и I при изменении частотных параметров плазменной струи; б) зависимость $I(f)$ при $U = 4,3$ и $5,2$ кВ; в) температура мишени в зависимости от v и U

ний U . В диапазоне $f_U = 11...24$ кГц продемонстрировано стабильное выполнение условия $f_U = f_I$ для всех U при любых заданных геометрических условиях эксперимента. На *рис. 2б* представлена частотная характеристика – зависимость $I(f)$ при синусоидальном возбуждении при соблюдении требования $f_U = f_I$. Зависимость имеет выраженный частотно-модулированный вид. Из *рисунка* видно, что резонансные частоты для исследованных параметров генерации $U = 4,3$ и $5,2$ кВ, например при $\nu = 4,5$ л/мин, совпадают и связаны, вероятно, с возникновением акустических колебаний в газовой магистрали, поскольку изменение ее длины приводит к сохранению частотно-модулированного характера $I(f)$ и к смещению резонансных частот. Видно, что изменение частоты в небольшом диапазоне может привести к изменению амплитуды импульса тока более чем в 3 раза.

Поскольку эффективность взаимодействия плазменной струи с объектами зависит как от частоты касания, так и от амплитуды тока, доставляемого к мишени, полученные результаты позволяют определить необходимые для биомедицинских исследований устойчивые диапазоны функционирования холодной плазменной струи.

Проведено исследование нагрева мишени при различных условиях ($f_I = f_U = 13; 22$ кГц; $U = 2,5...6,5$ кВ; $\nu = 9$ л/мин). Показано, что достигаемые температуры мишени T лежат в диапазоне $25...80$ °С. Анализ зависимости температуры от напряжения при частотах 13 и 22 кГц показал, что мишень остается «холодной» ($T < 40$ °С) при $f_U = 13$ кГц в диапазоне $U = 2,75...5$ кВ и только до $U = 3,25$ кВ при $f_U = 22$ кГц (*рис. 2в*).

Ранее было показано, что прямое облучение плазменной струей опухолевых клеток различного гистологического происхождения при использовании заземленной подложки ведет к более существенному снижению их жизнеспособности [3]. Кроме того, продемонстрировано, что в отсутствие подложки изменение амплитуды напряжения $U = 3,85...5,60$ кВ и $f_U \approx 25$ кГц при формировании струи в аргоне не влияло на

эффективность цитотоксического воздействия на клетки карциномы легкого A549 [10]. В данной работе при исследовании влияния различных параметров генерации гелиевой плазменной струи на выживаемость клеток также использовали медную подложку. Для эксперимента клетки A549 культивировали в 96-луночных планшетах, как описано в [10], и через 24 ч после облучения проводили анализ жизнеспособности методом МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид], как было описано ранее в [11]. При облучении планшеты располагались на заземленной медной подложке при параметрах плазменной струи $U = 3,5...5,3$ кВ, $\nu = 9$ л/мин и на фиксированной частоте синусоидального напряжения $f_U = 13, 22$ кГц, поскольку эти частоты соответствуют параметрам ее устойчивого функционирования, исходя из данных *рис. 2б*.

Результаты по изменению жизнеспособности клеток A549 представлены на *рис. 3* (данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение). Можно видеть, что изменение напряжения в исследуемом диапазоне при $f_U = 13$ кГц не влияет на цитотоксическое действие плазменной струи. Во всех образцах наблюдалось снижение жизнеспособности клеток в среднем на 30 % (*рис. 3а*). В случае $f_U = 22$ кГц наблюдалось более существенное снижение жизнеспособности клеток после облучения в сравнении с контрольными необлученными клетками. При $U = 4,9$ кВ жизнеспособными оставались лишь 40 % клеток (*рис. 3б*). Таким образом, струя, формируемая при $f_U = 22$ кГц, оказывает больший цитотоксический эффект, чем струя, формируемая при $f_U = 13$ кГц.

Снижение жизнеспособности клеток может происходить не только в результате плазмохимического воздействия струи, но и в результате повышения температуры в зоне контакта струи с мишенью. Из *рис. 2в* можно заключить, что облучение клеток при $f_U = 22$ кГц и $U > 3,25$ кВ вызывает их чрезмерный нагрев, что может вести к снижению их жизнеспособности.

