



PER LIBERTATEM AD VERITATEM

www.uaic.ro

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

Evaluarea efectelor tratamentului cu plasmă non-termică la presiune atmosferică pe modele celulare *in vitro*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. Gorgan Dragoș Lucian

Student-doctorand: Stache Alexandru Bogdan

IAȘI 2023

CUPRINS

Mulțumiri1
Lista prescurtărilor
PARTEA TEORETICĂ6
Introducere
Motivarea, scopul și obiectivele lucrării7
1. Plasma non-termică la presiune atmosferică și importanța acesteia în biomedicină
1.1. Tipuri de plasmă non-termică la presiune atmosferică și de tratament9
1.2. Istoricul utilizării plasmei în studii biomedicale9
1.2.1. Decontaminarea suprafețelor
1.2.2. Coagularea sângelui10
1.2.3. Efecte asupra vindecării rănilor10
1.3. Modificări induse de tratamentul cu CAP la nivel celular și molecular
1.4. Utilizarea plasmei non-termice la presiune atmosferică în terapia osteosarcomului
2. Markeri de control ai ciclului celular și ai mecanismelor de moarte celulară
PARTEA EXPERIMENTALĂ13
3. Materiale și metode de lucru13
3.1. Planul experimental și generarea PAM13
3.2. Caracterizarea electrică a descărcărilor CAP14

3.3. Analiza pH14
3.4. Modelul celular in vitro și tratamentul cu CAP14
3.5. Izolarea și purificarea ARN15
3.6. Realizarea standardelor15
3.7. Cuantificarea expresiei genelor implicate în controlul ciclului celular și al mecanismelor de moarte celulară prin RT-qPCR
3.8. Testarea viabilității celulare15
3.9. Evaluarea speciilor reactive de oxigen și azot16
3.9.1. Analiza speciilor reactive de oxigen16
3.9.2. Analiza speciilor reactive de azot16
4. Rezultate și discuții17
4.1. Caracterizarea electrică a descărcărilor DBD fără flux17
4.2. Spectroscopie de emisie optică17
4.3. Temperatura de expunere
4.4. Evaluare pH-ului PAM18
4.4. Stabilitatea pH-ului PAM la diferite temperaturi de stocare19
4.5. Impactul tratamentelor cu PAM-PBS și PAM-RPMI asupra viabilității
celulare
4.6. Evaluarea temporală a efectelor tratamentului cu PAM-RPMI asupra
viabilității celulare21
4.7. Identificarea timpului optim de tratament
4.8. Stabilirea influenței pH asupra viabilității celulare23
4.9. Determinarea selectivității tratamentului

4.10. Analiza expresiei genice	24
4.11. Determinarea speciilor reactive de azot și oxigen	31
4.11.1 RNS	31
4.11.2. ROS	33
Concluzii generale	34
Articole publicate	36
Lista lucrărilor publicate în calitate de autor principal	36
Lista lucrărilor publicate în calitate de co-autor	36
Participări la manifistări științifice	37
Lista lucrărilor susținute la conferințe internaționale	37
Lista lucrărilor susținute la conferințe naționale	
Proiecte de cercetare – membru	39
Bibliografie selectivă	40

Mulțumiri

Această lucrare este rezultatul unui efort de echipă, implicând atât cercetători și colaboratori, cât și colegi, prieteni și membri ai familiei. Finalizarea cu succes a tezei de doctorat nu ar fi fost posibilă fără sprijinul și îndrumarea tuturor persoanelor care mau susținut pe parcursul acestei călătorii academice.

În primul rând, adresez sincere mulțumiri coordonatorului tezei de doctorat, prof. dr. habil. Dragoș-Lucian Gorgan pentru încrederea pe care mi-a acordat-o; fără implicarea dumnealui, realizarea acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibilă. Sunt profund recunoscător pentru răbdarea și suportul necondiționat oferite pe parcursul a celor cinci ani de activitate științifică.

Deosebite mulțumiri adresez membrilor comisiei de îndrumare care și-au dedicat timpul și energia pentru a evalua și îndruma această lucrare. Sunt recunoscător pentru părerile și sugestiile constructive oferite, care au contribuit semnificativ la îmbunătățirea conținutului și structurii tezei mele. Îi mulțumesc domnului prof. dr. habil. Lucian Hrițcu pentru ajutorul oferit în redactarea acestei teze de doctorat și pentru acordarea oportunității de a fi implicat în cadrul proiectelor dumnealui de cercetare. De asemenea, îi mulțumesc domnului conf. dr. habil. Ionuț Topală pentru implicarea dumnealui în realizarea caracterizării electrice a descărcărilor de plasmă, precum și pentru suportul oferit la publicarea articolelor științifice. Îi mulțumesc domnului CSII dr. Cosmin Teodor Mihai pentru deosebita implicare în realizarea studiilor pe culturi celulare și pentru toate sfaturile și sugestiile oferite.

În egală măsură, adresez sincere mulțumiri domnului CSIII dr. Ilarion Mihăilă pentru sprijinul acordat la stabilirea caracteristicilor de descărcare a plasmei, precum și pentru toate discuțiile constructive.

De asemenea, adresez mulțumiri colegilor de la Institutul Regional de Oncologie pentru sprijinul necondiționat în cadrul desfășurării acestui proiect. Doresc să exprim mulțumiri speciale doamnei dr. Loredana Mihaiela Dragoș pentru suportul, disponibilitatea și motivația oferită pe tot parcursul activității de cercetare. Nu în ultimul rând, aș dori să adresez mulțumiri deosebite familiei și prietenilor, care m-au sprijinit și motivat pe toată perioada studiilor doctorale. Soției mele Paula și părinților mei le sunt profund recunoscător pentru că mi-au fost mereu alături și m-au susținut în toate eforturile mele. Incredibila lor înțelegere și susținere morală m-au motivat să depășesc toate obstacolele și finalizez această teză de doctorat.

Lista prescurtărilor

- AC curent alternativ
- $ACTB \beta$ -actină
- ADN acid deoxiribonucleic
- ADNc acid deoxiribonucleic complementar
- APPJ plasmă la presiune atmosferică în jet
- ARN acid ribonucleic
- ARNm acid ribonucleic mesager
- BAX gena X asociată BCL2
- BCL2 limfomul cu celule B 2
- CAP plasmă non-termică la presiune atmosferică
- CASP3 caspaza 3
- CASP8 caspaza 8
- CASP9 caspaza 9
- CFLAR regulatorul de apoptoză a CASP8 și FADD
- CO2 dioxid de carbon
- Ct-ciclul de prag
- DBD descărcare în barieră dielectrică
- DCFH diclorofluoresceină
- DCFH-DA diacetat de diclorodihidrofluoresceină
- DIABLO Proteina mitocondrială care leagă IAP
- DMSO dimetil sulfoxid
- DPBS tampon fosfat salin Dulbecco
- Ds dublu catenar
- DSB rupturi de ADN dublu catenar
- $EDTA-acid\ etilendiaminotetraacetic$
- GE electrod de împământare
- HNO2 acid azotos
- HNO3 acid azotic

- HOB osteoblaste umane
- HOS osteosarcom uman
- HVE electrod de înaltă tensiune

JNK1 – C-Jun N-Terminal Kinaza 1

MKI67 – Marker al proliferării Ki-67

- MTT bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazoliu
- NO monoxid de azot

NO_2^- - nitriți

NO_3^- – nitrați

OES - spectroscopie de emisie optică

OS - osteosarcom

PAM - mediu activat de plasmă

PAM-PBS - tampon fosfat salin activat de plasmă

PAM-RPMI - mediu Roswell Park Memorial Institute activat de plasmă

- PBS tampon fosfat salin
- PCR reacție de polimerizare în lanț

RE - reticul endoplasmatic

RIPK3 - Serin/treonin kinaza care interacționează cu receptorul 3

- RNS specii reactive de azot
- RONS specii reactive de azot și oxigen
- ROS specii reactive de oxigen
- RPMI 1640 mediu Roswell Park Memorial Institute 1640

RT-qPCR - reacție de polimerizare în lanț cu detecție în timp real

- $SDS-lauril-sulfat \ de \ sodiu$
- TAE tampon tris-acetat EDTA
- Texp timp de expunere
- $TNF\alpha-Factor\;de\;necroză\;tumorală-alfa$
- TP53 Proteina tumorală P53
- TRIS tris(hidroximetil)aminometan

Ttr - timp de tratament

Tx - paclitaxel

UV - radiații în domeniul ultraviolet

UVA - radiații în domeniul ultraviolet de tip A

UVB - radiații în domeniul ultraviolet de tip B

UVC - radiații în domeniul ultraviolet de tip C

XIAP -- Inhibitor X-legat al apoptozei

PARTEA TEORETICĂ Introducere

Cancerul este una dintre cele mai răspândite boli în zilele noastre, cu un impact ridicat asupra calității vieții, a bugetelor de sănătate și cu un impact emoțional mare atât asupra pacientului, cât și asupra familiei acestuia (Park & Look, 2019). Incertitudinea cu privire la eficacitatea generală a tratamentelor antitumorale actuale, precum și reapariția cancerului din cauza rezistenței dobândite la medicamentele utilizate sunt două probleme majore ale strategiilor terapeutice actuale pentru combaterea acestei maladii. Așadar, există o tendință continuă de identificare a unor noi metode sau strategii de combatere a cancerului (Gerber et al., 2017).

