



Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*

Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej

**Dominik Terefinko**

Podpis: .....

**Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy  
atmosferycznej**

**Biological activity of Cold Atmospheric Pressure Plasma**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki  
chemiczne reprezentowaną Katedrze Chemii Analitycznej

**Promotor: dr hab. inż. Piotr Jamróz, prof. PWr**

Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii  
Chemicznej

**Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Klimczak**

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii  
Nauk, Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet  
Wrocławski



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU

*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*

**Układy reakcyjno-wyładowczy generujące zimne plazmy atmosferyczne opracowano i scharakteryzowano przy wsparciu finansowym dwóch podmiotów w ramach projektu BioTechNan:**

## BADANIA CHEMICZNE

**Politechnika Wrocławska**

Katedra Chemii Analitycznej  
i Metalurgii Chemicznej

*dr hab. inż. Piotr Jamróz*



Politechnika  
Wrocławska

## BADANIA BIOLOGICZNE

**Instytut Immunologii i  
Terapii Doświadczalnej**

**PAN we Wrocławiu**

Samodzielne Laboratorium  
Biologii Komórek  
Macierzystych i  
Nowotworowych

prof. dr hab. Aleksandra  
Klimczak



## BIOTECHNAN

**Program**  
Interdyscyplinarnych  
Środowiskowych Studiów  
Doktoranckich KNOW z  
obszaru Biotechnologii i  
Nanotechnologii



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet  
Wrocłowski



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU



**„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”**

*Składam najserdeczniejsze podziękowania mojemu promotorowi dr hab. inż. Piotrowi Jamrozowi za przekazaną wiedzę i umiejętności, cierpliwość oraz wyrozumiałość w czasie realizacji prac nad przygotowaniem rozprawy. Jestem również niezwykle wdzięczny za uzyskaną możliwość samorozwoju, swobodę pracy i otrzymane zaufanie.*

*Pragnę również podziękować promotor Pani Prof. Dr hab. Aleksandrze Klimczak za całość wsparcia, jakie otrzymałem i możliwość realizacji badań w IITD PAN. Doceniam uzyskaną szansę i wsparcie przy przygotowaniu rozprawy.*

*Najszczerze podziękowania składam opiekun naukowej dr hab. inż. Annie Dzimitrowicz. Dziękuję za ogrom wiedzy i zaangażowania, które otrzymałem przez okres studiów. Anno, byłaś przewodnikiem, nieocenionym wsparciem, bez którego zapewne nie dotrwałbym końca.*

*Chciałbym również podziękować drugiej opiekun naukowej dr inż. Aleksandrze Bielawskiej-Pohl za otrzymaną wiedzę, opiekę merytoryczną oraz przekazanie umiejętności pracy z materią biologiczną.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim Pracownikom Katedry Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej Politechniki Wrocławskiej, a także Pracownikom Samodzielnego Laboratorium Komórek Macierzystych i Nowotworowych IITD PAN, którzy okazali mi pomoc, wsparcie i dobre słowo.*

*Szczególne i wyjątkowe podziękowania składam na dłonie Pauliny Wołoszyn, za całość wsparcia, motywacji i wiary towarzyszącej mi, na co dzień.*

*Dziękuję także Bliskim za okazane wsparcie w tej jakże długiej podróży.*





## Spis treści:

Lista Rycin .....	4
Lista Tabel .....	8
<b>1.</b> Streszczenie .....	10
<b>2.</b> Summary.....	12
<b>3.</b> Wykaz skrótów .....	14
<b>4.</b> Wstęp.....	22
<b>4.1.</b> Układy zimnych plazm do zastosowań biologicznych .....	22
<b>4.2.</b> Przestrzenna dystrybucja reaktywnych form tlenu i azotu dla zastosowań biologicznych .....	32
<b>4.3.</b> Dawka promieniowania zimną plazmą a uzyskiwana odpowiedź biologiczna .....	40
<b>4.4.</b> Pośrednie traktowanie komórek nowotworowych zimnymi plazmami atmosferycznymi .....	42
<b>4.5.</b> Bezpośrednie traktowanie komórek nowotworowych zimnymi plazmami atmosferycznymi .....	48
<b>4.6.</b> Podejście łączące bezpośrednie i pośrednie traktowanie komórek nowotworowych źródłami zimnych plazm atmosferycznych .....	60
<b>4.7.</b> Aktywność biologiczna zimnych plazm atmosferycznych w zmniejszaniu zjawiska wielolekowej oporności patogenów bakteryjnych .....	62
<b>5.</b> Cel i zakres prowadzonych prac .....	67
<b>Zadanie I.</b> Pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi .....	68
<b>6.</b> Materiały i metodyka badawcza dla realizacji <b>zadania I</b> .....	70
<b>6.1.</b> Hodowle komórkowe .....	70
<b>6.2.</b> Pożywki hodowlane .....	71
<b>6.3.</b> Aktywacja pożywki hodowlanej .....	72
<b>6.4.</b> Badanie aktywności metabolicznej komórek – test MTT .....	73
<b>6.5.</b> Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania .....	74
<b>6.6.</b> Badanie apoptozy komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny .....	75
<b>6.7.</b> Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie gazowej – pomiary OES .....	76
<b>6.8.</b> Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne .....	77
<b>6.9.</b> Badanie przestrzennej dystrybucji reaktywnych form tlenu – pomiary jodku potasu ze skrobią .....	78
<b>7.</b> Wyniki i dyskusja dla pośredniego zastosowania układu zimnej plazmy .....	79
<b>7.1.</b> Aktywacja pożywki hodowlanej .....	79
<b>7.2.</b> Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na aktywność metaboliczną komórek – test MTT .....	81
<b>7.3.</b> Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na zdolności migracji komórek – test zarysowania .....	88
<b>7.4.</b> Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na apoptozę komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny .....	91
<b>7.5.</b> Oznaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie gazowej – pomiary OES .....	97
<b>7.6.</b> Oznaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne .....	98
<b>8.</b> Podsumowanie i wnioski po realizacji <b>zadania I</b> .....	103
<b>Zadanie II.</b> Bezpośrednie i mieszane zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi .....	105
<b>9.</b> Cel i zakres prowadzonych prac – bezpośrednie i pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej.....	106
<b>10.</b> Materiały i metodyka badawcza dla realizacji <b>zadania II</b> .....	106
<b>10.1.</b> Hodowle komórkowe .....	106
<b>10.2.</b> Pożywki hodowlane .....	107
<b>10.3.</b> Aktywacja pożywki hodowlanej .....	107

10.4.	Bezpośrednie napromieniowanie komórek raka piersi .....	108
10.5.	Badanie aktywności metabolicznej komórek – test MTT .....	109
10.6.	Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania .....	109
10.7.	Badanie apoptozy komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny .....	110
11.	Wyniki i dyskusja dla bezpośredniego i mieszanego zastosowania układu zimnej plazmy .....	111
11.1.	Bezpośrednie i mieszane traktowanie komórek raka piersi zimną plazmą .....	111
11.2.	Wpływ bezpośredniego i mieszanego traktowania zimną plazmą na żywotność komórkową .....	112
11.3.	Wpływ bezpośredniego i mieszanego traktowania zimną plazmą na zdolności migracji komórek nowotworowych.....	118
11.4.	Śmierć komórkowa inicjowana bezpośrednim i mieszanym działaniem zimnej plazmy .....	122
12.	Podsumowanie i wnioski po realizacji <b>zadania II</b> .....	126
<b>Zadanie III.</b> Bezpośrednie zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków .....		
13.	Materiały i metodyka badawcza dla realizacji <b>zadania III</b> .....	129
13.1.	Antybiotyki .....	129
13.2.	Układy wyładowcze zimnych plazm – pióro plazmowe i szczotka plazmowa .....	129
13.3.	Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra plazmowego .....	130
13.4.	Badania efektywności degradacji antybiotyków – analiza HPLC -DAD.....	137
13.5.	Badania efektywności degradacji antybiotyków – analiza UPLC -MS .....	137
13.6.	Badania stopnia mineralizacji antybiotyków – analiza TOC/TN.....	138
13.7.	Badanie aktywności biobójczej roztworów antybiotyków potraktowanych zimną plazmą – testy dyfuzyjno-krażkowe.....	139
13.8.	Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej .....	141
13.9.	Badania przestrzennej dystrybucji reaktywnych form tlenu .....	143
14.	Wyniki i dyskusja dla bezpośredniego zastosowania układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków .....	144
14.1.	Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra .....	144
14.2.	Efektywność degradacji antybiotyków – analiza HPLC-DAD i UPLC-MS.....	146
14.3.	Stopień mineralizacji antybiotyków – analiza TOC/TN .....	148
14.4.	Aktywność biobójcza roztworów antybiotyków potraktowanych zimną plazmą – testy dyfuzyjno-krażkowe .....	151
14.5.	Reaktywne formy tlenu i azotu w fazie ciekłej .....	154
14.6.	Przestrzenna dystrybucja reaktywnych form tlenu wraz z ich oznaczeniem .....	158
15.	Podsumowanie i wnioski po realizacji <b>zadania III</b> .....	165
16.	Perspektywy stworzenia klinicznej terapii opartej o zimne plazmy atmosferyczne względem nowotworu .....	167
17.	Podsumowanie i wnioski końcowe .....	172
18.	Plany na przyszłość .....	176
19.	Bibliografia.....	178
20.	Życiorys naukowy .....	191