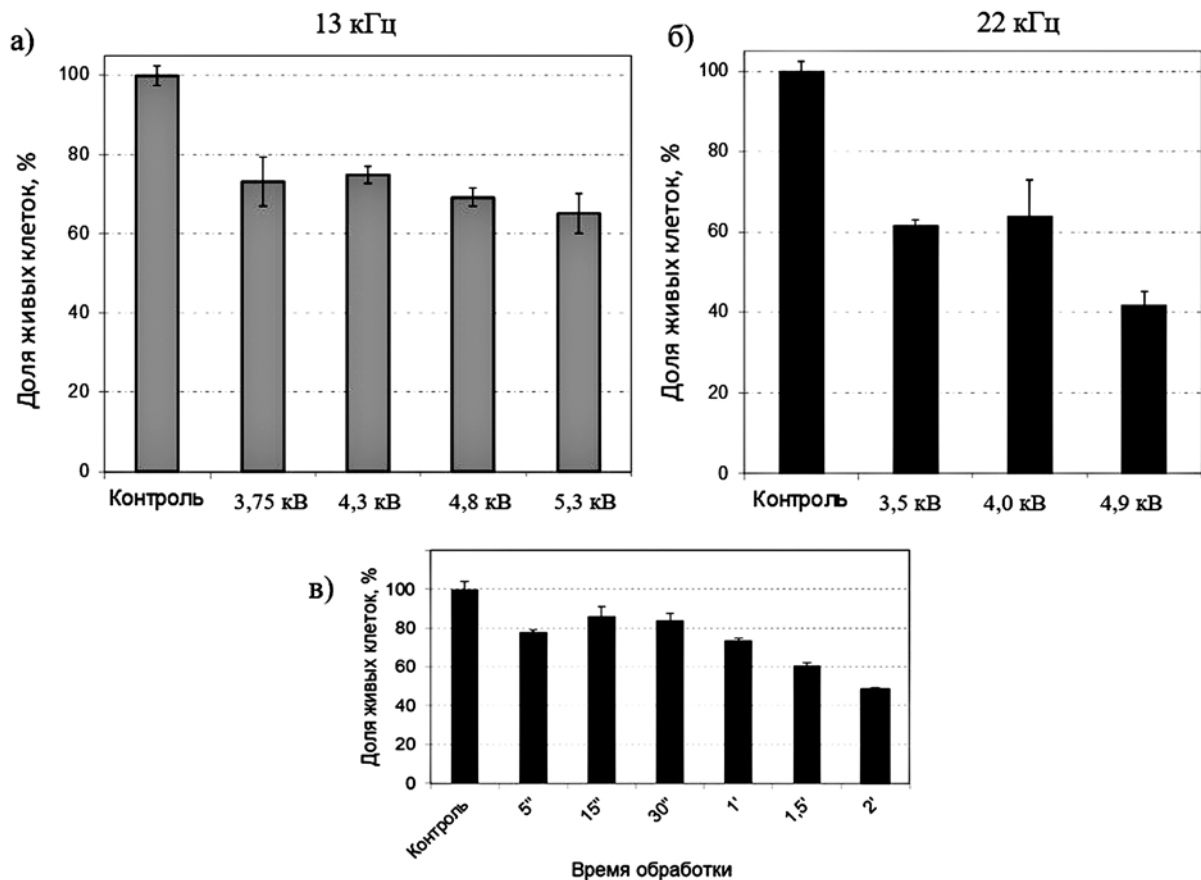


Рис. 3. Изменение жизнеспособности клеток A549 при прямом воздействии холодной плазменной струи при: а) $f_U = 13$ кГц; б) $f_U = 22$ кГц; в) зависимость жизнеспособности клеток от продолжительности воздействия холодной плазменной струи при $U = 4,3$ кВ, $f_U = 13$ кГц, $\nu = 9$ л/мин

Поскольку предлагаемый подход нацелен на разработку протоколов терапевтического воздействия на опухолевые образования у пациентов, использование частоты ~ 13 кГц и напряжений до 5 кВ является более предпочтительным, не ведущим к термическим повреждениям облучаемой области. Усиление цитотоксического воздействия может осуществляться при варьировании других параметров струи и типа облучения: изменение формы иницирующего напряжения (импульсы с регулируемой длительностью); изменение частоты касания плазменного образования биологического объекта (управление эффектом саморегуляции стримерного пробоя) [11]; увеличение времени воздействия на объект; введение в систему про- или антиоксидантов; комбинирование с различными ингибиторами клеточных процессов и др.