În ultimul deceniu, plasma non-termică la presiune atmosferică (CAP), un gaz parțial ionizat cu o temperatură apropiată de temperatura camerei, a arătat rezultate promițătoare în terapia cancerului, demonstrându-și caracterul aplicativ benefic în încercarile de tratare ale acestei maladii (Yan et al., 2017). Principalele studii științifice privind efectele CAP asupra diferitelor tipuri de celule neoplazice au arătat că plasma atmosferică non-termică este responsabilă de inducerea apoptozei (Arndt et al., 2013; Chang et al., 2014; Ninomiya et al., 2013; Thiyagarajan et al., 2014), necrozei (Elaissi & Charrada, 2021; Yan et al., 2020), necroptozei (Yang et al., 2020), autofagiei (Yan et al., 2021; Yoshikawa et al., 2020), feroptozei (A. Jo et al., 2022; Nguyen et al., 2023), piroptozei (Motaln et al., 2021) și de blocare a ciclului celular (Maes et al., 2017) prin generarea de specii reactive de oxigen sau de azot. De asemenea, o caracteristică importantă a CAP este activitatea selectivă asupra celulelor neoplazice cu un impact negativ redus asupra celulelor normale (Keidar et al., 2011, 2013). De asemenea, CAP determină detașarea celulelor tumorale, scăderea vitezei de migrare a celulelor (Kong et al., 2011), precum și inhibarea proceselor metastatice (Chang et al., 2014).

Cu toate acestea, mecanismele moleculare ale selectivității și inducerii apoptozei prin tratamentul CAP, nu sunt complet identificate.

Motivarea, scopul și obiectivele lucrării

Motivarea. În anul 2019 cancerul a surclasat bolile cardiovasculare în ceea ce privește numărul de decese pe an, determinând moartea a aproximativ 10 milioane de oameni (Lin et al., 2021). Analizele statistice și studiile de specialitate preconizează că, în curând, cancerul va deveni principala cauză de deces din fiecare țară de pe glob (Lin et al., 2021). Anual, în Europa, costurile asociate cancerului se ridică la o medie de aproximativ 100 de dolari per cap de locuitor (Haier & Schaefers, 2022). În ciuda progreselor tehnologice și a industriei farmaceutice, cancerul rămâne în continuare o boală devastatoare cu mortalitate ridicată (Faramarzi et al., 2021).

La mijlocul anilor 2000, datorită proprietăților antitumorale demonstrate, plasma non-termică la presiune atmosferică a intrat în atenția cercetătorilor din domeniile biomedicale ca potențială nouă metodă de tratament în terapia cancerului (Dubuc et al., 2018). Deși au fost realizate importante progrese în ceea ce privește identificarea mecanismelor de interacțiune dintre CAP și celule sau țesuturi, încă sunt necesare studii suplimentare în vederea identificării mecanismelor de bază prin care tratamentele CAP îți exercită proprietățile antitumorale (Murillo et al., 2023).

Scopul. În contextul prezentat anterior, scopul acestei lucrări este reprezentat de studiul efectelor plasmei non-termice la presiune atmosferică pe modele experimentale *"in vitro*" (culturi de celule normale și tumorale) în vederea evaluării potențialului citotoxic selectiv al acesteia și a identificării mecanismelor celulare implicate în interacțiunile plasmă – celule.

Obiectivele tezei.

O.1. Identificarea condițiilor optime de expunere a culturilor celulare la plasmă nontermică la presiune atmosferică.

O.2. Evaluarea temporală a efectelor tratamentului cu plasmă non-termică la presiune atmosferică asupra culturilor celulare normale și tumorale.

0.3. Evaluarea caracterului selectiv al plasmei non-termice la presiune atmosferică.

7

O.4. Identificarea căilor de semnalizare celulară responsabile de activarea mecanismelor de supraviețuire sau moarte celulară, modulate de tratamentul cu plasmă non-termică la presiune atmosferică.

O.5. Diseminarea rezultatelor – publicarea în reviste de specialitate și participarea la manifestări științifice.

O.6. Redactarea și susținerea tezei de doctorat.

1. Plasma non-termică la presiune atmosferică și importanța acesteia în biomedicină

Plasma este un gaz parțial ionizat compus din ioni, electroni, fotoni și elemente neutre, care sunt specii active capabile să inducă diferite fenomene fizice și reacții chimice. Considerată a patra stare a materiei, plasma pot fi găsită în natură (plasmă creată în stele, aurora polară, fulgere etc.), dar poate fi, de asemenea, generată în condiții de laborator, aplicând o sursă externă de energie unui gaz neutru, acesta devenind conductor electric. În timpul formării plasmei, energia este transferată în gazul în care are loc descărcarea, creând cantități mari de ioni și electroni. Acești electroni vor induce mai multe reacții care conduc la ionizări moleculare sau la disocieri. În consecință, plasma produsă va fi compusă dintr-un amestec de specii reactive generate ca urmare a acestor interacțiuni (Fridman et al., 2008; Hoffmann et al., 2013; H. Jo et al., 2016; Kalghatgi et al., 2011).

Plasmele pot fi împărțite în două tipuri diferite, în funcție de echilibrul termic dintre ioni și electroni, și anume plasme termice, respectiv non-termice. Plasmele termice sunt cele în care electronii au aceeași temperatură ca și ionii, iar plasmele nontermice, cunoscute și sub numele de plasme reci, sunt caracterizate prin faptul că electronii prezintă o temperatură mai mare decât ionii și neutrii, temperatura acestora fiind apropiată de temperatura camerei (Stoffels et al., 2008; von Woedtke et al., 2013). Diferența de masă este atât de substanțială, încât electronii pot atinge temperaturi cuprinse între câteva mii și zeci de mii de grade Celsius, în timp ce plasma, ca întreg, rămâne aproximativ la temperatura camerei (Heinlin et al., 2011).

Plasmele non-termice sunt compuse în principal din specii reactive de azot și oxigen, radiații UV și particule încărcate, compoziția acestora fiind dependentă de tipul de gaz de alimentare utilizat, tensiunea aplicată, tipul de dispozitiv, configurația fizică sau timpul de expunere (Bekeschus et al., 2013; Weltmann & von Woedtke, 2017).

1.1. Tipuri de plasmă non-termică la presiune atmosferică și de tratament

Una dintre cele mai răspândite metode de generare a plasmei non-termice la presiune atmosferică (CAP) este descărcarea în barieră dielectrică (DBD) (Laroussi & Akan, 2007). Indiferent de configurație, cu unul sau cu doi electrozi, se disting două tipuri de DBD: **DBD fără flux** în care electrodul de putere este învelit cu un material izolator, iar plasma rămâne limitată în spațiul dintre electrozi și **DBD cu flux** în care plasma este localizată atât în spațiul dintre electrozi cât și în regiunea post-electrod (Judée et al., 2019).

În ceea ce privește tratamentul celulelor tumorale, două metode de tratament cu CAP sunt utilizate pe scară largă, și anume tratamentul direct și tratamentul indirect. În tratamentul direct, celulele sunt supuse direct la descărcări CAP, în timp ce în tratamentul indirect, un lichid este supus descărcărilor, acesta fiind ulterior este administrat celulelor (Malyavko et al., 2020).

1.2. Istoricul utilizării plasmei în studii biomedicale

1.2.1. Decontaminarea suprafețelor

La mijlocul anilor 1990, s-au efectuat experimente care au arătat că plasma non-termică la presiune atmosferică (CAP) poate fi utilizată pentru a inactiva bacteriile (Laroussi, 2018). În domeniul alimentar, CAP reprezintă o metodă promițătoare pentru decontaminarea microbiană a alimentelor, a suprafetelor de lucru, a ambalajelor, precum și a echipamentelor de procesare (Min et al., 2016; Patange et al., 2018).

1.2.2. Coagularea sângelui

Există multiple teorii cu privire la mecanismele biochimice ale coagulării sângelui induse de CAP, diferite studii demonstrând efectul direct al CAP asupra proteinelor din sânge, acest tratament provocând coagulare fără modificarea concentrației de Ca²⁺ sau a pH-ului (Heslin et al., 2014).

1.2.3. Efecte asupra vindecării rănilor

Tratamentul cu plasmă non-termică la presiune atmosferică poate avea ca efect scăderea pH-ului, ducând la acidifierea rănilor, acest proces indus terapeutic susținând procesul de vindecare (Martinez et al., 2019; Mirpour et al., 2020).

1.2.4. Tratamentul eczemelor atopice

În vederea tratării dermatitei atopice cu CAP, Mertens și colab. au identificat un efect antiseptic, reducerea înroșirii pielii, precum și o reducere semnificativă a pruritului timp de mai multe ore, coloniile de *Staphylococcus aureus* fiind reduse de mai mult de zece ori (Mertens et al., 2009).