## Lista Rycin

- Rycina 1.** Reprezentacyjny schemat układów reakcyjno-wyładowczych, oparty na wyładowaniach barierowych DBD, dedykowane do zastosowań biologicznych i biomedycznych. A) Konstrukcja objętościowa generacji wyładowań. B) Plazmowy dżet wytwarzany w wyniku wyładowań barierowych, generujący stożek plazmy rozchodzącą się do otoczenia. .... 24
- Rycina 2.** Układ reakcyjno-wyładowczy, generujący plazmowy dżet pod ciśnieniem atmosferycznym do zastosowań biologicznych i biomedycznych. . .... 25
- Rycina 3.** Wpływ czasu traktowania zimną plazmą i prędkości przepływu gazu (Hel z tlenem) wyładowczego na dystrybucję przestrzenną RFT na modelach żelowych KI-skrobii. Grafika wykorzystana z publikacji (Liu i wsp., 2018). .... 34
- Rycina 4.** Chronologiczne przedstawienie etapów realizacji poszczególnych celów badawczych mających na celu przeprowadzenie pośredniego zastosowania układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi. Etapy 1-3; 10-12 zostały zrealizowane w Politechnice Wrocławskiej, Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej, etapy 4-6; 7-9 zostały zrealizowane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych. . .... 70
- Rycina 5.** Autorski układ reakcyjno-wyładowczy, generujący zimną plazmę atmosferyczną wykorzystany do aktywowania pożywki hodowlanej DMEM lub Opti-MEM. Główne elementy pióra plazmowego zostały przedstawione i wyszczególnione ..... 73
- Rycina 6.** Graficzna prezentacja przestrzennej dystrybucji Reaktywnych Form Tlenu (RFT) generowanych wskutek oddziaływania źródła zimnej plazmy na powierzchni modeli żelowych Jodku potasu ze skrobią. Modele żelowe zostały poddane napromieniowaniu w czasie 180 s, zachowując odległość od pióra plazmowego 30, 25 i 20 mm, a także utrzymując odległość 25 mm, czas ekspozycji został dobrany na 60 i 120 s..... 81
- Rycina 7.** Pomiary żywotności komórek ludzkiej linii nowotworowej o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiej linii nowotworowej o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7, a także nienowotworowej ludzkiej linii MCF-10A za pomocą testu MTT, poddanych inkubacji w okresie od 0 do 2 dni w pożywkach hodowlanych aktywowanych zimną plazmą (czas ekspozycji 150, 180, 210 i 240 s). Grafy a, c, e uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> (Grupa I) lub 1,5 cm<sup>3</sup> (Grupa II) pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą. Grafy b, d, f uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231 i MCF-7 inkubowane w 3,0 cm<sup>3</sup> (Grupa V) lub 1,5 cm<sup>3</sup> (Grupa VI) pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą. W obydwu przypadkach, FBS był wprowadzany do analizowanej pożywki przed traktowaniem zimną plazmą. Jako kontrolę, komórki nietraktowane przez pożywki aktywowane zimną plazmą zostały wykorzystane (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II- nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,01; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0004). .... 83
- Rycina 8.** Porównanie wpływu dodatku FBS do pożywek po procesie aktywacji zimną plazmą na zdolność do proliferacji ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiego nowotworu piersi o niewielkiej zdolności przerzutowania MCF-7, ludzkiej nienowotworowej linii MCF-10A. Wspomniane linie komórkowe były inkubowane w pożywce aktywowanej plazmą w czasie 150, 180, 210 i 240 s. Grafy a, c, g uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0

cm<sup>3</sup> pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa I) lub bez dodatku FBS (Grupa III). Grafy a, d, h uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231 i MCF-7 inkubowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa II) lub bez dodatku FBS (Grupa IV). Grafy b, e, i uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa V) lub bez dodatku FBS (Grupa VII). Grafy b, f, j uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa VI) lub bez dodatku FBS (Grupa VIII). W obydwu przypadkach, FBS był wprowadzany do analizowanej pożywki przed traktowaniem zimną plazmą. Jako kontrolę, komórki nietraktowane przez pożywki aktywowane zimną plazmą zostały wykorzystane (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II- nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,013; \*\* p < 0,0014; \*\*\* p < 0,0002; \*\*\*\* p < 0,0001) . . . . . 86

**Rycina 9.** Wyniki testu zarysowania wykorzystanego do oceny zdolności migracji ludzkiej linii komórek nienowotworowych MCF-10A (Graf a), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Graf b) i ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 (Graf c). Wytworzona warstwa komórkowa pokrywająca powierzchnię dołka płytki testowej została zarysowana, a oderwane komórki wraz ze starą pożywką zostały zastąpione przez: 1,5 cm<sup>3</sup> pożywką DMEM aktywowaną zimną plazmą w czasie 180 i 210 s (Grupa IV) lub 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki Opti-MEM aktywowanej w czasie 180 i 210 s (Grupa VIII). Obszar względnego zamknięcia rany (RWC) został obliczony w oparciu o 30 godzinną obserwację szerzej opisany w podrozdziale 6.5. **Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania.** Wyznaczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe pochodzące od trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,016; \*\* p < 0,002; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001) . . . . . 90

**Rycina 10.** Wyniki przedstawiające procentowy udział populacji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii MCF-10A (Grafy a i b), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Grafy c i d), ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania (Grafy e i f). Linie komórkowe MCF-10A (Graf a), MDA-MB-231 (Graf c) i MCF-7 (Graf e) inkubowane przez 2 dni w pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 210 s (Grupa IV). W pożywce Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 210 s (Grupa VIII) inkubowane były linie komórkowe MCF-10A (Graf b), MDA-MB-231 (Graf d), MCF-7 (Graf f). Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,015; \*\* p < 0,0015; \*\*\* p < 0,0004; \*\*\*\* p < 0,0001, ns – nie statystycznie istotne). . . . . 92

**Rycina 11.** Widma emisji ze strefy kontaktu stożka zimnej plazmy z pożywką DMEM (linia czerwona) i Opti-MEM (linia niebieska) w obszarze 200 - 400 nm (a) i 400 – 900 nm (b) . . . . . 98

**Rycina 12.** Stężenia RFT i RFA wyznaczone w wyniku oddziaływania zimnej plazmy z poszczególnym rodzajem pożywki hodowlanej. Wyznaczono stężenia jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i NH<sub>4</sub><sup>+</sup> w pożywkach DMEM i Opti-MEM poddanych napromieniowaniu w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 180 s. Oznaczone zostały stężenie molekuł H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w poszczególnych pożywkach hodowlanych (napromieniowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 180 s), gdzie FBS był wprowadzany przed napromieniowaniem (DMEM kompletny, Opti-MEM kompletny, DPBS kompletny) bądź



FBS był wprowadzany po napromieniowaniu (DMEM + FBS, Opti-MEM + FBS, DPBS + FBS). Określone zostały również zmiany w wartościach pH pożywek DMEM i Opti-MEM poddanych ekspozycji zimnej plazmy. Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Tukeya post hoc (\*  $p < 0,026$ ; \*\*  $p < 0,009$ ; \*\*\*  $p < 0,006$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) ..... 100

**Rycina 13.** Schematyczne przedstawienie układu wyładowczego przygotowanego dla bezpośredniego napromieniowania zawiesiny komórkowej wybranych modeli biologicznych tj. komórek linii MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231. 1- przycięta probówka szklana do wysokości 35,0 mm, zawierająca  $1 \times 10^6$  komórek zawieszonych w objętości  $2,0 \text{ cm}^3$  PBS. 2- pióro plazmowe generujące zimną plazmę atmosferyczną w wyniku wyładowań barierowych, zachowując odległość od powierzchni zawiesiny komórkowej 6,44 mm. 3- przepływomierz gazu wyładowczego, umożliwiający ustalenie prędkości przepływu helu  $10,6 \text{ dm}^3/\text{min}$ . 4- transformator prądu elektrycznego wytworzonego z generatora wysokich napięć, dostarczający ładunek do pióra plazmowego. 5- generator wysokich napięć, o możliwości dostrajania wypełnienia i częstotliwości modulacji charakterystyki prądowo-napięciowej, wykorzystywanej do inicjacji wyładowań barierowych zimnej plazmy. Ustalono parametry wzbudzenia plazmy na wypełnienie 74,29 % i częstotliwości 2,14 kHz, wzbudzając zimną plazmę do zastosowań biomedycznych..... 111

