



# Plazma Tıp için Plazmayla Aktive Edilmiş Su Plasma Activated Water for Plasma Medicine

Sevde Nur KUTLU, Fazilet CANATAN

Biyomedikal Mühendisliği

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Isparta, Türkiye

sevdenur\_kutlu@hotmail.com, fzlt.cntn93@gmail.com

Ali GÜLEÇ

Biyomedikal Mühendisliği

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Isparta, Türkiye

agulecsdu@gmail.com

**Özetçe—** Atmosferik basınç plazma (ABP), biyomedikal uygulamalar içerisinde giderek artan bir alan olarak ilgiyle takip edilmektedir. Plazma, termal hasara sebebiyet vermeden DNA tahribi yapması, hücre çoğalmasını uyarması ve hücre döngüsünün bazı aşamalarını etkilemesi sebebiyle dikkat çekmektedir. ABP nin hücre ya da dokuya direkt uygulaması olabildiği gibi plazmayla aktifleştirilmiş bir ortamın istenilen bölgeye gönderilebilmesi üzerinde de durulmaktadır. İzotonik serum ve saf su gibi sıvıların plazma ile aktive edilerek kanser ve yara tedavisi başta olmak üzere tıbbi uygulamalar için kullanılabilirliği plazmanın bu sıvılarda gerçekleştirdiği değişikliklerin anlaşılmasıyla mümkündür. Argon ve helyum gazları atmosferik basınçta ayrı ayrı kullanılarak elde edilen ABP-jetleri, izotonik serum ve distile suya muamele edilerek izotonik serum ve distile su için pH, ORP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sonuçları karşılaştırılmıştır. Helyum ve argon plazma jetlerinin üretebildiği reaktif türler bakımından karşılaştırılması optik salınım spektroskopisi yöntemiyle yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler —** Atmosferik Basınç Plazma, Plazma Aktive Edilmiş Su, İzotonik serum, ORP, pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Abstract—** Atmospheric pressure plasma (ABP) is being followed with interest as an increasing area within biomedical applications. Plasma is attracting attention because it causes DNA damage without causing thermal damage, stimulates cell proliferation and affects some stages of cell cycle. As well as direct application of ABPs to cells or tissues delivery of plasma activated medium to the desired site are also discussed. Activation of liquids such as isotonic serum and distilled water by plasma can be used primarily for medical applications including cancer and wound healing, by understanding the changes that the plasma makes in these fluids. The results of pH, ORP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for isotonic serum and distilled water were compared by treating ABP-jets isotonic serum and distilled water using argon and helium gases separately. Helium and argon plasma jet were compared by means of optical emission spectroscopy for reactive species.

**Keywords —** Atmospheric Pressure Plasma, Plasma Activated Water, Isotonic serum, ORP, pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