1.2.5. Tehnologia de regenerare a pielii cu ajutorul plasmei

În 2005, tehnologia de regenerare a pielii cu plasmă non-termică la presiune atmosferică a fost aprobată pentru tratamentul ridurilor faciale, leziunilor superficiale ale pielii, keratozelor actinice, keratozelor seboreice și a papilomului viral (Bogle et al., 2007).

1.2.6. Rolul CAP în terapia antitumorală

De la primul raport despre inducerea morții celulare de DBD în melanom în 2007, domeniul aplicării CAP în tratamentul cancerului a cunoscut o creștere rapidă. Până în prezent, tratamentul CAP și-a demonstrat capacitatea anti-tumorală asupra a numeroase linii de celule canceroase, cele mai intens investigate tipuri de cancer fiind cancerul cerebral, cancerul de piele, cancerul de sân, cancerul colorectal, cancerul

pulmonar, cancerul de col uterin, leucemia, hepatomul, precum și cancerul de cap și gât (Dubuc et al., 2018).

1.3. Modificări induse de tratamentul cu CAP la nivel celular și molecular

Principalele efecte terapeutice ale CAP sunt asociate cu prezența speciilor reactive de oxigen (ROS) și speciilor de azot reactiv (RNS) generate de sistemele CAP, acestea interazționând cu membrana celulară, determinând modificări morfologice (Yan et al., 2017). La nivel molecular, deteriorarea ADN a fost observată în stadiile incipiente ale tratamentului CAP (Gay-Mimbrera et al., 2016). De asemenea, tratamentele cu CAP pot avea ca efect peroxidarea lipidelor și creșterea concentrației de calciu în citoplasmă (Görlach et al., 2015). O altă consecință observată ca urmare a tratamentului CAP este reducerea aderenței la recipientele de cultură, a migrației și a invaziei celulare (Lee et al., 2009).

1.4. Utilizarea plasmei non-termice la presiune atmosferică în terapia osteosarcomului

Similar cu observațiile asupra altor tipuri de cancer tratate cu CAP, și în cazul OS tratamentul a avut ca efect inducerea stresului oxidativ (Ermakov et al., 2021; Mateu-Sanz et al., 2020; Xu et al., 2020). Utilizând atât diverse tipuri de dispozitive de generare CAP, cât și diferite metode și diferiți timpi de tratament, studiile de specialitate au demonstrat capacitatea CAP de a reduce viabilitatea sau potențialul proliferativ a mai multor tipuri de linii celulare de OS (Canal et al., 2017; Gümbel, Suchy, et al., 2017; Nitsch et al., 2023; Stache et al., 2023; Xu et al., 2020). Unele studii au identificat celulele de OS tratate cu CAP ca fiind în diferite stadii apoptotice sau de blocare a ciclului celular, prin evaluarea proteinei p53, a nivelurilor caspazelor 3 și 7, precum și a morfologiei celulare și a fragmentării nucleare (Canal et al., 2017; Gümbel, Bekeschus, et al., 2017; Gümbel et al., 2016).

2. Markeri de control ai ciclului celular și ai mecanismelor de moarte celulară

În vederea identificării căilor de semnalizare modulate de tratamentul indirect cu CAP, în cadrul acestui studiu a fost evaluat nivelul de expresi a: șase gene proapoptotice (BAX, JNK1, DIABLO, CASP8, CASP9 și CASP3), trei gene antiapoptotice (BCL2, CFLAR și XIAP), două gene necroptotice (TNF α și RIPK3), două gene implicate în mecanisme de blocare a ciclului celular (TP53 și CDKN1A) și a unei gene implicată în proliferarea celulară (MKI67).

PARTEA EXPERIMENTALĂ 3. Materiale și metode de lucru

3.1. Planul experimental și generarea PAM

Dispozitivele și măsurătorile fizice au fost realizate în cadrul laboratorului IPARC (Iasi Plasma Advanced Research Center), Facultatea de Fizică, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, sub îndrumarea domnului Conf. univ. dr. habil. Ionuț Topală și a domnului cercetator CS III dr. Ilarion Mihăilă.

Planul experimental al prezentului studiu a avut în componența sa trei etape principale de lucru: 1. Evaluarea pH-ului soluțiilor PAM și stabilirea eficienței soluțiilor PAM-PBS și PAM-RPMI în ceea ce privește citotoxicitatea; 2. Analiza parametrilor fizici de descărcare și a conținutului de RNS din PAM; 3. Optimizarea parametrilor de descărcare și de evaluare a efectelor PAM-RPMI asupra celulelor tumorale și normale, stabilirea influenței pH, analiza expresiei genelor de interes și evaluarea RONS intracelulare.

Sistemul DBD de generare CAP este alcătuit dintr-o sursă de alimentare de curent alternativ (AC) de înaltă tensiune, produsă în cadrul laboratorului IPARC, cu o formă de undă sinusoidală (tensiune maximă 15 kV), un electrod de înaltă tensiune (HVE), un strat dielectric și un electrod de împământare (GE).

Experimentele *in vitro* au fost realizate prin expunerea indirectă a celulelor tumorale și normale, care presupune tratarea acestora cu mediu lichid activat (PAM) în prealabil cu plasmă non-termică la presiune atmosferică de tip DBD fără flux. În cadrul acestui studiu, soluțiile expuse la plasmă au fost mediul de cultură RPMI 1640 și tampon fosfat salin, timpii de expunere a acestor două soluții la CAP fiind de 30, 60, 90 sau 120 de secunde, iar timpii de tratament ai celulelor cu PAM au fost între 5 și 30 de minute, în funcție de experiment.

3.2. Caracterizarea electrică a descărcărilor CAP

Caracterizările de tensiune și curent ale descărcărilor CAP au fost analizate utilizând sondele Tektronix P6015A și Pearson 6585 conectate la osciloscopul digital TDS5034. Spectrele de emisie optică ale elementelor constitutive ale CAP au fost detectate utilizând un monocromator echipat cu un detector CCD (Horiba Triax 550 cu detector Symphony CCD) într-un interval de lungimi de undă cuprins între 300 nm și 430 nm. Variația temperaturii soluțiilor PAM și din godeurile alăturate din timpul expunerilor a fost măsurată folosind un multimetru și un termocuplu de tip K.

3.3. Analiza pH

Determinările pH ale soluțiilor PAM s-au realizat utilizând PH 210 Microprocessor pH Meter, prin evaluarea a 3 ml de soluție din fiecare varianta experimentală.

3.4. Modelul celular in vitro și tratamentul cu CAP

În vederea evaluării efectelor biologice ale tratamentelor cu CAP, în cadrul acestui studiu au fost utilizate două linii celulare standardizate și anume o linie celulară umană de osteosarcom (HOS) și o linie celulară umană de osteoblaste (HOB). Tratamentele indirecte cu CAP s-au realizat în plăci de culturi celulare cu 96 de godeuri, prin îndepărtarea mediului de creștere, spălarea celulelor cu PBS, aplicarea a 100 µl de PAM/godeu, îndepărtarea acestuia după o perioadă de timp (cunoscută ca și timp de tratament) cuprinsă între 5 și 30 de minute (în funcție de experiment) și adăugarea a 100 µl mediu de creștere/godeu. Experimentele celulare *in vitro* au fost realizate în departamentul de culturi celulare, din cadrul Centrului de cercetare fundamentală și dezvoltare experimentală în medicina translațională (TRANSCEND) al Institutului Regional de Oncologie Iași.

3.5. Izolarea și purificarea ARN

Izolarea ARN s-a realizat prin utilizarea reactivului Tri-Reagent (cat. 93289-100ML, Sigma Aldrich, MO, USA), folosind metoda de separare a fazelor prin centrifugare.

3.6. Realizarea standardelor

Pentru cuantificarea expresiei genice se utilizează un set de standarde, de concentrații cunoscute, diluate în serie, pentru a genera o curbă standard. Acestea au fost realizate prin reverstranscripția unor probe de ARN extras anterior, amplificarea PCR a fragmentelor de interes (utilizând seturi de primeri specifici), validarea electroforetică în gel de agaroză a ampliconilor, purificarea și cuantificarea acestora și realizarea diluțiilor în serie, pentru fiecare genă de analizat în parte.

3.7. Cuantificarea expresiei genelor implicate în controlul ciclului celular și al mecanismelor de moarte celulară prin RT-qPCR

Cuantificarea expresisi genice a fost realizată prin metoda RT-qPCR, utilizând kit-ul comercial GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Wi, USA) și sistemul de amplificare și detecție Rotor Gene 6000 Q 5-plex HRM (Corbett Research, QIAGEN Corporation, GERMANY). Valorile Ct pentru fiecare analiză în parte au fost determinate automat de programul de achiziție a datelor pe baza curbelor de amplificare a probelor standard. Ulterior datele au fost normalizate utilizând valorile Ct ale genei de referință ACTB și raportate la valorile probelor din loturile de control, prin metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$. În final, rezultatele au fost exprimate sub forma log₂ $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.8. Testarea viabilității celulare

În vederea stabilirii citotoxicității tratamentului, s-au realizat teste de viabilitate colorimetrice MTT, care se bazează pe metabolizarea de către celulele vii a

sării de tetrazoliu producând formazam, un compus insolubil de culoare albastră care, prin solubilizare cu DMSO, poate fi detectat spectrofotometric la lungimea de undă de 570 nm.