**Rycina 14.** Pomiary żywotności komórek ludzkiej linii nienowotworowej MCF-10A, ludzkiej linii nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiej linii nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 z wykorzystaniem testu MTT, poddanych obserwacji w czasie 2, 4 i 7 dni. Wykresy a, c, e uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231 poddane bezpośredniej ekspozycji w czasie 30 s na zimną plazmę, inkubowane w pożywce DMEM nietraktowanej (Grupa I) lub pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą w objętości  $1,5 \text{ cm}^3$  i czasie 180 s (Grupa II). Wykresy b, d, f uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231 poddane bezpośredniej ekspozycji w czasie 30 s na zimną plazmę, inkubowane w pożywce Opti-MEM nietraktowanej (Grupa I) lub pożywce Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą w objętości  $1,5 \text{ cm}^3$  i czasie 180 s (Grupa II). Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednią ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\*  $p < 0,011$ ; \*\*  $p < 0,0011$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) ..... 115

**Rycina 15.** Wyniki testu zarysowania wykorzystanego do oceny zdolności migracji ludzkiej linii komórek nienowotworowych MCF-10A (Wykres a), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Wykres b) i ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 (Wykres c) poddanych bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy. Wytworzona warstwa komórkowa pokrywająca powierzchnię dołka płytki testowej została zarysowana, a oderwane komórki wraz ze starą pożywką zostały zastąpione przez  $1,5 \text{ cm}^3$  pożywki DMEM (Grupa II) lub Opti-MEM (Grupa IV) aktywowanej zimną plazmą w czasie 180 s. Obszar względnego zamknięcia rany (RWC) został obliczony w oparciu o 24 godzinną obserwację. Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednią ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyznaczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe pochodzące od trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\*  $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,002$ ; \*\*\*  $p < 0,0003$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) ..... 120

**Rycina 16.** Wyniki przedstawiające procentowy udział populacji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii MCF-10A (Wykresy a i b), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Wykresy c i d), ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania (Wykresy e i f). Linie komórkowe MCF-10A (Wykres a), MDA-MB-231 (Wykres c) i MCF-7 (Wykres e), poddane bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy w czasie 30 s, były inkubowane w pożywce DMEM nietraktowanej (Grupa I) lub aktywowanej zimną plazmą (Grupa II). Linie komórkowe MCF-10A (Wykres b), MDA-MB-231 (Wykres d) i MCF-7 (Wykres f), poddane bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy w czasie 30 s, były inkubowane w pożywce Opti-MEM nietraktowanej (Grupa III) lub aktywowanej zimną plazmą (Grupa IV). Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednią ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\*  $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,003$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) . . . . . 124

**Rycina 17.** Graficzne przedstawienie pióra plazmowego (wykres a) i szczotki plazmowej (wykres b). **Element 1** – przyłącze gazu He+N<sub>2</sub>, **element 2** – zawór przyłącza gazu, **element 3** – nasadka łącząca elektrodę z przyłączem gazu, **element 4** – łączenie elektrody mosiężnej, **element 5** – elektroda mosiężna, **element 6** – stożek zimnej plazmy, **element 7** – komora reakcyjna wraz odbiornikiem, **element 8** – przepływający roztwór antybiotyków, **element 9**- obejma z drutu miedzianego, **element 10**- obejma z drutu miedzianego. . . . . 130

**Rycina 18.** Wykres testu normalności a także krzywa punktowa dla standaryzowanych składników resztowych w zależności od kolejności obserwowanych poziomów dla pomiarów temperatury stożka plazmy ( $t_{pp}$ , °C, a), oraz długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm, graf b) . . . . . 135

**Rycina 19.** Wpływ rozpatrywanych zmiennych na temperaturę stożka plazmy w piórze plazmowych ( $t_{pp}$ , °C, a) a także długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A, dm<sup>3</sup>/min), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B, kHz), wypełnienie (parametr C, %). . . . . 136

**Rycina 20.** Wydajność rozkładu (%) antybiotyków z roztworów wodnych zawierających pojedynczy analit lub mieszaninę czterech analitów o stężeniu 35 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>35</sub>) lub 10 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>10</sub>) poddanych działaniu pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej. Wykorzystane oznaczenia OFX- ofloksacyna; DXC – doksycyklina; AMP – ampicylina; ChRP – chloroamfenikol. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (1\* < 0,01; 2\* < 0,001; 3\* < 0,0002; 4\* < 0,0001). . . . . 147

**Rycina 21.** Uzyskane chromatogramy ( przy długości fali 254 nm) z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD dla roztworów mieszanin M<sub>35</sub> i M<sub>10</sub> poddanych traktowaniu szczotką plazmową operowaną w warunkach optymalnych. Zielona krzywa prezentuje sygnały dla roztworów nietraktowanych, fioletowa krzywa odpowiada sygnałom antybiotyków OFX, DXC, ChRP poddanych traktowaniu szczotki plazmowej . . . . . 148

**Rycina 22.** Analiza stężenia TOC (a) i TN (b) w roztworach wodnych antybiotyków poddanych traktowaniu w warunkach optymalnych piórem plazmowym i szczotką plazmową w porównaniu z roztworami nietraktowanymi. Porównanie pomiędzy zmierzonymi wartościami przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z porównywaniem par badanych grup testem Tukeya post hoc (\*  $p < 0,03$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0006$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). OFX – ofloksacyna, DXC -doksycyklina, AMP – ampicylina, ChRP – chloroamfenikol, M<sub>35</sub> – mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 35 mg/dm<sup>3</sup>, M<sub>10</sub>- mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 10 mg/dm<sup>3</sup>. . . . . 150

**Rycina 23.** Procentowa redukcja właściwości antybakteryjnych (%) badanych roztworów wodnych antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy generowanej w warunkach optymalnych z użyciem pióra plazmowego lub szczotki plazmowej względem modeli bakteryjnych: a - *Escherichia coli* ATCC 25922; b - *Bacillus subtilis* ATCC 23857; c - *Serratia marcescens* ATCC 14756; d - *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Zaprezentowane wyniki ujęto jedynie dla roztworów wodnych antybiotyków, które wykazały właściwości biobójcze względem dobranych modeli bakteryjnych. Redukcja właściwości antybakteryjnych została określona poprzez pomiar średnicy obszaru zahamowania wzrostu bakteryjnego uzyskanego w wyniku przeprowadzonych testów dyfuzyjno-krążkowych, odnosząc wyniki do roztworów nietraktowanych. Przedstawiono wyniki jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy. Porównanie średnich wartości redukcji wywołanej przez traktowanie pióra plazmowego lub szczotki plazmowej przeprowadzono z pomocą testu studenta t lub testu t Welcha (przy  $p < 0,05$ ) zależnie od tego, czy wariancje były równe (określone zużyciem testu Levenesa) ..... 152

**Rycina 24.** Pomiary wartości pH (a) i konduktancji (b) zmierzone w roztworach wodnych antybiotyków poddanych degradacji zimną plazmą generowaną w warunkach optymalnych z użyciem pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej. Wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe zostały wyznaczone w oparciu o trzy niezależne pomiary. Analizę statystyczną porównania pomiędzy zmierzonymi wartościami przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z porównywaniem par badanych grup testem Tukeya post hoc (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). OFX – ofloksacyna, DXC -doksycyklina, AMP – ampicylina, ChRP – chloroamfenikol, M<sub>35</sub> – mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 35 mg/dm<sup>3</sup>, M<sub>10</sub>- mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 10 mg/dm<sup>3</sup>..... 156

**Rycina 25.** Analiza stężeń jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (a) i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (b) w roztworach wodnych antybiotyków traktowanych zimną plazmą operowaną w warunkach optymalnych z wykorzystaniem układów pióra plazmowego lub szczotki plazmowej. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\*  $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0006$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )..... 158

**Rycina 26.** Analiza stężeń nadtlenu wodoru (a) oraz całkowitej zawartości RFT (b) w roztworach antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy operowanej w warunkach optymalnych z użyciem układu pióra plazmowego lub szczotki plazmowej. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Wizualizacja przestrzennej dystrybucji RFT (c) generowanych w wyniku kontaktu źródła zimnej plazmy z powierzchnią modeli żelowych zawierających jodek potasu i skrobię. Czas traktowania modeli żelowych został ustalony na 5, 15, 30, 60 i 120 s. Porównania wartości średnich obszarów zabarwionych na kolor niebiesko-fioletowy wytworzonych z pomocą pióra plazmowego i szczotki plazmowej zostały podsumowane wykresem słupkowym i poddane analizie statystycznej poprzez porównanie wartości średnich sparowanych grup pomiędzy dwoma rozpatrywanymi układami, wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) . ..... 162

## Lista Tabel

**Tabela 1.** Układy reakcyjno-wyładowcze wraz z ich parametrami operacyjnymi, które zostały wykorzystane do traktowania komórek linii nowotworu piersi i skóry.. ..... 27