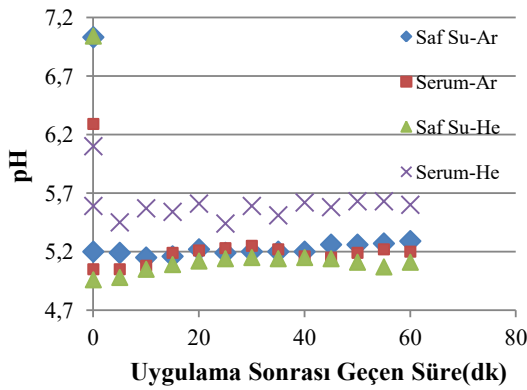
## I. GİRİŞ

Plazma; nötral atom/moleküller, uyarılmış atom/moleküller, iyonlaşmış atom/moleküller, elektronlar, fotonlar, radikal atom/moleküller gibi farklı türde parçacıkların bir arada bulunduğu maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden farklı bir halidir. Elektronları çok yüksek enerjiye sahipken diğer parçacıkları oda sıcaklığı kadar düşük sıcaklıklarda kalan plazmalar ise “Termal Dengeye olmayan Plazmalar (Soğuk Plazmalar)” olarak adlandırılır[1]. Bu tip plazmalar, plazma jet [2], plazma kalem [3], yalıtkan engel deşarjı (DBD) [4], mikrodalga plazma [5] vb. birçok şekilde üretilmektedir. Kanserli hücrelerin öldürülmesi, yara iyileştirilmesi ve patojen mikro organizmaların sterilizasyonu gibi alanlarda doğrudan ve dolaylı olmak üzere birçok uygulaması vardır. Dolaylı uygulamada ABP'nin sıvılarınla etkileşimi, plazma tedavisine dikkat çeken önemli bir konudur. ABP'de oluşan, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, ultraviyole fotonları ve elektrik akımı biyolojik etkiyi gösteren bileşenlerdir[6]. Suyun plazma ile aktive edilmesi sonucu mikroorganizmalar üzerinde biyolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir[7]. Sulu çözeltilerin atmosferik plazmalara maruz kalması, biyolojik olarak aktif olan ve anti-mikrobiyal ve sitotoksik aktivite gösteren hidrojen peroksit gibi nispeten uzun ömürlü ikincil ürünlerin üretilmesi ile sonuçlanır. Anti-mikrobiyal ve / veya sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunan, plazma ile aktive edilmiş su (PAW), plazma ile aktive edilmiş fosfat tamponlu salin (PAPBS) veya plazma ile aktive edilmiş ortam (PAM) gibi plazma ile muamele edilmiş çözeltilerin biyolojik aktivitesi hakkında çalışmalar yapılmıştır[8,9,10]. Plazma aktivasyonu ile hidrojen peroksit, nitratlar ve nitriller gibi nispeten uzun ömürlü ikincil ürünlerin üretilir bu da peroksinitroz asit gibi başka bakterisidal bileşikler oluşturmak üzere reaksiyona girebilir[8,11]. Plazma ile aktive edilen ortamın (PAM) kanser hücrelerini öldürmede ABP'nin doğrudan tedavisi kadar etkili olduğu gösterilmiştir[3,12]. Birçok araştırmacı PAM'ı başarılı bir şekilde kullanmış ve yumurtalık kanseri, mide kanseri, glioblastoma ve meme kanseri gibi çeşitli kanserlere karşı öldürücü ve anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, PAM'ın kullanılması, PAM'nin nispeten uzun bir saklama



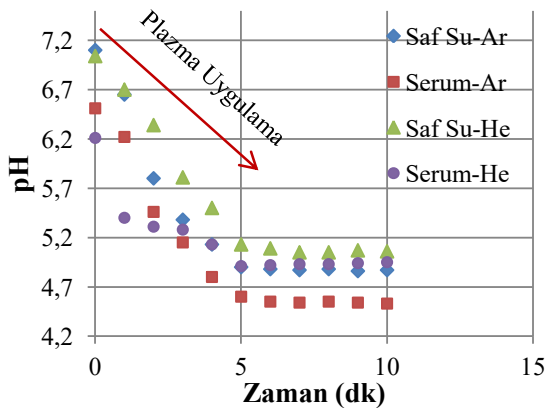
Argon plazmada Argon pikleri daha şiddetli ve OH piki helyum plazmaya göre daha güçlüdür. Buna karşılık helyum plazmada azot molekülüne ait  $N_2$  pikleri görülmektedir.

İzotonik seruma yapılan plazma uygulamalarının deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında 5 dakika plazma muamelesinin ardından gerçekleşen pH düşüşü argon plazma uygulamasında daha fazla olmuştur. 1 saate kadar 5'er dakika arayla alınan ölçümlerde serumun pH seviyesinin plazma uygulamasıyla ulaşılan değerlerinde kaldığı görülmüştür (Şekil 4). (Grafiklerde distile su, saf su olarak gösterilmiştir).



Şekil 4: Ar ve He plazmayla 5 dk aktive edilen distile su ve izotonik serumun pH düşüşü ve pH değerlerinin zamana bağlı değişimi

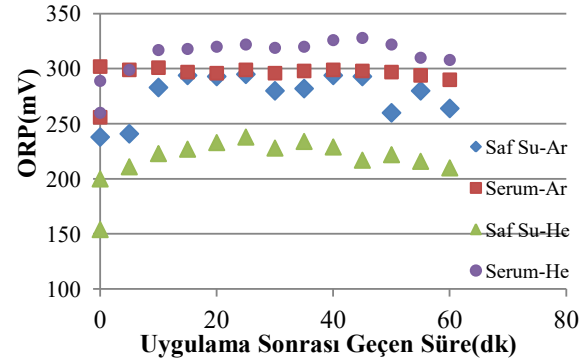
Distile suya argon ve helyum plazmanın ayrı ayrı 5'er dakika sürekli uygulama yerine 1'er dakika uygulanarak pH ölçümleri gerçekleştirildiğinde Şekil 5'deki sonuçlar elde edilmiştir. Argon plazma distile su için de daha hızlı pH düşüşü sağlamıştır. 5 dakika sonrasında her iki örneğinde de pH değerlerini bir süre daha korudukları ölçülmüştür.