3.9. Evaluarea speciilor reactive de oxigen și azot

3.9.1. Analiza speciilor reactive de oxigen

În vederea determinării nivelurilor de ROS ale PAM a fost utilizată metoda fluorescentă de detecție cu diacetat de 2',7'-diclorodihidrofluoresceină (DCFH-DA) (cat. D6883-50MG, Sigma Aldrich, MO, USA). Acesta pătrunde în interiorul celulelor unde este hidrolizat rapid de către esterazele celulare până la DCFH non fluorescent, ce este reținut în celulă. Oxidarea DCFH de către peroxidul de hidrogen sau alte specii reactive de oxigen produce indicatorul fluorescent diclorofluoresceină (DCF) ce a fost detectat cu ajutorul cititorului multimodal de plăci FilterMax F5 (Molecular Devices, CA, USA).

3.9.2. Analiza speciilor reactive de azot

Nivelurile de RNS intracelulare și ale PAM au fost determinate prin utilizarea testului Griess (Griess Reagent System, cat. G2930, Promega,WI, USA). Principiul metodei se bazează pe reacția în condiții acide a nitritului cu acidul sulfanilic, formând sarea de diazoniu. Aceasta reacționează cu amina aromatică 1-naftilamină, producând un colorant azoic roșu-violet ce a fost detectat cu ajutorul cititorului multimodal de plăci FilterMax F5 (Molecular Devices, CA, USA).

4. Rezultate și discuții

4.1. Caracterizarea electrică a descărcărilor DBD fără flux

Figura 4.1 prezintă formă de undă tipică curent-tensiune obținută în timpul funcționării sursei de generare CAP. Din punct de vedere electric, descărcările din bariera dielectrică sunt prezentate sub formă de pachete cu frecvența de 100 Hz, frecvența tensiunii electrice identificate în pachete a fost de 23 kHz.



Figura 4.1. Modelul impulsurilor de descărcare a barierei dielectrice (DBD) și forme de undă curenttensiune într-un pachet de descărcare

4.2. Spectroscopie de emisie optică



Figura 4.2. Spectrul de emisie optică a plasmei atmosferice reci (CAP) în intervalul 300 - 427 nm

Spectrele de emisie optică obținute pentru descărcările CAP prezintă mai multe linii caracteristice ale celui de-al doilea sistem pozitiv al azotului molecular (Figura 4.2), identificate la lungimile de undă 313.51, 315.78, 328.55, 337.28, 349.86, 353.73, 357.67, 366.89, 371.21, 375.72, 380.48, 389.43, 391.46, 394.15, 399.56, 405.92, 413.91 și 420.22 nm.

4.3. Temperatura de expunere

4.3.1. Temperatura descărcării

Pentru a determina temperatura de rotație a azotului în timpul descărcării CAP, au fost obținute spectre de înaltă rezoluție în intervalul 331 - 338 nm (cu o rezoluție de 0.017 nm). Datele OES obținute au fost supuse analizei utilizând sistemul C-B pozitiv secund al azotului molecular ca model de simulare pentru fitarea datelor cu software-ul MassiveOES (Voráč et al., 2019), identificându-se o valoare media a temperaturii de rotație de 1163 ± 24 K.

4.3.2. Temperatura PAM

Monitorizând temperatura soluției supuse descărcărilor CAP, s-a observat că expunerea a provocat doar creșteri minore de temperatură ale PAM, aceasta nedepășind valoare de 30°C.

4.4. Evaluare pH-ului PAM

Observând modificarea treptată a culorii mediului RPMI 1640 (conținând roșu fenol) în timpul expunerilor la descărcări de CAP, în funcție de timpul de expunere utilizat, etapa ulterioară a studiului a fost evaluarea pH-ului soluțiilor de PAM obținute. În urma expunerii soluțiilor PBS și RPMI la CAP pentru 30, 60, 90 și 120 de secunde, s-a identificat o acidificare treptată a acestor, într-o manieră dependentă de doză (Figura 4.3). Conform rezultatelor obținute procesul de acidificare a fost mai pronunțat în cazul soluțiilor PAM-PBS.



Figura 4.3. Analiza pH a soluțiilor PAM-PBS (A) și PAM-RPMI (B) după expunerea la CAP. Valorile sunt medii ±SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (**** p<0.0001).

4.4. Stabilitatea pH-ului PAM la diferite temperaturi de stocare

Tratamentele PAM-PBS prezintă fluctuații ale nivelurilor pH cuprinse între 0,01 și 0,33, acestea nefiind influențate de temperatura de stocare. În cazul tratamentelor cu PAM-RPMI, fluctuațiile nivelurilor pH identificate au fost între 0,03 și 0,46, spre deosebire de PAM-PBS aceste fluctuații fiind dependente de temperatura de stocare. Rezultatele obținute demonstrează faptul că ambele tipuri de tratamente pot fi stocate până la 3 luni, modificările de pH înregistrate nefiind destul de mari încât să influențeze rezultatele tratamentelor indirecte cu CAP (Figura 4.4). Totuși se poate observa că –80°C este temperatura optimă de depozitare a tratamentului PAM-RPMI datorită variației sale sub 0,1 pH, pentru toate variantele experimentale.

PAM-PBS

PAM-RPMI



Figura 4.4. Variațiile valorilor pH-ului soluțiilor PAM-PBS și PAM-RPMI identificate pe parcursul a 3 luni de depozitare la diferite temperaturi.

4.5. Impactul tratamentelor cu PAM-PBS și PAM-RPMI asupra viabilității celulare

Rezultatelor obținute au indicat că, pentru timpii de expunere de 30 de secunde și 60 de secunde, efectele citotoxice au fost relativ comparabile între cele două soluții, cu un efect citotoxic puțin mai puternic observat pentru PAM-RPMI. Cu toate acestea, pentru timpii de expunere de 90 de secunde și 120 de secunde, a fost observată o diferență semnificativă între cele două soluții, PAM-RPMI 90s având ca rezultat o reducere a viabilității celulelor HOS de 78%, iar PAM-RPMI 120s de 85%, pe când tratamentele cu PAM-PBS 90s și PAM-PBS 120s au redus viabilitatea celulară cu doar 17,2% și respectiv 26,5% (Figura 4.5). Posibila reactivitate dintre CAP și multitudinea de elemente constitutive ale mediului RPMI, spre deosebire de soluția simplă de PBS, poate fi cauza citotoxicității mai mari observate în acest studiu, la utilizarea PAM-RPMI. Ca urmare a gradului de citotoxicitate mai ridicat, RPMI 1640 a fost selectat ca soluție de expus pentru producerea PAM din etapele ulterioare ale acestui studiu.



Figura 4.5. Viabilitatea celulelor HOS tratate cu PAM-PBS (A) și PAM-RPMI (B). Valorile sunt medii ±SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, ** p < 0.01, **** p < 0.0001).

4.6. Evaluarea temporală a efectelor tratamentului cu PAM-RPMI asupra viabilității celulare

Analizând evoluția procentului de viabilitate celulară pe parcursul desfășurării întregului experiment, s-a observat faptul că toate variantele de tratament reduc semnificativ numărul celulelor viabile încă de la prima evaluare, la două ore după tratament. Chiar dacă în cazul anumitor variante experimentale, la anumite ore, nu au fost identificate diferențe semnificativ statistice, tendința generală observată a fost de scădere progresivă a viabilității celulare, aceasta fiind cel mai vizibilă în intervalul 12 – 48 de ore post-tratament (Figura 4.6.). Astfel putem afirma că, după tratarea indirectă cu PAM-RPMI a celulelor HOS pentru 30 de minute, efectele tratamentului durează până la cel puțin 48 de ore de la îndepărtarea acestuia.



Figura 4.6. Viabilitatea celulelor HOS tratate cu PAM-RPMI 30s (A), PAM-RPMI 60s (B), PAM-RPMI 90s (C) și PAM-RPMI 120s (D). Valorile sunt medii ±SEM (n=8). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0004 **** p < 0.0001)

4.7. Identificarea timpului optim de tratament

Tratamentul PAM-RPMI a prezentat efecte citotoxice pentru toate variantele experimentale, acestea variand de la ușoare la moderate și puternice, în funcție de combinația de timp de expunere și de timp de tratament (Figura 4.7).



Figura 4.7. Analiza comparativă a citotoxicității PAM-RPMI influențată de Ttr. Valorile sunt medii ±SEM (n=4). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA bifactorială, urmată de testul Tuckey post hoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, *** p = 0.0004, **** p < 0.0001).</p>

4.8. Stabilirea influenței pH asupra viabilității celulare

Pentru a investiga impactul acidificării mediului expus la CAP asupra celulelor, au fost utilizate două loturi de celule HOS. Un lot a fost tratat cu PAM-RPMI în trei variante experimentale (cu T_{exp} de 30, 60 și 90 de secunde), iar celălalt lot a fost tratat cu mediu RPMI 1640 simplu al cărui pH a fost modificat cu acid clorhidric pentru a ajunge la valori similare de pH cu cele ale PAM-RPMI.