**Tabela 2.** Układy reakcyjno-wyładowcze wraz z ich parametrami operacyjnymi, które zostały wykorzystane do traktowania wodnych roztworów antybiotyków ..... 31

**Tabela 3.** Metody wykorzystywane do określania i oznaczania RFT i RFA w cieczach napromieniowanych zimną plazmą dla badań na komórkach nowotworowych, a także do ich oznaczania wewnątrz komórek nowotworowych poddanych ekspozycji na źródła zimnych plazm atmosferycznych..... 36

<b>Tabela 4.</b> Metody wykorzystywane do określania i oznaczania RFT i RFA w wodnych roztworach farmaceutyków napromieniowanych zimną plazmą dla badań degradacji antybiotyków i eliminacji wielolekowe oporności patogenów bakteryjnych. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Układy reakcyjno-wyładowcze wykorzystywane do bezpośredniego (B.) i pośredniego (P.) traktowania linii komórkowych nowotworu piersi. Podsumowane zostały testy biologiczne, które wykorzystano do zbadania wpływu biologicznego działania zimnych plazm. ....	53
<b>Tabela 6.</b> Usystematyzowanie grup badawczych pożywek hodowlanych poddanych aktywacji zimną plazmą. ....	72
<b>Tabela 7.</b> Graficzne podsumowanie uzyskanych wyników z testów żywotności komórkowej MTT (Rycina 7 i 8), testu zarysowania (Rycina 9), indukcji apoptozy (Rycina 10). ....	96
<b>Tabela 8.</b> Charakterystyka grup badawczych, zawiesina komórkowa poddana bezpośredniej ekspozycji zimnej plazmy a także inkubowane następnie w pożywce hodowlanej nietraktowanej bądź aktywowanej źródłem zimnej plazmy. ....	107
<b>Tabela 9.</b> Matryca metodologii powierzchni odpowiedzi z projektowaniem doświadczeń metody Box-Behnken przygotowana do wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operacyjnych pióra plazmowego, przeznaczonego do degradacji roztworów antybiotyków. Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C), podczas gdy odpowiedzią układu pióra plazmowego było: temperatura stożka plazmy ( $t_{pp}$ ) i długość stożka plazmy ( $d_{pp}$ ). ....	131
<b>Tabela 10.</b> Analiza ANOVA podsumowana w tabeli dla modelu regresji powierzchni odpowiedzi uzyskanej dla temperatury stożka plazmy ( $t_{pp}$ , °C). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C) ....	132
<b>Tabela 11.</b> Analiza ANOVA podsumowana w tabeli dla modelu regresji powierzchni odpowiedzi uzyskanej dla długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C) ....	133
<b>Tabela 12.</b> Modele bakteryjne wykorzystane do przeprowadzenia badań nad właściwościami antibakteryjnymi roztworów antybiotyków OFX, DOX, AMP, ChRP i ich mieszanin poddanych traktowaniu pióra plazmowego i szczotki plazmowej. ....	139

## 1. Streszczenie

Zimna plazma atmosferyczna (ang. *Cold Atmospheric Pressure Plasma*, CAPP) inicjowana jest w wyniku przyłożenia wysokiego napięcia do gazu wyładowczego, doprowadzając do jego jonizacji. Efektem jest ustalanie się stanu nierównowagi termodynamicznej, w którym temperatura wytworzonych elektronów osiąga wartości wielokrotnie wyższe w porównaniu z temperaturą zjonizowanych molekuł o wyższej masie, gdzie temperatura zimnej plazmy atmosferycznej osiąga najczęściej wartości poniżej 50 °C. Obok zjonizowanych cząstek gazu wyładowczego, zimna plazma stanowi źródło reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA) w fazie gazowej tj.  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2^+$ . Oddziaływanie zimnej plazmy z ośrodkami ciekłymi bądź stałymi, prowadzi do dalszego udziału tych reaktywnych form w reakcjach kaskadowych, wytwarzając formy o dłuższym czasie życia i wysokiej aktywności zarówno chemicznej jak i biologicznej.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej, nowatorskie układy zimnej plazmy atmosferycznej zostały wykorzystane w toku interdyscyplinarnych prac badawczych celem określenia aktywności biologicznej względem komórek linii ludzkiego raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231) i komórek nienowotworowych (MCF-10A) a także patogenów bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*). Układ wyładowczy tzw. pióro plazmowe, został wykorzystany do napromieniowania dwóch pożywek hodowlanych DMEM i Opti-MEM, które to następnie użyto do pośredniego traktowania wspomnianych modeli komórek raka piersi. Komórki poddano również bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy oraz traktowaniu mieszanemu, w którym komórki napromieniowane bezpośrednio poddano następnie działaniu pożywek hodowlanych napromieniowanych zimną plazmą. Analizując wpływ na żywotność, ruchliwość i indukcję apoptozy w komórkach raka piersi potraktowanych w sposób pośredni, bezpośredni i mieszany, wykonano badania biologiczne tj. test MTT, test zarysowania, barwienia komórkowego Aneksyną V i jodkiem propidyny. Wykorzystując metody optycznej spektroskopii emisyjnej (OES, ang. *Optical Emission Spectroscopy*) dokonano analizy RFT i RFA wytworzonych przez pióro plazmowe w fazie gazowej. Celem określenia zawartości reaktywnych form tlenu i azotu w pożywkach hodowlanych napromieniowanych zimną plazmą, wykorzystano metody kolorymetryczne dla określenia stężeń  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i całkowitej zawartości RFT. Zbadano ponadto, w jaki sposób dodatek surowicy i większej zawartości składników odżywczych w pożywce

hodowlanej wpływa na indukowaną odpowiedź biologiczną a także na wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej.

Nowatorski układ pióra plazmowego, wraz z zaproponowaną konstrukcją szczotki plazmowej generującej pięć stożków zimnej plazmy zostały poddane wieloczynnikowej optymalizacji parametrów prowadzenia procesu z użyciem metod statystycznych. Celem przeprowadzonej optymalizacji było znalezienie ustawień zapewniających największą efektywność rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych. Tak zoptymalizowane układy pióra plazmowego i szczotki plazmowej zostały wykorzystane do stworzenia systemów umożliwiających w trybie ciągłego przepływu potraktowania antybiotyków tj. Ofloksacyny (OFX), Doksycykliny (DXC), Ampicyliny (AMP), Chloroamfenikolu (ChRP) o stężeniu roztworów wodnych  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  a także mieszanin tych czterech antybiotyków o stężeniu każdego z analitu wynoszącego  $35 \text{ mg dm}^{-3}$  lub  $10 \text{ mg dm}^{-3}$ . Efektywność degradacji zaproponowanych dwóch układów zimnej plazmy została określona z wykorzystaniem technik badawczych tj. wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (ang. *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD), ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*, UPLC-MS). Zmiany w zawartości węgla organicznego (TOC) i azotu (TN) w roztworach wodnych antybiotyków poddanych działaniu zimnych plazm zostały określone z pomocą analizatora multi N/C 3100. Możliwości obniżenia zjawiska wielolekowej oporności bakteryjnej zbadano przeprowadzając testy dyfuzyjno-krażkowe, gdzie poprzez degradację farmaceutyków z roztworów wodnych uzyskano jednocześnie redukcję właściwości antybakteryjnych względem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*. Obserwowana aktywność biologiczna układów pióra plazmowego i szczotki plazmowej została powiązana z wytworzeniem RFT i RFA w roztworach wodnych antybiotyków. Roztwory post plazmowe zostały zbadane pod względem zmian wartości pH, przewodnictwa elektrycznego jak i technik kolorymetrycznych, określających stężenia jonów  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , oraz molekuł  $\text{H}_2\text{O}_2$  i całkowitej zawartości RFT.

## 2. Summary

The cold atmospheric pressure plasma (CAPP) is generated following the usage of high voltage to discharge gas, leading to their ionization. The achieved non-thermodynamic equilibrium state, where the temperature of generated electrons reached several times higher than that of ionized molecules with large mass, resulting in the temperature of cold plasma plume not exceeding 50 °C. Besides the ionized molecules of discharge gas, the cold plasma remains a rich source of several representatives of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the gas phase, such as  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2^+$ . The interaction between the cold plasma plume and liquids or solids leads to further participation of ROS and RNS in cascade reactions, forming reactive individuals with longer lifetime and significant chemical as well as biological activity.