Для анализа влияния продолжительности воздействия на цитотоксические эффекты струи клетки A549 облучали при $U = 4,3$ кВ, $f_U = 13$ кГц, $v = 9$ л/мин в течение $t = 5 \dots 120$ с. Можно видеть, что увеличение продолжительности облучения с 30 до 120 с уменьшает долю живых клеток с 85 до 45 % (рис. 3в). Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

Таким образом, в настоящей работе определены параметры облучения, позволяющие эффективно снижать жизнеспособность раковых клеток и применять оптимизированные условия в экспериментах на животных.

Заключение

Исследование частотных характеристик холодной плазменной струи показало, что необходимо строго контролировать изменения параметров генерации плазменной струи в зоне ее взаимодействия с объектами. Частота касания мишени плазменным образованием может не совпадать с частотой прикладываемого синусоидального напряжения и изменяться в зависимости от условий эксперимента. В ходе работы был определен функциональный диапазон генерации плазменной струи, в котором соблюдается условие $f_I = f_U$ при любых заданных условиях эксперимента и допустимой температуры нагрева биологических мишеней; определены параметры облучения, позволяющие эффективно снижать жизнеспособность раковых клеток и применять оптимизированные условия в экспериментах на животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта РНФ 19-19-00255П.

Список литературы:

1. Harley J.C., Suchowerska N., McKenzie D.R. Cancer treatment with gas plasma and with gas plasma-activated liquid: Positives, potentials and problems of clinical translation // *Biophysical Reviews*. 2020. Vol. 12. P. 989.
2. Malyavko A. et al. Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct versus indirect approaches // *Mater. Adv.* 2020. Vol. 1. P. 1494.
3. Schweigert I. et al. Interaction of cold atmospheric argon and helium plasma jets with bio-target with grounded substrate beneath // *Applied Sciences*. 2019. Vol. 9. № 21. P. 4528.
4. Keidar M., Yan D., Sherman J.H. *Cold Plasma Cancer Therapy* / 1st ed. – California, CA, USA: Morgan & Claypool Publisher, 2019. PP. 4-5.
5. Benedikt J. et al. Atmospheric pressure microplasma jet as a depositing tool // *Appl. Phys. Lett.* 2016. Vol. 89. P. 251504.
6. Woedtko T. et al. Plasmas for medicine // *Physics Reports*. 2013. Vol. 530. PP. 291-320.
7. Graves D. Reactive Species from Cold Atmospheric Plasma: Implications for Cancer Therapy // *Plasma Processes and Polymers*. 2014. Vol. 11. PP. 1120-1127.

8. Schweigert I. et al. Mismatch of frequencies of ac voltage and streamers propagation in cold atmospheric plasma jet for typical regimes of cancer cell treatment // *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. Vol. 2100. P. 012020.
9. Troitskaya O. et al. Non-Thermal Plasma Application in Tumor-Bearing Mice Induces Increase of Serum HMGB1 // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. P. 5128.
10. Golubitskaya E.A. et al. Cold physical plasma decreases the viability of lung adenocarcinoma cells // *Acta Naturae*. 2019. Vol. 11. № 3 (42). PP. 16-19.
11. Гугин П.П., Закревский Д.Э., Милахина Е.В. Электрофизические и тепловые параметры плазменной струи атмосферного давления в гелии при возбуждении синусоидальным и импульсным напряжением // Письма в Журнал технической физики. 2021. Т. 21. С. 41-44.

Павел Павлович Гугин,
мл. научный сотрудник,
Дмитрий Эдуардович Закревский,
д-р физ.-мат. наук, зав. лабораторией,
лаборатория № 36 мощных
газовых лазеров,
ФГБУН «Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова» Сибирского
отделения РАН,
Елена Васильевна Милахина,
аспирант,
ФГБОУ ВО «Новосибирский
государственный технический университет»,
инженер-технолог,
лаборатория № 36 мощных
газовых лазеров,
ФГБУН «Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова» Сибирского
отделения РАН,
Михаил Михайлович Бирюков,
аспирант,
ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»,
мл. научный сотрудник,
ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины»
Сибирского отделения РАН,
Ольга Александровна Коваль,
д-р биол. наук, ведущ. научный сотрудник,
Екатерина Андреевна Патракова,
мл. научный сотрудник,
ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины»
Сибирского отделения РАН,
Ирина Вячеславовна Швейгерт,
д-р физ.-мат. наук, ведущ. научный сотрудник,
ФГБУН «Институт теоретической
и прикладной механики
им. С.А. Христиановича» Сибирского
отделения РАН,
г. Новосибирск,
e-mail: lena.yelak@gmail.com