Figura 4.8. Viabilitatea celulelor HOS tratate cu PAM-RPMI și soluție RPMI 1640 modificată cu pH. Valorile sunt medii ±SEM (n=4). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA bifactorială, urmată de testul Šídák post-hoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, **** p < 0.0001).

Comparând efectele asupra viabilității celulelor HOS a celor două tipuri de tratamente (pH-RPMI și PAM-RPMI), s-a concluzionat că scăderea pH a RPMI 1640 nu influențează viabilitatea celulelor HOS, efectele citotoxice fiind așadar determinate doar de expunerea RPMI 1640 la CAP.

4.9. Determinarea selectivității tratamentului

Selectivitatea tratamentului indirect CAP a fost evaluată prin tratarea celulor tumorale HOS și a celulelor normale HOB cu PAM-RPMI și analiza viabilității acestora în două puncte temporale prestabilite, și anume la două și respectiv douăzeci și patru de ore post-tratament. Soluțiile PAM-RPMI utilizate au fost expuse la CAP pentru 30, 60 și 90 de secunde.



Figura 4.9. Evaluarea selectivității tratamentului cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ±SEM (n=3).
Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA bifactorială, urmată de testul Šídák post-hoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, *** p = 0.001, **** p < 0.0001).</p>

În urma analizării rezultatelor, se poate afirma faptul că tratamentul cu PAM-RPMI utilizat în acest studiu și produs prin descărcare de tip DBD, prezintă un efect apoptotic selectiv în cazul celulelor de osteosarcom, cu un impact maxim în cazul utilizării unui timp de expunere la CAP a mediului RPMI 1640 de 90 de secunde. Astfel, tratamentul are capacitatea de a distruge celulele HOS, celulele normale adiacente fiind afectate într-o foarte mică măsură.

4.10. Analiza expresiei genice

În urma analizării rezulatelor obținute în cadrul evaluării temporale a efectelor tratamentului cu plasmă non-termică la presiune atmosferică asupra celulelor HOS, s-a

stabilit realizarea analizei expresiei genice la două și douăzeci și patru de ore posttratament.



Figura 4.10. Analiza expresiei genelor BAX, CASP9 şi CASP3 la nivelul celulelor HOS şi HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001, ***** p < 0.0001).</p>



Figura 4.11. Analiza expresiei genelor DIABLO, JNK1 şi CASP8 la nivelul celulelor HOS şi HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001, ***** p < 0.0001).</p>



Figura 4.12. Analiza expresiei genelor BCL2, CFLAR ȘI XIAP la nivelul celulelor HOS și HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001, ***** p < 0.0001).</p>



Figura 4.13. Analiza expresiei genelor TNFα, RIPK3 şi TP53 la nivelul celulelor HOS şi HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001, ***** p < 0.0001).</p>



Figura 4.14. Analiza expresiei genelor CDKN1A şi MKI67 la nivelul celulelor HOS şi HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns – nesemnificativ, * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.001, **** p < 0.0001).</p>

Primul aspect important ce se evidențiază în urma evaluării expresiei genice la celulele HOS și HOB tratate cu PAM-RPMI este lipsa relației doză-efect (Figurile 4.10 – 4.14). Exceptând câteva situații, nu a putut fi identificată o corelație între timpul de expunere și nivelul de expresie genică, indiferent de momentul post-tratament la care a fost realizată analiza. În schimb, au putut fi observate modificări similare ale nivelelor de expresie genică la probele tratate cu PAM-RPMI 30s și PAM-RPMI 60s, dar diferite față de nivelul de expresie genică al probelor tratate cu PAM-RPMI 90s. Mai mult, în cazul evaluării nivelului de expresiei a unor gene, variantele experimentale de tratament au prezentat modulări opuse. Chiar dacă acest fapt poate fi considerat un impediment în

ceea ce privește terapia cu CAP, modularea diferită a expresiei unor gene în funcție de timpul de expunere poate reprezenta un avantaj clinic prin posibilitatea de a oferi pacienților tratamente personalizate atunci când se dorește activarea anumitor căi de semnalizare celulară sau, din contra, evitarea activării acestora.

Analizând în general efectul tratamentului indirect cu CAP asupra modulării expresiei genice (Figurile 4.10 - 4.14), neținând cont de rezultatul fiecărei variante experimentale în parte, ci de tendinta observată, se poate afirma că, la două ore după tratament, PAM-RPMI a avut ca efect blocarea ciclului celular și activarea căii intrinseci de semnalizare a apoptozei la celulele HOS prin supraexprimarea genelor CDKN1A, TP53, BAX și DIABLO. Conform acestei căi de semnalizare celulară, în urma activării de către varii stimuli (printre care și ROS) a genei TP53, aceasta activează gena CDKN1A, ce duce la blocarea ciclului celular, si gena BAX, care la rândul ei activează gena DIABLO și eliberează citocromul C. Gena DIABLO inhibă expresia genei antiapoptotice XIAP și, împreună cu gena BAX, activează cascada de caspaze apoptotice. La douăzeci și patru de ore după tratament a fost observată supraexprimarea genei RIPK3, implicată în procesul de moarte celulară prin necroptoză, nefiind identificate supraexprimări ale genelor implicate în procesul apoptotic. Surprinzător, indiferent de timpul la care au avut loc evaluările, nu a fost observat un efect de activare a căilor de semnalizare antiapoptotice (cu excepția tratamentului cu PAM-RPMI 90s, unde, observând datele de viabilitate celulară, supraexprimarea acestor gene a fost tardivă). În ceea ce privește efectele tratamentului indirect cu CAP asupra celulelor HOB, acesta a determinat blocarea ciclului celular și activarea căii intrinseci de semnalizare a apoptozei prin supraexprimarea genelor CDKN1A, TP53, BAX, CASP9 si CASP3, activarea căii extrinseci de semnalizare a apoptozei prin activarea genei CASP8, precum și supraexprimarea markerului de necroptoză celulară RIPK3. Conform căii de semnalizare intrinsecă a apoptozei, activarea genei TP53 duce la activarea genei CDKN1A ce blochează ciclul celular și la activarea genei BAX ce eliberează citocromul C. Acesta din urma promovează formarea apoptosomului ce are ca rezultat activarea genei CASP9, care, la rândul ei, activează gena CASP3. La douăzeci și patru de ore în urma tratamentului cu PAM-RPMI, toate genele ce promovează blocarea ciclului celular sau moartea celulară au fost supraexprimate. În privința modulării expresiei genelor antiapoptotice la celulele HOB de către PAM-RPMI, la două ore după tratament este identificată supraexpresia genei BCL2. Aceasta are capacitatea de a inhiba procesele apoptotice prin inactivarea genelor BAX și DIABLO. La douăzeci și patru de ore după tratament, a fost observată supraexprimarea genelor CFLAR, ce are rolul de a inactiva expresia genei CASP8, și XIAP care are funcția de a inactiva genele DIABLO, CASP9 și CASP3. Subexpresia genei MKI67, în cazul ambelor linii celulare, atât la două, cât și la douăzeci și patru de ore post-tratament, relevă faptul că procesele de proliferare celulară sunt suprimate.

Cea mai importantă diferență între efectele PAM-RPMI asupra expresiei genice a celulelor HOS și HOB o reprezintă supraexprimarea genelor antitpoptotice la celulele normale. Acest răspuns celular poate sta la baza selectivității tratamentului indirect cu CAP, prin blocarea în celulele normale a semnalelor proapoptotice induse de acesta.

4.11. Determinarea speciilor reactive de azot și oxigen

4.11.1 RNS

În urma expunerii mediului RPMI la descărcări CAP pentru 30 s, 60 s și 90 s au fost identificate concentrații milimolare de NO_2^- și NO_3^- în toate variantele experimentale, acestea fiind generate într-o manieră dependentă de doza de CAP (Figura 4.15).

Analizând nivelurile intracelulare RNS, s-a observat la ambele linii celulare că acestea cresc într-un mod dependent de doza de CAP imediat după tratament, urmând ca la două ore să revină la valorile de bază care se mențin până la douăzeci și patru de ore post-tratament (Figura 4.16). Interesant este faptul că la nivelul celulelor HOB au fost identificate concentrații mult mai ridicate de RNS, spre deosebire de celulele HOS.



Figura 4.15. Cuantificarea NO₂⁻ (A) și NO₃⁻ (B) din soluțiile de PAM-RPMI. Valorile sunt medii ±SEM (n=3). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (**** p<0.0001).