In the presented PhD thesis, a novel CAPP system was utilized to conduct interdisciplinary research studies to assess the biological activity towards human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231) and non-cancerous cell line (MCF-10A) as well as pathogenic bacterial strains (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*). The CAPP system called plasma pencil was used for the activation of two cultural media- DMEM and Opti-MEM, and subsequently used for the indirect treatment of human breast cancer cell lines. The investigated *in vitro* models in the second case were directly exposed to CAPP plume, while in the third case, during mixed treatment, the cells were directly irradiated with plasma pencil and then incubated in plasma-activated culture media. In order to assess the impact of indirect, direct and mixed CAPP treatment of breast cancer cell lines on cell viability, motility and apoptosis induction, biological tests were performed in particular test MTT, scratch test and Annexin V and Propidium Iodide cell staining. To determine the presence of ROS and RNS in the gas phase of CAPP discharge, the Optical Emission Spectroscopy (OES) technique was used. The colourimetric-based methods were utilized to determine the concentration of  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in culture media after plasma pencil treatment. Moreover, the impact of admixture of fetal bovine serum and higher contribution of nutrients in culture media on the obtained biological activity of plasma activated media along with the generation of ROS and RNS was studied.

The novel system of plasma pencil, together with the proposed construction of plasma brush which generates five plasma plumes, were optimized with a multivariate optimization route based on statistical tools dedicated to an effective degradation of antibiotics from

water solutions. The main purpose of optimization studies was to obtain the operational discharge parameters with the highest efficacy of antibiotic degradation. The so-optimized systems of plasma pencil and plasma brush were used in a continuously-flowing manner for the irradiation of water solutions of Ofloxacin (OFX), Doxycycline (DXC), Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (ChRP) with the concentration of  $35 \text{ mg dm}^3$ , as well as the mixture of these four antibiotics with the content of each analyte equal 35 or  $10 \text{ mg dm}^3$ . The degradation efficacy of the proposed plasma pencil and plasma brush systems was assessed using High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection, HPLC-DAD and Ultra-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry, UPLC-MS. The changes in Total Organic Carbon (TOC) content and Total Nitrogen (TN) in pharmaceutical solutions after CAPP irradiation were measured with a multi N/C 3100 analyzer. The possibility of reducing the multiple drug resistance in pathogenic bacteria was examined with a standard disc-diffusion assay. Due to the degradation of antibiotics from water solutions subsequently, with the reduction of antibacterial activity towards *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, and *Enterobacter cloacae* were observed after treatment with plasma pencil and plasma brush. The observed biological activity of CAPP systems was linked with their involvement in ROS and RNS generation in antibiotic solutions. Post-plasma liquids were studied in terms of pH changes, and electrical conductivity along with colourimetric techniques for concentration determination of ions  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  as well as molecules  $\text{H}_2\text{O}_2$  and total ROS contribution.



### 3. Wykaz skrótów

Przedstawione poniżej objaśnienie skrótów zawartych w rozprawie doktorskiej zostały przygotowane w oparciu o kolejność ich wystąpienia w tekście.

Skrót	Termin polskojęzyczny	Termin angielski
CAPP	Zimna plazma atmosferyczna	Cold Atmospheric Pressure Plasma
RFT	Reaktywne formy tlenu	Reactive oxygen species (ROS)
RFA	Reaktywne formy azotu	Reactive nitrogen species (RNS)
$^1\text{O}_2$	Tlen singletowy	Singlet oxygen
$\text{O}_3$	Ozon, trójtlen	Ozone
$\text{H}_2\text{O}_2$	Nadtlenek wodoru	Hydrogen peroxide
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anionorodnik ponadtlenkowy	Superoxide radical
$\text{OH}^{\bullet}$	Rodnik hydroksylowy	Hydroxyl radical
$\text{ONOO}^{\bullet}$	Nadtlenoazotyn	Peroxynitrite
$\text{NO}_2^-$	Anion azotanowy (III)	Nitrite ion
$\text{N}_2^+$	Kation azotanowy	Nitrogen cation
MCF-7	Linia komórkowa EACC, ludzki nowotwór piersi o niskiej zdolności przerzutowania	Breast cancer cell line, Michigan Cancer Foundation -7
MDA-MB-231	Linia komórkowa ATCC, ludzki nowotwór piersi o wysokiej zdolności przerzutowania	Breast cancer cell line
DMEM	Pożywka hodowlana Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Opti-MEM	Pożywka hodowlana, Optimum Modified Eagle Medium	Optimum Modified Eagle Medium
MTT	Sól tetrazolowa, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy	Tetrazolium dye, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OES	Optyczna spektrometria emisyjna	Optical emission spectrometry
$\text{NH}_4^+$	Jon amoniowy	Ammonium cation
OFX	Ofloksacyna, antybiotyk	Ofloxacin
DXC	Doksycyklina, antybiotyk	Doxycycline
AMP	Ampicylina, antybiotyk	Ampicillin
ChRP	Chloroamfenikol, antybiotyk	Chloramphenicol
HPLC-DAD	Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym	High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection

UPLC-MS	Ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas	Ultra-Performance Chromatography with Mass Spectrometry	Liquid Mass
TOC	Całkowity węgiel organiczny	Total organic carbon	
TN	Całkowity azot	Total nitrogen	
UV	Ultrafiolet, promieniowanie ultrafioletowe o długości fali od 10 do 400 nm	Ultraviolet, electromagnetic radiation	
UV/Vis	Spektroskopia, wykorzystująca promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie bliskiego ultrafioletu i światła widzialnego	Spectroscopy in the part of the ultraviolet and visible region of the electromagnetic spectrum	
DBD	Wyładowania barierowe, generujące zimną plazmę	Dielectric barrier discharge	
APPJ	Plazmowy dżet generowany pod ciśnieniem atmosferycznym	Atmospheric Pressure Plasma Jet	
RPMI 1640	Pożywka hodowlana, Roswell Park Memorial Institute medium	Roswell Park Memorial Institute medium	
F-12	Pożywka hodowlana, Ham's F-12 medium	Ham's F-12 medium	
PBS	Roztwór buforowy, buforowana fosforanem sól fizjologiczna	Phosphate-buffered saline	
He	Hel, gaz wyładowczy	Helium	
Ar	Argon, gaz wyładowczy	Argon	
O <sub>2</sub>	Tlen, gaz wyładowczy	Oxygen	
kINPen 11	Rodzaj plazmowego dżetu, generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym, produkt komercyjny	Portable APPJ Cold Plasma Device	
μ-DBD	Mikroplazmowy system wyładowań barierowych	Micro dielectric barrier discharges	
FE-DBD	Wyładowania barierowe z pływającą elektrodą	Floating electrode dielectric barrier discharges	
APGD	Wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym	Atmospheric Pressure Glow Discharges	
RONS	Reaktywne formy tlenu i azotu	Reactive oxygen and nitrogen species	
NO	Tlenek azotu (II)	Nitric oxide	
H•	Rodnik wodorowy	Hydrogen radical	
KI	Jodek potasu	Potassium iodide	
NaCl	Chlorek sodu	Sodium chloride	
CM-H2DCFDA	Pochodna chlorometylowa związku H2DCFDA – dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny	Chloromethyl derivative of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	
CBA	Kwas kumaryno-7- boronowy	Coumarin boronic acid	
L-15	Pożywka hodowlana Leibovitz's L-15 Medium	Leibovitz's L-15 Medium	

B16BL6	Linia komórkowa mysiego czerniaka	Mouse cell line derived from melanoma
PANC-1	Linia komórkowa ludzkiego raka trzustki	Human cell line derived from pancreatic duct
Hme11	Linia komórkowa ludzkiego czerniaka	Human cell line derived from endothelium of the foreskin
A375	Linia komórkowa ludzkiego czerniaka	Human cell line derived from the skin with malignant melanoma
U87	Linia komórkowa ludzkiego glejaka mózgu	Human cell line derived from malignant gliomas
GC	Chromatografia gazowa	Gas chromatography
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	Metawanadan amonu	Ammonium metavanadate
HaCaT	Ludzka linia komórkowa keratynocytów	Human primary epidermal Keratinocytes
MSU-1.1	Ludzka linia prawidłowa fibroblastów	Human cell line derived from fibroblasts
HskMEC.2	Ludzka linia komórkowa skórno-śródbłonka	Human cell line derived from Skin Microvascular Endothelial
MMF	Mysia linia komórkowa fibroblastu	Murine Embryonic Fibroblast Cell Lines
HeLa	Ludzka linia komórkowa raka szyjki macicy	Human cell line derived from cervical carcinoma
SKBR3	Ludzka linia komórkowa raka piersi	Human cell line derived from pleural effusion cells
A-549	Ludzka linia komórkowa raka płuc	Human cell line derived from lung cancer tissue
SW742	Ludzka linia komórkowa raka jelita grubego	Human cell line derived from colorectal cancer patient
ASPC-1	Ludzka linia komórkowa raka trzustki	Human cell line derived from patient with cancer of the pancreas
G-292	Ludzka linia komórkowa mięsaka	Human cell line derived from the bone of patient with osteosarcoma
FMGB-1	Ludzka linia komórkowa fibroblastu	Normal human skin fibroblasts
MDA-MB-468	Ludzka linia komórkowa raka piersi	Human cell line derived from pleural effusion of patient with metastatic adenocarcinoma of the breast
MAPK	Kinazy aktywowane mitogenami	Mitogen-activated protein kinase
NF-κB	Kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
JNK	Kinaza domeny N-końcowej białka Jun	c-Jun N-terminal kinases