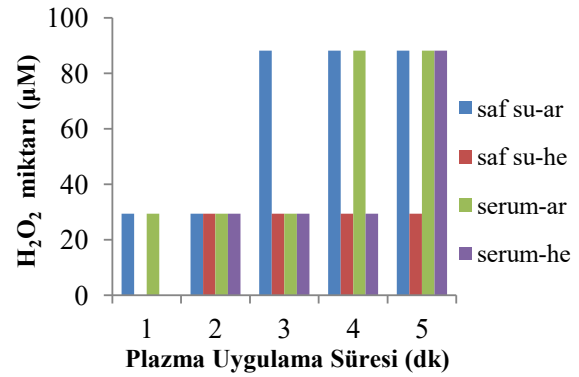
Şekil 5: Ar ve He plazmayla 5 dk aktive edilen distile su ve izotonik serumun pH düşüşü ve pH değerlerinin zamana bağlı değişimi

Ar plazmanın distile su ve serumdaki ORP bulguları Şekil 6'da gösterilmiştir. Argon plazmanın hem serum hem de distile su için kontrol grubundaki başlangıç ORP'yi arttırdığı gözlenmiştir. 60 dakikalık zaman boyunca ORP değerleri her iki sıvı için korunmuştur.  $H_2O_2$  miktarı tayininde He için

29,4  $\mu M$  (=1mg/L), Ar için 88,2  $\mu M$  (=3mg/L) olduğu tespit edilmiştir. Plazma uygulama süresine göre  $H_2O_2$  miktarı değişikliği Şekil 7'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 6: Ar ve He plazmayla aktive edilen distile su ve izotonik serumun ORP değerlerinin zamana bağlı değişimi



Şekil 7: Distile su ve izotonik serumda plazma etkisiyle zamana bağlı  $H_2O_2$  oluşumu

#### IV. SONUÇ

Bu çalışmada izotonik serum ve distile su gibi fizyolojik sıvıların plazma ile aktive edilmesi sonucunda meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir. Deşarjların optik salınım spektrumları incelendiğinde He plazmanın OH reaktifi bakımından fakir  $N_2^+$  türleri bakımından zengin olduğu görülür. Bu durum He ile aktive edilmiş suyun  $H_2O_2$  bakımından fakir olduğu ama asiditeye sebep olacak kadar reaktif azot türleri bakımından zengin olabileceğini gösterir. Argon plazmanın asidik etki oluşturmada helyum plazmaya göre daha etkili olduğu görülmüştür. Deneyler, plazmanın ortamda  $H^+$  ve  $OH^-$  iyonlarını var etmesiyle, reaksiyonların devamında ortamda oluşan  $H_2O_2$  ve  $O^{2-}$  gibi peroksitlerin vb. varlığı sonucu oluşan plazma asidik ortamını (PAO) göstermiştir. Bu durum plazma ile muamele edilen suyun oksidatif özelliklerini anlatır. Shainsky vd. DBD hava plazması ile yaptıkları çalışmada PAO'nun özelliklerini kabul edilebilir bir süre için koruduğunu bildirmiştir [4]. Ikawa vd plazma jet ile yaptıkları benzer bir çalışmada PAO'nun özelliklerini bildirmiştir [18]. Plazmanın oluştuğu gaz çeşidine bağlı olarak



PAO'nun en az bir gün boyunca stabil kaldığı ancak etkinin zamanla değiştiği gözlemlendi. Plazma uygulaması sonrası 2.güne kadar aldığımız ölçüm değerlerinde distile su ve izotonik serumdaki pH değerlerinin 1.gün sonunda, plazma uygulaması olmadan önceki başlangıç değerlerine yaklaştığı ancak plazma uygulaması sonrası ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi uzun ömürlü türlerin varlığının 30 güne kadar ortamda var olmaya devam ettiği belirlendi. 2.gün sonunda pH ve ORP'nin başlangıçtaki değerlerine ulaştığı tespit edildi. Değerlendirme süreci sonucunda PAO'nun patojenleri öldürme etkisinin en fazla 48 saate kadar etkili olacağı anlamına gelebilir. Elde edilen plazmalar distile suyun pH değerini, izotonik serumu göre daha fazla düşürmüştür. İzotonik serumdaki pH değerinin distile suya göre daha az düşüş göstermesi izotonik serumun kanser hücrelerine daha az etki edeceği anlamına gelmez. Nitekim PAO'nun etki etme mekanizmasında etkili olacak tek faktör olarak asidite demek yeterli değildir ancak bu durumun nedeni tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu durumun nedeni olarak izotonik serumun içeriğindeki tuzun plazma ile reaksiyonları sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Kaynak, maden, musluk suyu gibi sıvıların ORP değerinin 150-300 mV civarında olduğu [19] düşünüldüğünde çalışmamızda düşük asidik oksidan su potansiyeli olan 395 mV değerine ulaşıldı. Bu değer, hücre içi reaksiyonlarda DNA hasarını başlatmak için yeterli olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak biyolojik sıvıların plazma ile muamele ettiğimizde gözlemlediğimiz sonuçlar, ORP'nin artması (bozucu etki), pH'ın düşmesi, ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oluşması ve bu aktif ortamın etkisini tedavi için kabul edilebilir bir süre için muhafaza etmesi şeklindedir. Bu doğrultuda, plazmayı biyolojik örneğe taşıyacak bir ortamı yani plazma ile aktive edilmiş bir ortamı (PAW, PAM gibi) elde etmiş olduk. Distile su, serum gibi fizyolojik sıvılar kullanılarak, aynı PAW ve PAM gibi dolaylı uygulamalarda kullanılacak bir taşıyıcı ortam elde edilip kanser ve tümör tedavisinde alternatif bir yol oluşturabilir.