Figura 4.16. Evaluarea nivelului NO⁻₂ din celulele HOS şi HOB tratate cu PAM-RPMI. Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns - nesemnificativ, * p < 0.05, **** p < 0.0001)</p>

4.11.2. ROS

Analiza intracelulară a nivelului de ROS din celulele tumorale și normale, pe o perioadă de douăzeci și patru de ore de la tratament (Figura 4.17) a relevat faptul că, în cazul celulelor HOB, imediat după tratament, nivelul ROS a scăzut într-o manieră dependentă de doza de tratament. După două ore, valorile au revenit la normal, rămânând constante până la douăzeci și patru de ore post-tratament. Această reducere ar putea fi rezultată în urma unei activări intense și imediate în urma tratamentului cu PAM-RPMI a mecanismelor celulare antioxidante, activitatea acestora scăzând concentrațiile de ROS sub nivelul de bază. În ceea ce privește nivelurile intracelulare de ROS din celulele HOS, acestea au suferit o creștere ușoară (cu excepția probelor tratate cu PAM-RPMI 90s) și continuă pe parcursul celor douăzeci și patru de ore. Acumularea ROS intracelulară ce a avut loc după îndepărtarea tratamentelor cu PAM demonstrează un efect al CAP de inducere a producției de ROS intracelular sau de dereglare a mecanismelor antioxidante, astfel se poate afirma că efectele biologice nu se bazează exclusiv pe concentrațiile speciilor reactive generate de CAP și prezente în CAP.



Figura 4.17. Analiza ROS din celulele HOS și HOB tratate cu PAM-RPMI. Valorile sunt medii ± SEM (n=6). Semnificația statistică a fost determinată prin analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul Dunnett posthoc de comparație multiplă (ns - nesemnificativ, **** p < 0.0001)

Concluzii generale

Considerând rezultatele experimentale ale prezentului studiu, au fost elaborate următoarele concluzii:

- Caracterizarea electrică a descărcărilor CAP a evidențiat o formă de undă tipică curent-tensiune, descărcările de tip barieră dielectrică fiind sub formă de pachete cu o frecvență de 100 Hz, iar frecvența tensiunii electrice din fiecare pachet fiind de 23 kHz.
- Numărul mediu de curenți din cadrul fiecărui pachet de descărcare este de aproximativ 1600, cu valori ale intensității cuprinse între 0,06 A şi 0,72 A.
- Sursa de generare CAP produce PAM a cărui temperatură în timpul expunerii nu depăşeşte 30°C.
- În urma expunerii la CAP, PBS suferă un proces de acidifiere mai pronunțat decât RPMI 1640.
- Temperatura optimă de stocare a soluțiilor PAM, fără a fi modificate nivelurile pH ale acestora, pentru o perioadă de până la 3 luni este de -80°C, cele mai stabile soluții fiind cele de PAM-RPMI.
- 6. Sistemul de generare CAP produce PAM cu efecte citotoxice asupra celulelor umane de osteosarcom, dependente de doza de tratament.
- 7. PAM-RPMI are capacitatea de a produce efecte citotoxice asupra celulelor HOS mai puternice decât PAM-PBS.
- 8. Dintre toate variantele experimentale analizate, tratamentul cu PAM-RPMI expus la CAP pentru 120s demonstrează cea mai puternică acțiune antitumorală, dar nu a putut fi utilizat în cadrul evaluărilor expresiei genice și a nivelurilor de RONS deoarece rata de mortalitate celulară indusă de acesta a fost de aproape 100%.
- Efectele citotoxice ale tratamentului cu PAM-RPMI se accentuează pe o perioadă de cel puțin patruzeci și opt de ore de la îndepărtarea acestuia.
- În configurația de generare PAM-RPMI prezentată, timpul optim de tratament, cu
 eficiența cea mai ridicată, este de 30 de minute.

- 11. Acidificarea observată a tratamentelor PAM-RPMI nu influențează viabilitatea celulară, efectele citotoxice fiind determinate exclusiv de caracteristicile antitumorale ale CAP.
- 12. Sistemul utilizat de generare CAP are capacitatea de a produce PAM-RPMI cu efecte citotoxice selective.
- Modularea expresiei genice ca urmare a tratamentului cu PAM-RPMI nu este dependentă de doza de tratament.
- Tratamentul cu PAM-RPMI a celulelor HOS a determinat blocarea ciclului celular și activarea mecanismelor apoptotice și necroptotice de semnalizare celulară, prin suprareglarea expresiei genelor CDKN1A, TP53, BAX, DIABLO și RIPK3.
- Tratamentul cu PAM-RPMI a celulelor HOB a determinat blocarea ciclului celular și activarea mecanismelor apoptotice și necroptotice de semnalizare celulară, prin suprareglarea genelor CDKN1A, TP53, BAX, DIABLO, JNK1, CASP9, CASP8, CASP3, TNFα și RIPK3.
- Ca urmare a tratamentului cu PAM-RPMI, la nivelul celulelor HOB se activează mecanismele de semnalizare celulară antiapoptotice, prin supraexprimarea genelor BCL2, CFLAR şi XIAP.
- Tratamentul cu PAM-RPMI determină la ambele linii celulare studiate reducerea sau inhibarea proceselor de proliferare celulară prin modularea nivelului de expresie a genei MKI67.
- 18. Activarea căilor de semnalizare antiapoptotice la celulele HOB poate reprezenta unul dintre mecanismele ce stau la baza selectivității tratamentului indirect cu CAP.
- 19. Expunerea mediului RPMI 1640 la descărcarile CAP generate de sistemul prezentat în acest studiu produce cele mai ridicate niveluri de RNS raportate până în prezent în ceea ce privește efectele tratamentelor indirecte cu CAP în oncologie.
- 20. Tratamentele cu PAM-RPMI cresc în funcție de dozaj nivelurile intracelulare de NO_2^- la ambele tipuri de celule evaluate în cadrul acestui studiu.

- Tratamentele cu PAM-RPMI determină acumularea ROS intracelulară la celulele HOS într-o manieră dependentă de doză, celulele HOB având capacitatea de a menține sub control nivelurile ROS intracelulare.
- 22. Conform rezultatelor obținute, gradul de citotoxicitate al tratamentului cu PAM-RPMI este dictat de potențialul acestuia de a induce modificări ale concentrațiilor intracelulare de ROS, capacitatea celulelor HOB de contracarare a stresului oxidativ conferindu-le rezistență la tratamentul cu CAP.
- 23. Considerând rezultatele experimentale obținute, soluțiile de PAM-RPMI obținute cu ajutorul sistemului de generare CAP prezentat ar putea reprezenta o abordare promițătoare în terapia osteosarcomului.

Articole publicate

Lista lucrărilor publicate în calitate de autor principal

- Stache, A.B.; Mihăilă, I.; Gerber, I.C.; Dragoş, L.M.; Mihai, C.T.; Ivanov, I.C.; Topală, I.; Gorgan, D.-L., 2023. Optimization of Indirect CAP Exposure as an Effective Osteosarcoma Cells Treatment with Cytotoxic Effects. Appl. Sci., 13, 7803. <u>https://doi.org/10.3390/app13137803</u>
- Stache, A.B.; Mihăilă, I.; Gerber, I.C.; Dragoş, L.M.; Mihai, C.T.; Ivanov, I.C.; Topală, I.; Gorgan, D.-L., 2023. Cold atmospheric plasma treatment modulates the expression of cdk1, tnfα and tp53 genes in human osteosarcoma cells. J Exp Molec Biol 24(3):x-xx. https://doi.org/10.47743/jemb-2023-100

Lista lucrărilor publicate în calitate de co-autor

 Dragoş, M.L.; Ivanov, I.C.; Menţel, M.; Văcărean-Trandafir, I.C.; Sireteanu, A.; Titianu, A.A.; Dăscălescu, A.S.; Stache, A.B.; Jitaru, D.; Gorgan, D.L., 2022. Prognostic Value of Association of Copy Number Alterations and Cell-Surface Expression Markers in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. Int. J. Mol. Sci., 23, 7530. https://doi.org/10.3390/ijms23147530

- Boiangiu, R.S.; Mihasan, M.; Gorgan, D.L.; Stache, B.A.; Hritcu, L., 2021. Anxiolytic, Promnesic, Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Effects of Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine in Scopolamine-Induced Zebrafish (Danio rerio) Model of Alzheimer's Disease. Antioxidants, 10, 212. https://doi.org/10.3390/antiox10020212
- Boiangiu, R.S.; Mihasan, M.; Gorgan, D.L.; Stache, B.A.; Petre, B.A.; Hritcu, L., 2020. Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine Reverses Memory Deficits and Reduces Oxidative Stress in Aβ25-35-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. Antioxidants, 9, 768. https://doi.org/10.3390/antiox9080768

Participări la manifistări științifice

Lista lucrărilor susținute la conferințe internaționale

- Stache A.B., Dragoş M.L., Ivanov I.C., Mihăilă I., Topală I., Mihai C.T., Gorgan D.L., The impact of two different cold atmospheric plasma-exposed media treatments on the osteosarcoma cells viability. *CONFER 2020*, November 19th-22nd, 2020, Iaşi, România.
- Stache A.B., Dragoş M.L., Ivanov I.C., Topală I., Mihăilă I., Mihai C.T., Gorgan D.L., Cold atmospheric plasma indirect treatment generates different antiapoptotic genetic response in osteoblasts and osteosarcoma cells. *CONFER 2021*, November 18th-21st, 2021, Iaşi, România.
- Stache A.B., Dragoş M.L., Ivanov I.C., Topală I., Mihăilă I., Mihai C.T., Gorgan D.L., Evaluation of the intracellular reactive oxygen and nitrogen species induced by cold atmospheric plasma treatment. *CONFER 2022*, November 24th-26th, 2022, Iaşi, România.
- Gherghel D., Cădinoiu A.N., Atanase L.I., Popa M., Sande A.S., Mihai C.T., Stache A.B., Vochița G., In vitro biocompatibility assessment of new

functionalized chitosan-coated liposome nanoparticles. *XXXI th edition of the International Congress of "Apollonia" University of Iasi "By promoting excellence, we prepare the future"*, March 2nd-5th, 2023, Iași, România.