p65	Jedno z białek z rodziny białek NF-κB	Protein in the mammalian NF-κB family
p38	Białko, ich funkcje zbliżone są do kinaz grupy JNK	p38 mitogen-activated protein kinases
L929	Mysia linia komórkowa fibroblastów	Murine cell line derived from connective mouse tissue
B16	Mysia linia komórkowa czerniaka	Murine cell line derived from skin melanoma
NADPH	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy	Nicotinamide adenine dinucleotide
ICD	Immunogenna śmierć komórkowa	Immunogenic cell death
HBL	Ludzka linia komórkowa z nabłonka gruczołu sutkowego	Human epithelial cell line derived from the milk of a nursing mother
CDK4	Enzym należący do grupy kinaz cyklinozależnych	Cyclin-dependent kinase 4
P16A	Białko inhibitor kinazy cyklinowej 2A	Protein, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CTR	Białko opiekuńcze, chaperonowe	Chaperone (protein)
FCM	Cytometria przepływowa	Flow Cytometry
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan	Adenosine triphosphate
B16-F10	Linia komórkowa mysiego czerniaka	Mouse cell line derived from melanoma
FCS	Surowica płodowa cieląt	Fetal calf serum
TNF-α	Czynnik martwicy nowotworów	Tumor necrosis factor
IL-10	Interleukina 10, czynnik hamujący syntezę cytokin	Cytokine synthesis inhibitory factor
CCL4	Białko zapalne makrofagów, należące do rodziny chemotaktycznych cytokin	Macrophage Inflammatory Proteins (MIP) belong to the family of chemotactic cytokines known as chemokines.
IL-1β	Interleukina 1 beta, cytokiny odpowiedzialne za efekty wywoływane przez IL-1	Interleukin 1 beta mononuclear cell factor, cytokine protein
CXCL1	Chemokinina 1, peptyd należący do rodziny chemokinin	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1, peptide belonging to chemokine family
Erk1/2	Kinaza regulowana 1/2, ścieżka sygnałowa aktywująca RAS/RAF	Extracellular signal-regulated kinases pathway activated by aberrant RAS/RAF signalling
CD28	Białko na powierzchni limfocytów T	Cluster of differentiation 28, proteins expressed on T cells
CD4+	Glikoproteina, występuje na powierzchni limfocytów T	Cluster of differentiation 4, helper of T cells
CD8+	Błona glikoproteinowa, konceptor cząsteczki TCR	Cluster of differentiation 8, transmembrane glycoprotein

IL-6	Interleukina 6, cytokinina aktywuje procesy zapalne	Interleukin 6, cytokine pro-inflammatory
IL-8	Interleukina 8, właściwie CXCL8, chemokina, najsilniejszy czynnik chemotaktyczny	Interleukin 8/ CXCL8, chemokine, mediator of immune response
MCP-1	Białko chemotaktyczne monocytów	Monocyte chemoattractant protein 1, chemokine (C-C motif) ligand 2
TGF- $\beta$ 1	Transformujący czynnik wzrostu beta 1, polipeptyd należący do cytokin	Transforming growth factor beta 1, polypeptide of cytokines
TGF- $\beta$ 2	Transformujący czynnik wzrostu beta 2, białko należące do cytokin	Transforming growth factor-beta 2, protein, cytokine.
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy	Deoxyribonucleic acid
CpG	sekwencje CpG, fragment DNA bakterii rozpoznawany przez limfocyty T	CpG sites, bacterial DNA regions
HIF-1 $\alpha$	Czynnik indukowany hipoksją 1	Hypoxia-inducible factor 1)
VEGFA	Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego	Vascular endothelial growth factor A
HCC1806	Ludzka linia komórkowa raka sutka	Human cell line derived from the mammary gland
SW480	Ludzka linia komórkowa raka jelita grubego	Human cell line derived from colorectal cancer patient
PC3	Ludzka linia komórkowa raka prostaty	Human cell line derived from bone metastasis of prostatic adenocarcinoma
NCF3	Ludzka linia komórkowa fibroblastów	Human cell line derived from fibroblasts
HSP90	Białko szoku cieplnego, należy do białek chaperonowych	Heat shock protein 90
PKD2	Gen, kodujący białko polycystynę -2	Genes coding the Polycystin-2 protein
AMJ13	Ludzka linia komórkowa raka piersi	Human cell line derived from breast cancer
AMN3	Mysia linia komórkowa raka piersi	Murine cell line derived from breast cancer
T-47D	Ludzka linia komórkowa raka piersi	Human cell line derived from pleural effusion from patient with an infiltrating ductal carcinoma of the breast
S-DBD	Powierzchniowe wyładowania barierowe	Surface dielectric barrier discharges
TEM	Transmisyjna mikroskopia elektronowa	Transmission electron microscopy
RT-DC	Cytometria przepływowa odkształceń w czasie rzeczywistym	Flowing real-time deformability cytometry

MHC 1	Molekuły głównego układu zgodności tkankowej klasy 1	Major histocompatibility complex (MHC) molecules class 1
A875	Ludzka linia komórkowa raka piersi	Human cell line derived from breast cancer
TNFR1	Receptory błonowe typu 1	Tumor necrosis factor receptor 1
iNOS	Indukowalna izoforma syntazy tlenku azotu	Inducible isoform of nitric oxide synthases
Fas	Transbłonowy receptor	Fas receptor, apoptosis antigen 1, protein encoded by the FAS gene
FasL	Ligand Fas, białko transbłonowe typu II	Fas ligand, type-II transmembrane protein
LD50	Średnia dawka śmiertelna	Median Lethal Dose 50
Malme-3M	Ludzka linia komórkowa czernika	Human cell line derived from skin cancer
SK-MEL-28	Ludzka linia komórkowa czernika	Human cell line derived from malignant melanoma
LN229	Ludzka linia komórkowa glejaka wielopostaciowego	Human cell line derived from glioblastoma
U87	Ludzka linia komórkowa glejaka wielopostaciowego	Human cell line derived from glioblastoma
IC50	Połowa maksymalnego stężenia hamującego	Half maximal inhibitory concentration
P53	Białko, czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego	Tumor protein P53, cellular tumor antigen p53, protein encoded by homologous genes
CDKN2A	Gen kodujący białko p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, gen codes p16 protein
MDR	Wielolekowa oporność	Multidrug resistant
MRSA	Oporny na metacylinę szczep Staphylococcus aureus	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
VRSA	Szczep Staphylococcus aureus odporny na działanie wankomycyny	Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus
AOP	Zaawansowanych Procesów Utleniania	Advanced Oxidation Process
PCD	Pulsowe wyładowania koronowe	Puls-corona discharge
ATCC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych	American Type Cell Culture
EGF	Naskórkowy czynnik wzrostu	Endothelial growth factor
ECGS	Suplement do wzrostu komórek śródbłonna	Endothelial cell growth supplement
FBS	Surowica płodowa cieląt	Fetal Bovine Serum
CO <sub>2</sub>	Tlenek węgla (IV)	Carbon dioxide
DMSO	Dimetylosulfotlenek	Dimethyl sulfoxide

CCD	Matryca CCD, składająca się z elementów światłoczułych	Charge-coupled device
RWC	Względne zamknięcie rany	Relative Wound Closure
EDTA	Kwas wersenowy	Ethylenediaminetetraacetic acid
FVB	Trybie całkowitego zbierania danych	Full vertical Binning
HI 96708	Komercyjnie dostępny zestaw spektrofotometryczny dla oznaczania NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrite High Range Portable Photometer
HI 96728	Komercyjnie dostępny zestaw spektrofotometryczny dla oznaczania NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate High Range Portable Photometer
K <sub>2</sub> Hg <sub>2</sub> I <sub>4</sub>	Odczynnik Nesslera, zasadowy roztwór tetrajodortęcianu(II) potasu	Nessler's reagent, dipotassium tetraiodomercurate (II)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kwas siarkowy (VI)	Sulfuric acid
DPBS	Buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ANOVA	Analiza wariancji, metoda statystyczna	Analysis of variance, statistical model
PI	Jodek propidyny	Propidium Iodide
MEM	Medium do hodowli komórek, pożywka minimalna	Minimum Essential Medium
H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	Kation tlenku wodoru	Hydrogen oxide cation
NH	Imidogen, prosty rodnik	Imidogen, radical, azanylidene
AQP1	Akwaporyna 1, białko	Aquaporin 1, protein
AQP3	Akwaporyna 3, białko	Aquaporin 3, protein
AQP5	Akwaporyna 5, białko	Aquaporin 5, protein
RSM	Metodologia powierzchni odpowiedzi, metoda statystyczna	Response Surface Methodology, statistical method
t <sub>pp</sub>	Temperatura stożka plazmy	Temperature of plasma plume
d <sub>pp</sub>	Długość stożka plazmy	Length of plasma plume
MRM	Tryb monitorowania wielu reakcji	Multi Reaction Monitoring
CCUG	Kolekcja Kultur Uniwersytetu w Gothenburg	Culture Collection University Of Gothenburg
BGSC	Centrum Genetycznych Zapasów Bacillus	Bacillus Genetic Stock Center
NBRC	NITE Centrum Zasobów Biologicznych	National Institute of technology and Evaluation, Biological Resource Center
DSM	Niemiecka kolekcja Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
M-HA	Agar Mullera-Hintona	Mueller-Hinton agar
McF	Skala McFarlanda	McFarland standard scale value