#### TEŞEKKÜR

117S474 numaralı projeye araştırma ve bursiyer desteği veren TÜBİTAK'a ve 5054-YL2-17 numaralı yüksek lisans projesine destek olan SDÜ BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

- [1] Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P., "Atmospheric pressure plasmas: A review", *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(1), 2-30, 2006.
- [2] Kitano, K., & Hamaguchi, S., "Low-temperature non-thermal micro plasma jets for chemical reactions in liquids", In 18th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC), Kyoto University, Japan, 2007.
- [3] Mohades, S., Barezzi, N., Laroussi, M., "Killing adherent and nonadherent cancer cells with the plasma pencil", *Plasma Process. Polym.*, 11, 1150, 2014.
- [4] Shainsky, N., Dobrynin, D., Ercan, U., Joshi, S. G., Ji, H., Brooks, A., Friedman, G., Cho, Y., Fridman, A., Friedman, G., "Plasma Acid: Water Treated by Dielectric Barrier Discharge", *Plasma Processes and Polymers*, Volume9, Issue6, 2012.
- [5] Gulec, A., Bozduman, F., & Hala, A. M., "Atmospheric pressure 2.45-GHz microwave helium plasma", *IEEE Transactions on Plasma Science*, 43(3), 786-790, 2015.
- [6] Graves, D. B., "The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(26), 263001, 2012.
- [7] Bruggeman, P., Leys, C., "Non-thermal plasmas in and in contact with liquids", *J. Phys. D, Appl. Phys.*, vol. 42, no.5, pp.053001-053029, 2009.
- [8] Naïtali, M., Kamgang-Youbi, G., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Brisset, J.-L., "Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water", *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7662-7664, 2010.
- [9] Kamgang-Youbi, G., Herry, JM., Meylheuc, T., Brisset, JL., Bellon-Fontaine, MN., Doubla, A., Naïtali, M., "Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges", *Let. Appl. Microbiol.* 48, 13-18, 2009.
- [10] Adachi, T., Tanaka, H., Nonomura, S., Hara, H., Kondo, S., Hori, "Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial nuclear network", *Free Radic. Biol. Med.* 79c, 28-44, 2014.
- [11] Traylor, M. J., Pavlovich, M. J., Karim, S., Hait, P., Sakiyama, Y., Clark, D. S., Graves, D. B., "Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44, 472001, 2011.
- [12] Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Takeda, K., Nakamura, K., Utsumi, F., Kajiyama, H., Kano, H., Okazaki, Y., Toyokuni, S., Maruyama, S., Kikkawa, F., Hori, M., "Cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma with ultra-high electron density", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 42, 3760, 2014.
- [13] Sato, T., Yokoyama, M., Johkura, K., "A key inactivation factor of HeLa cell viability by a plasma flow", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44, 372001, 2011.
- [14] Utsumi, F., Kjiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Kondo, H., Kano, H., Hori, M., Kikkawa, F., "Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo", *PLoS One* 8, e81576, 2013.
- [15] Shen, J., Tian, Y., Li, Y., Ma, R., Zhang, Q., Zhang, J., Fang, J., "Bactericidal Effects against S.aureus and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures", *Scientific Reports*, 6:28505, 2016.
- [16] Ninomiya K., Ishijima T., Imamura M., Yamahara T., Enomoto H., Takahashi K., Tanaka Y., Uesugi Y. and Shimizu N., "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, 2013.
- [17] Xu, G-M., Shi, X-M., Cai, J-F., Chen, S-L., Li, P., Yao, C-W., Chang, Z-S, Zhang, G-J., "Dual Effects of Atmospheric Pressure Jet on Skin Wound Healing of Mice. Wound Repair and Regeneration", *Wound Healing Society* 23, 878-884p, 2015.
- [18] Ikawa, S., Kitano, K., & Hamaguchi, S., "Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application", *Plasma Processes and Polymers*, 7(1), 33-42, 2010.
- [19] AlkaVital, 2014, Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli, Erişim Tarihi, 16.08.2018. <http://www.alkavital.com/orp.html>