- Brînza I., Stache A. B., Omayma E., Gorgan D.L., Mihăşan M., Hriţcu L., Sweroside supports memory function by increasing mRNA expression of bdnf, creb, npy and decreasing AChE activity and brain oxidative stress in the scopolamine induced zebrafish model (*Danio rerio*). *YSF congresis*. July 6th-9th, 2022, Vimeiro, Portugal,.
- Brînza I., Stache A. B., Omayma E., Gorgan D.L., Mihăşan M., Hriţcu L., Sweroside supports memory function by increasing mRNA expression of bdnf, creb, npy and decreasing AChE activity and brain oxidative stress in the scopolamine induced zebrafish model (*Danio rerio*). *IUBMB-FEBS-PABMB congresis*, July 9th-14th, 2022, Lisbon, Portugal.
- 7. Brînza I., Stache A. B., Omayma E., Gorgan D.L., Mihăşan M., Hriţcu L., Baicalein Prevent Scopolamine-Induced Memory Impairment in Zebra Fish by Increasing the Creb Protein Level and the mRNA Expression Of Bdnf and Creb1 Gene. *"Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community"*, September 29th-30th, 2022, Chisinau, Republica Moldova.
- Brînza I., Stache A. B., Omayma E., Gorgan D.L., Mihăşan M., Hriţcu L., Sweroside supports memory function in the scopolamine-induced zebrafish model (*Danio rerio*) of Alzheimer disease, International conference and XXXIXth scientific session of the Romanian Society for Cell Biology, 21st-23rd, 2022, Cluj-Napoca, Romania.

Lista lucrărilor susținute la conferințe naționale

1. **Stache A.B.**, Dragoș M.L., Mihăilă I., Topală I., Gorgan D.L., Cold plasmainduced apoptosis in osteosarcoma cells. *11th national congress with international* participation and 37th annual scientific session of Romanian Society for Cell Biology, June 20th-23rd, 2019, Constanța, România.

- Stache A.B., Dragoş M.L., Mihăilă I., Topală I., Gorgan D.L., CAP treatment modulates the apoptosis and cell cycle control in a human osteosarcoma cell line. *Conferința școlilor doctorale din cadrul Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași*, October 22nd-23rd, 2020, Iași, România.
- 3. Stache A.B., Dragoş M.L., Topală I., Mihăilă I., Mihai C.T., Gorgan D.L., Impactul tratamentului cu plasmă non-termică la presiune atmosferică asupra expresiei genelor asociate controlului apoptozei. Sesiunea ştiințifică a Facultății de Biologie - Tendințe în biologie: de la molecule la sisteme complexe. October 28th-29th, 2021, Iaşi, România.

Proiecte de cercetare – membru

- Membru în grupul țintă al proiectului Creșterea numărului absolvenților de învățământ terțiar universitar și non universitar care își găsesc un loc de muncă urmare a accesului la activități de învățare la un potențial loc de muncă / cercetare/ inovare, cu accent pe sectoarele economice cu potențial competitiv identificate conform SNC și domeniile de specializare inteligentă conform SNCDI. POCU/380/6/13/123623.
- 2. Asistent de cercetare științifică în cadrul proiectului *Active targeted drug delivery systems based on peptide-functionalized magnetic nanoparticles for the treatment of inner ear diseases (TargEar).* RO-NO-2019-0187.
- Asistent de cercetare ştiințifică în cadrul proiectului Dezvoltarea Stației de monitorizare a peştilor migratori: sturioni şi scrumbie – Isaccea. Cod SMIS 2014+136849.

- Arndt, S., Wacker, E., Li, Y.-F., Shimizu, T., Thomas, H. M., Morfill, G. E., Karrer, S., Zimmermann, J. L., & Bosserhoff, A.-K. (2013). Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 22(4), 284–289. https://doi.org/10.1111/exd.12127
- Bekeschus, S., Masur, K., Kolata, J., Wende, K., Schmidt, A., Bundscherer, L., Barton, A., Kramer, A., Bröker, B., & Weltmann, K.-D. (2013). Human Mononuclear Cell Survival and Proliferation is Modulated by Cold Atmospheric Plasma Jet. *Plasma Processes and Polymers*, 10(8), 706–713. https://doi.org/10.1002/ppap.201300008
- Bogle, M. A., Arndt, K. A., & Dover, J. S. (2007). Evaluation of Plasma Skin Regeneration Technology in Low-Energy Full-Facial Rejuvenation. *Archives of Dermatology*, 143(2), 168–174. https://doi.org/10.1001/archderm.143.2.168
- Canal, C., Fontelo, R., Hamouda, I., Guillem-Marti, J., Cvelbar, U., & Ginebra, M. P. (2017). Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. *Free Radical Biology and Medicine*, *110*, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.023
- Chang, J. W., Kang, S. U., Shin, Y. S., Kim, K. Il, Seo, S. J., Yang, S. S., Lee, J.-S., Moon, E., Lee, K., & Kim, C.-H. (2014). Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Inhibits Thyroid Papillary Cancer Cell Invasion via Cytoskeletal Modulation, Altered MMP-2/-9/uPA Activity. *PLoS ONE*, 9(3), e92198. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092198
- Dubuc, A., Monsarrat, P., Virard, F., Merbahi, N., Sarrette, J.-P., Laurencin-Dalicieux, S., & Cousty, S. (2018). Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 175883591878647. https://doi.org/10.1177/1758835918786475
- Elaissi, S., & Charrada, K. (2021). Simulation of Cold Atmospheric Plasma Generated by Floating-Electrode Dielectric Barrier Pulsed Discharge Used for the Cancer

Cell Necrosis. *Coatings* 2021, Vol. 11, Page 1405, 11(11), 1405. https://doi.org/10.3390/COATINGS11111405

- Ermakov, A. M., Ermakova, O. N., Afanasyeva, V. A., & Popov, A. L. (2021). Dosedependent effects of cold atmospheric argon plasma on the mesenchymal stem and osteosarcoma cells in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). https://doi.org/10.3390/IJMS22136797/S1
- Faramarzi, F., Zafari, P., Alimohammadi, M., Moonesi, M., Rafiei, A., & Bekeschus, S. (2021). Cold Physical Plasma in Cancer Therapy: Mechanisms, Signaling, and Immunity. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/9916796
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., & Fridman, A. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5(6), 503– 533. https://doi.org/10.1002/ppap.200700154
- Gay-Mimbrera, J., García, M. C., Isla-Tejera, B., Rodero-Serrano, A., García-Nieto, A. V., & Ruano, J. (2016). Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Advances in Therapy*, *33*(6), 894–909. https://doi.org/10.1007/s12325-016-0338-1
- Gerber, I. C., Mihai, C. T., Gorgan, L., Ciorpac, M., Nita, A., Pohoata, V., Mihaila, I., & Topala, I. (2017). Viability and Cell Biology for HeLa and Vero Cells after Exposure to Low-Temperature Air Dielectric Barrier Discharge Plasma. In *Plasma Medicine* (Vol. 7, Issue 2). www.begellhouse.com
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. In *Redox Biology* (Vol. 6, pp. 260–271). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010
- Gümbel, D., Bekeschus, S., Gelbrich, N., Napp, M., Ekkernkamp, A., Kramer, A., & Stope, M. B. (2017). Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Osteosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). https://doi.org/10.3390/IJMS18092004

- Gümbel, D., Gelbrich, N., Weiss, M., Napp, M., Daeschlein, G., Sckell, A., Ender, S. A., Kramer, A., Burchardt, M., Ekkernkamp, A., & Stope, M. B. (2016). New Treatment Options for Osteosarcoma Inactivation of Osteosarcoma Cells by Cold Atmospheric Plasma. *Anticancer Research*, 36(11), 5915–5922. https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.11178
- Gümbel, D., Suchy, B., Wien, L., Gelbrich, N., Napp, M., Kramer, A., Ekkernkamp, A., Daeschlein, G., & Stope, M. B. (2017). Comparison of Cold Atmospheric Plasma Devices' Efficacy on Osteosarcoma and Fibroblastic In Vitro Cell Models. *Anticancer Research*, 37(10), 5407–5414. https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.11968
- Haier, J., & Schaefers, J. (2022). Economic Perspective of Cancer Care and Its Consequences for Vulnerable Groups. *Cancers*, 14(13). https://doi.org/10.3390/CANCERS14133158
- Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J., & Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy* of Dermatology and Venereology, 25(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x
- Heslin, C., Boehm, D., Milosavljevic, V., Laycock, M., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2014). Quantitative Assessment of Blood Coagulation by Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Medicine*, 4(1–4), 153–163. https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2014011997
- Hoffmann, C., Berganza, C., & Zhang, J. (2013). Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Medical Gas Research*, 3(1), 21. https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-21
- Jo, A., Bae, J. H., Yoon, Y. J., Chung, T. H., Lee, E. W., Kim, Y. H., Joh, H. M., & Chung, J. W. (2022). Plasma-activated medium induces ferroptosis by depleting FSP1 in human lung cancer cells. *Cell Death & Disease 2022 13:3*, 13(3), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04660-9