M <sub>35</sub>	Mieszanina czterech antybiotyków (OFX, DXC, AMP, ChRP) o stężeniu analitów 35 mg/dm <sup>3</sup>	Mixture of four antibiotics (OFX, DXC, AMP, ChRP) with the content of each analyte equal 35 mg/dm <sup>3</sup>
M <sub>10</sub>	Mieszanina czterech antybiotyków (OFX, DXC, AMP, ChRP) o stężeniu analitów 10 mg/dm <sup>3</sup>	Mixture of four antibiotics (OFX, DXC, AMP, ChRP) with the content of each analyte equal 35 mg/dm <sup>3</sup>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	Escherichia coli
<i>E. cloacae</i>	Enterobacter cloacae	Enterobacter cloacae
<i>B. subtilis</i>	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis
<i>S. marcescens</i>	Serratia marcescens	Serratia marcescens
MIC	Minimalne stężenie hamujące	Minimum inhibitory concentration
HNO <sub>2</sub>	Kwas azotowy (III)	Nitrous acid
HNO <sub>3</sub>	Kwas azotowy (V)	Nitric acid
HF	Kwas fluorowodorowy	Hydrofluoric acid
TNM	System klasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu	TNM Classification of Malignant Tumors
kINPen® MED	Rodzaj plazmowego dżetu, generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym, produkt komercyjny	Portable APPJ Cold Plasma Device



## 4. Wstęp

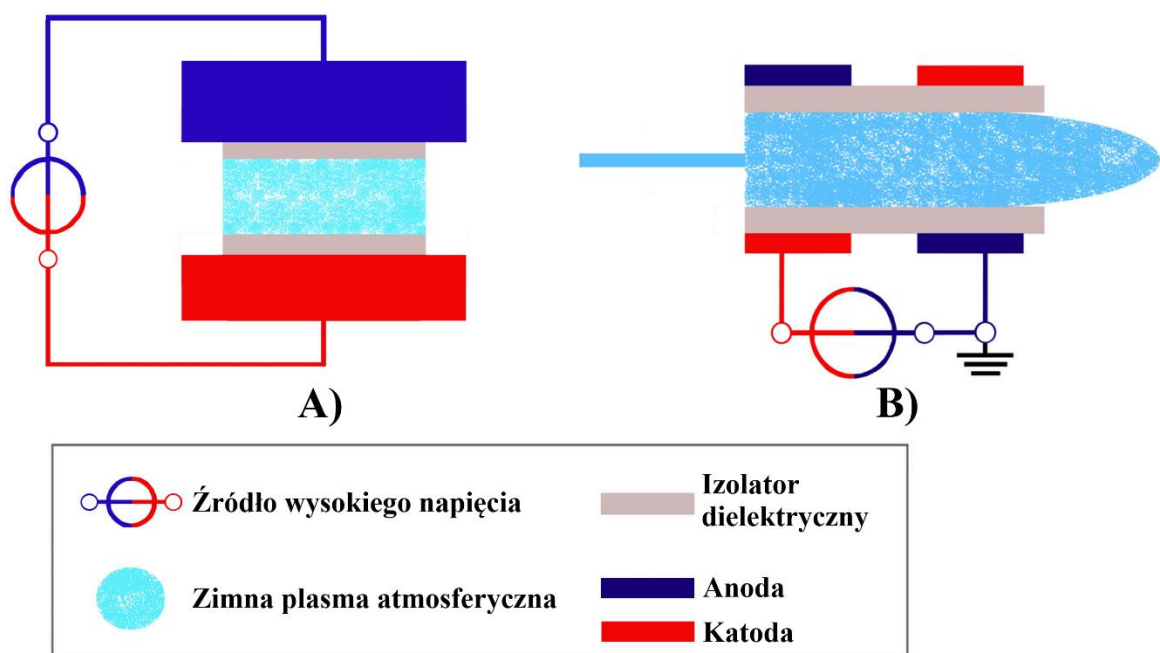
### 4.1. Układy zimnych plazm do zastosowań biologicznych

Rak piersi, obok nowotworu płuca, jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet (Ghoncheh i wsp., 2016; 2020 Breast Cancer Statistics). Ze względu na złośliwy charakter nowotworu piersi, a także wąski wachlarz efektywnych terapii, znacząco zmniejszone są szanse powrotu do zdrowia u zdiagnozowanych pacjentek (Rostami i wsp., 2016). Obecnie, najczęściej do zwalczania nowotworów wykorzystuje się chemoterapeutyki nowej generacji, radioterapie lub immunoterapie, które często wiążą się z bólem, ryzykiem infekcji, amputacji i innymi skutkami ubocznymi (Kamdje i wsp., 2014). Pojawia się zatem wysokie zapotrzebowanie na nowe, szybkie i nieinwazyjne metody zwalczania nowotworu piersi. Jedną z alternatyw zwalczania raka piersi jest opracowywanie terapii celowanych (Calavia i wsp., 2018). Głównymi atutami wydają się być obiecujący poziom przeżywalności, a także niski poziom skutków ubocznych, opisany przez Devi ze współpracownikami (Devi i wsp., 2020). Innym podejściem w zwalczaniu raka piersi, jest zmniejszenie objętości tkanki nowotworowej poprzez hipertermię (Maluta i wsp., 2015). Metoda ta opiera się na miejscowym podniesieniu temperatury tkanki stałej, z wykorzystaniem zewnętrznego źródła ciepła, prowadząc do uszkodzenia komórek nowotworowych, które pozostają bardziej wrażliwe na podwyższoną temperaturę (Banobre-Lopez i wsp., 2013; Biazar i wsp., 2011). Alternatywną ścieżką opracowywania nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej możemy upatrywać w zimnych plazmach atmosferycznych (*ang. Cold Atmospheric Pressure Plasmas, CAPPs*), które odznaczają się wysoką efektywnością, obiecującą selektywnością oddziaływania i stosunkowo niskimi kosztami operacyjnymi (Bekeschus i wsp., 2019; Liu i wsp., 2017; Subramanian i wsp., 2020; Zhang i wsp., 2020; Jezeh i wsp., 2020; Mokhtari i wsp., 2019). Drugim przypadkiem stanowiącym znaczący wkład w rozwój medycznego zastosowania zimnych plazm są badania nad wykorzystaniem do zwalczania czerniaka. Czerniak jest jednym z najbardziej złośliwych nowotworów skóry, z powodu tego obciążenia nowotworowego w USA dochodzi do niemal 10 000 zgonów każdego roku (Siegel i wsp., 2019). Rozpatrując śmiertelność pacjentów z czerniakiem w Europie, każdego roku dochodzi do ponad 25 000 zgonów (Globocan raport, 2020). Obserwowanym trendem jest coroczny przyrost liczby nowych przypadków na czerniaka, w szczególności wśród mężczyzn. Wskaźnik przeżywalności zależy w głównej mierze od stopnia jego zaawansowania w momencie wykrycia (Apalla i wsp., 2017). Współcześnie wykorzystywane terapie w leczeniu ludzkiego złośliwego raka skóry tracą na skuteczności ze względu na chemooporność,

wysoki stopień złośliwości, a także braku nowatorskich terapii o wysokiej skuteczności (Ferretti i wsp., 2016; Turner i wsp., 2018; Rozeman i wsp., 2018). Chemoterapia, wycięcie chirurgiczne bądź radioterapia wiążą się z bólem, infekcjami, amputacją, deformacjami bądź obrzękiem limfatycznym. Obecnie jedną z obiecujących i szeroko rozwijanych nowatorskich terapii w leczeniu nowotworów skóry jest immunoterapia. Wysoka efektywność immunoterapii względem czerniaka jest związana z dużym obciążeniem mutagennym powiązany z ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe. Odpowiedź immunogenna względem czerniaka generowana w wyniku oddziaływania z zimnymi plazmami związana jest z wytwarzaniem reaktywnych form wraz z promieniowaniem UV.