- Jo, H., Jun, H.-W., Shin, J., & Lee, S. (Eds.). (2016). Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies (Vol. 9). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21813-7
- Judée, F., Vaquero, J., Guegan, S., Fouassier, L., & Dufour, T. (2019). Atmospheric pressure plasma jets applied to cancerology: correlating electrical configurations with in vivo toxicity and therapeutic efficiency. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 52(24), 24. https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab0fbbï
- Kalghatgi, S., Kelly, C. M., Cerchar, E., Torabi, B., Alekseev, O., Fridman, A., Friedman, G., & Azizkhan-Clifford, J. (2011). Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 6(1), e16270. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016270
- Keidar, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Ann Stepp, M., Srinivasan, P., Sandler, A., & Trink, B. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas*, 20(5), 057101. https://doi.org/10.1063/1.4801516
- Keidar, M., Walk, R., Shashurin, A., Srinivasan, P., Sandler, A., Dasgupta, S., Ravi, R., Guerrero-Preston, R., & Trink, B. (2011). Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 105(9), 1295–1301. https://doi.org/10.1038/bjc.2011.386
- Kong, M. G., Keidar, M., & Ostrikov, K. (2011). Plasmas meet nanoparticles—where synergies can advance the frontier of medicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(17), 174018. https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/17/174018
- Laroussi, M. (2018). Plasma Medicine: A Brief Introduction. *Plasma*, 1(1), 47–60. https://doi.org/10.3390/plasma1010005
- Laroussi, M., & Akan, T. (2007). Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review. In *Plasma Processes and Polymers* (Vol. 4, Issue 9, pp. 777–788). https://doi.org/10.1002/ppap.200700066
- Lee, H. J., Shon, C. H., Kim, Y. S., Kim, S., Kim, G. C., & Kong, M. G. (2009). Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal

atmospheric pressure microplasma. *New Journal of Physics*, *11*(11), 115026. https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115026

- Lin, L., Li, Z., Yan, L., Liu, Y., Yang, H., & Li, H. (2021). Global, regional, and national cancer incidence and death for 29 cancer groups in 2019 and trends analysis of the global cancer burden, 1990–2019. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 197. https://doi.org/10.1186/S13045-021-01213-Z
- Maes, A., Menu, E., Veirman, K. De, Maes, K., Vand Erkerken, K., & De Bruyne, E. (2017). The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. *Oncotarget*, 8(52), 90501–90520. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18765
- Malyavko, A., Yan, D., Wang, Q., Klein, A. L., Patel, K. C., Sherman, J. H., & Keidar, M. (2020). Cold atmospheric plasma cancer treatment, direct versus indirect approaches. *Materials Advances*, 1(6), 1494–1505. https://doi.org/10.1039/D0MA00329H
- Martinez, L., Dhruv, A., Lin, L., Balaras, E., & Keidar, M. (2019). Interaction between a helium atmospheric plasma jet and targets and dynamics of the interface. *Plasma Sources Science and Technology*, 28(11), 115002. https://doi.org/10.1088/1361-6595/ab4167
- Mateu-Sanz, M., Tornín, J., Brulin, B., Khlyustova, A., Ginebra, M. P., Layrolle, P., & Canal, C. (2020). Cold plasma-treated ringer's saline: A weapon to target osteosarcoma. *Cancers*, 12(1), 1–19. https://doi.org/10.3390/cancers12010227
- Mertens, N., Helmke, A., Goppold, A., Emmert, S., Kaemling, A., Wandke, D., & Vioel, W. (2009). Low temperature plasma treatment of human tissue. Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA.
- Min, S. C., Roh, S. H., Niemira, B. A., Sites, J. E., Boyd, G., & Lacombe, A. (2016). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma inhibits Escherichia coli O157:H7, Salmonella, Listeria monocytogenes, and Tulane virus in Romaine lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 114–120. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.025

- Mirpour, S., Fathollah, S., Mansouri, P., Larijani, B., Ghoranneviss, M., Mohajeri Tehrani, M., & Amini, M. R. (2020). Cold atmospheric plasma as an effective method to treat diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67232-x
- Motaln, H., Recek, N., & Rogelj, B. (2021). Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1336, 26(5), 1336. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051336
- Murillo, D., Huergo, C., Gallego, B., & Tornín, J. (2023). Exploring the Use of Cold Atmospheric Plasma to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Biomedicines 2023, Vol. 11, Page 208, 11*(1), 208. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11010208
- Nguyen, Q., Oh, C., Jung, S.-N., Piao, Y., Lim, M. A., Kim, Y. Il, Jin, Y., Kim, H. J., & Koo, B. S. (2023). Non-thermal plasma-activated medium induces ferroptotic cell death by intracellular ferrous iron overload in head and neck cancer. *Cancer Research*, 83(7_Supplement), 1388–1388. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2023-1388
- Ninomiya, K., Ishijima, T., Imamura, M., Yamahara, T., Enomoto, H., Takahashi, K., Tanaka, Y., Uesugi, Y., & Shimizu, N. (2013). Evaluation of extra- and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric-pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(42), 425401. https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/42/425401
- Nitsch, A., Sieb, K. F., Qarqash, S., Schoon, J., Ekkernkamp, A., Wassilew, G. I., Niethard, M., & Haralambiev, L. (2023). Selective Effects of Cold Atmospheric Plasma on Bone Sarcoma Cells and Human Osteoblasts. *Biomedicines 2023, Vol. 11, Page 601, 11*(2), 601. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11020601
- Park, J., & Look, K. A. (2019). Health Care Expenditure Burden of Cancer Care in the United States. *Inquiry: A Journal of Medical Care Organization, Provision and Financing*, 56, 1–9. https://doi.org/10.1177/0046958019880696

- Patange, A., Boehm, D., Giltrap, M., Lu, P., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2018).
 Assessment of the disinfection capacity and eco-toxicological impact of atmospheric cold plasma for treatment of food industry effluents. *Science of the Total Environment*, 631–632, 298–307. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.269
- Stache, A. B., Mihăilă, I., Gerber, I. C., Dragoş, L. M., Mihai, C. T., Ivanov, I. C., Topală, I., & Gorgan, D.-L. (2023). Optimization of Indirect CAP Exposure as an Effective Osteosarcoma Cells Treatment with Cytotoxic Effects. *Applied Sciences* 2023, Vol. 13, Page 7803, 13(13), 7803. https://doi.org/10.3390/APP13137803
- Stoffels, E., Sakiyama, Y., & Graves, D. B. (2008). Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36(4), 1441–1457. https://doi.org/10.1109/TPS.2008.2001084
- Thiyagarajan, M., Anderson, H., & Gonzales, X. F. (2014). Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 565–574. https://doi.org/10.1002/bit.25114
- von Woedtke, Th., Reuter, S., Masur, K., & Weltmann, K.-D. (2013). Plasmas for medicine. *Physics Reports*, 530(4), 291–320. https://doi.org/10.1016/j.physrep.2013.05.005
- Weltmann, K.-D., & von Woedtke, T. (2017). Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 59(1), 014031. https://doi.org/10.1088/0741-3335/59/1/014031
- Xu, S., Wang, Y., Que, Y., Ma, C., Cai, S., Wang, H., Yang, X., Yang, C., Cheng, C., Zhao, G., & Hu, Y. (2020). Cold atmospheric plasma–activated Ringer's solution inhibits the proliferation of osteosarcoma cells through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncology Reports*, 43(5), 1683–1691. https://doi.org/10.3892/OR.2020.7518/HTML
- Yan, D., Malyavko, A., Wang, Q., Ostrikov, K., Sherman, J. H., & Keidar, M. (2021). Multi-Modal Biological Destruction by Cold Atmospheric Plasma: Capability

andMechanism.Biomedicines,9(9).https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9091259

- Yan, D., Sherman, J. H., & Keidar, M. (2017). Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, 8(9), 15977–15995. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13304
- Yan, D., Wang, Q., Malyavko, A., Zolotukhin, D. B., Adhikari, M., Sherman, J. H., & Keidar, M. (2020). The anti-glioblastoma effect of cold atmospheric plasma treatment: physical pathway v.s. chemical pathway. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68585-z
- Yang, X., Chen, G., Yu, K. N., Yang, M., Peng, S., Ma, J., Qin, F., Cao, W., Cui, S., Nie, L., & Han, W. (2020). Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells. *Cell Death & Disease 2020 11:4*, *11*(4), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2459-3
- Yoshikawa, N., Liu, W., Nakamura, K., Yoshida, K., Ikeda, Y., Tanaka, H., Mizuno, M., Toyokuni, S., Hori, M., Kikkawa, F., & Kajiyama, H. (2020). Plasmaactivated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58667-3