Obiecujące wyniki stosowania zimnych plazm atmosferycznych w leczeniu nowotworu piersi a także czerniaka zachęciły liczne grupy badawcze do podjęcia badań w obszarze aktywności biologicznej różnych układów wyładowczych zimnych plazm atmosferycznych nie tylko w leczeniu nowotworu piersi (Xiang i wsp., 2018), skóry (Daeschlein i wsp., 2018) ale również innych typów nowotworu tj, okrężnicy (Vodickova i wsp., 2018), mózgu (Vermeulen i wsp., 2016), płuc (Karami-Gadallo i wsp., 2017), szyjki macicy (Li i wsp., 2017), prowadzonych zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Ponadto, przez ostatnie 20 lat zimne plazmy przyciągnęły dużą uwagę ze względu na ich szeroki wachlarz zastosowań w biologii, chemii i medycynie. Tak różnorodne możliwości wykorzystania zimnych plazm jest powiązane z ich unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi, a przede wszystkim wydajnym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu (RFA), rodnikami, energetycznymi jonami, związkami obojętnymi, promieniowaniem w zakresie UV i polem elektromagnetycznym. Ze względów na różne rodzaje źródeł zimnych plazm, najpopularniejszym układem do zastosowań biologicznych są oparte o wyładowania barierowe (*ang. Dielectric Barriere Discharge, DBD*) (Yan i wsp., 2017). Wyładowania barierowe mogą być generowane w dwojaki sposób, zależny od rozwiązań konstrukcyjnych konfiguracji elektrod (Rycina 1). W pierwszym przypadku, dla konstrukcji objętościowej- zimne plazmy są podtrzymywane i operowane w przestrzeni pomiędzy elektrodami dielektrycznymi i traktowanym obiektem, pełniącym rolę przeciwelektrody (Kang i wsp., 2014). Omawiana konstrukcja umożliwia wydajniejszą kontrolę zimnych plazm, aczkolwiek ograniczając objętość traktowanej cieczy (Suwal i wsp., 2019; Hertrich i wsp., 2017). Takie systemy wyładowcze były wykorzystywane dla zahamowania proliferacji komórek ludzkiego raka jelita (Han i wsp., 2017). Drugie rozwiązanie konstrukcyjne, wykorzystujące strumień zimnych plazm wytwarzany

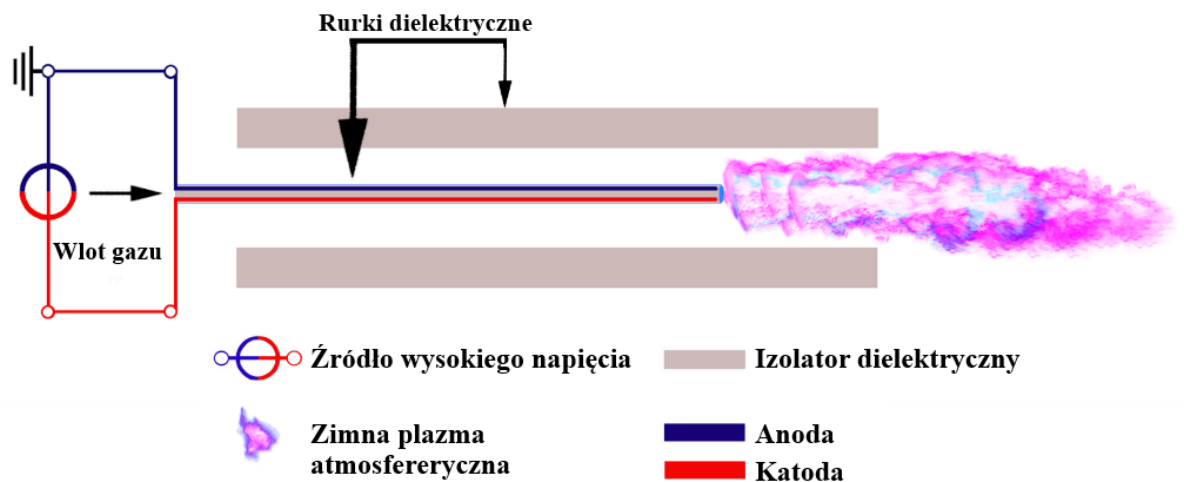
pomiędzy elektrodami dielektrycznymi, dosięga napromieniowany obiekt pod postacią stożka plazmy. W tym przypadku aktywne składniki mogą również rozchodzić się wewnątrz pożywki hodowlanej, prowadząc do wytworzenia cieczy aktywowanej plazmą, a następnie przenosząc tak wytworzone cieczy do badanych modeli biologicznych, celem określenia ich aktywności (Mohades i wsp., 2015). W cieczach poddanych traktowaniu zimnymi plazmami wytwarzane są RFT i RFA z różnym czasem życia (tj.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ), które w głównej mierze mogą być odpowiedzialne za odpowiedź biologiczną, zaburzając procesy życiowe komórek nowotworowych, bądź wspomagając procesy leczenia ran.



**Rycina 1.** Reprezentacyjny schemat układów reakcyjno-wyładowczych, oparty na wyładowaniach barierowych DBD, dedykowane do zastosowań biologicznych i biomedycznych. A) Konstrukcja objętościowa generacji wyładowań. B) Plazmowy dżet wytwarzany w wyniku wyładowań barierowych, generujący stożek plazmy rozchodzącą się do otoczenia.

Kolejnym rozwiązaniem konstrukcyjnym często wykorzystywanym w badaniach biologicznych jest tzw. plazmowy dżet (z języka angielskiego- jet) generowany pod ciśnieniem atmosferycznym (*ang. Atmospheric Pressure Plasma Jet, APPJ*) (Rycina 2). Układy typu APPJ są operowane w trybie pulsacyjnym, wykorzystując częstotliwości radiowe prądu. Główną częścią składową tego typu układów wyładowczych stanowi wysokoprądowa elektroda zlokalizowana w centralnej części rurki dielektrycznej, zapobiegającej powstawaniu łuków elektrycznych. Elektrody wysokoprądowe (najczęściej w formie pierścieni bądź płaskich dysków) są zasilane prądem częstotliwości radiowej (rzędu kHz- MHz) o napięciu 2-6 kV. Całkowity pobór mocy generowany w trakcie

podtrzymywania wyładowań pozostaje w zakresie 0,9 – 2,2 W (Iseni i wsp., 2014). W tych warunkach gaz wyładowczy przepływający przez elektrodę wysokoprądową z prędkością przepływu kilku litrów na minutę podlega procesom wzbudzenia i jonizacji, tworząc charakterystyczny stożek (dżet), który składa się z szeregu plamek zimnych plazm. Tak wytworzone stożki (o długości 1-10 cm) rozchodzić się mogą do otoczenia (Lu i wsp., 2009).



**Rycina 2.** Układ reakcyjno-wyładowczy, generujący plazmowy dżet pod ciśnieniem atmosferycznym do zastosowań biologicznych i biomedycznych.

Mając na uwadze najnowsze osiągnięcia dotyczące możliwości zastosowania zimnych plazm w medycynie, a szczególnie w onkologii, przedstawiono zgrupowanie i podsumowanie warunków wzbudzania plazmy i ich wpływu na aktywność biologiczną nowotworu skóry, głównie skupiając się nad nowotworami piersi i czerniaka. Ponadto, przedstawiono szczegółowe podsumowanie systemów wyładowczych zimnych plazm z ich parametrami operowania wykorzystywanych w badaniach nad leczeniem obciążań nowotworowych (Tabela 1). Najczęstszym środowiskiem dla badań nad nowotworem piersi i skóry z wykorzystaniem technologii zimnych plazm atmosferycznych były pożywki hodowlane (DMEM, RPMI 1640 i F-12 wraz z PBS). Zimna plazma do zastosowań biomedycznych najczęściej generowana jest w układach wyładowań barierowych oraz APPJ, wykorzystując najczęściej jako gaz wyładowczy hel (He), argon (Ar), powietrze, a także dodatki innych gazów, głównie tlenu (O<sub>2</sub>). Prezentowane prace badawcze do opisu parametrów wzbudzania zimnej plazmy atmosferycznej wykorzystują wartości napięć (w zakresie 1-20 kV), częstotliwości (w zakresie 1-40 kHz), natężenia prądu, poboru energii (w przedziałach 1-60 W). Istotnym parametrem określanym w pracach pozostaje odległość źródła zimnej plazmy atmosferycznej od traktowanej powierzchni ciekłej pożywki lub

komórek, oscylując w granicach 0-30 mm. Tutaj należy również wprowadzić podział ze względu na sposób poddawania modeli biologicznych traktowaniu układami zimnych plazm atmosferycznych. Poprzez traktowanie bezpośrednie należy rozumieć poddanie rozpatrywanych komórek bezpośredniemu działaniu układów reakcyjno-wyładowczych. Komórki w tym przypadku mogą być zawieszane w pożywce hodowlanej. Jako traktowanie pośrednie przyjmować będziemy ciekłe pożywki, które zostały poddane ekspozycji zimnych plazm atmosferycznych, a następnie wykorzystane do prowadzenia hodowli komórkowych, poddając je tym samym ekspozycji tak uzyskanych cieczy aktywowanych zimną plazmą. Traktowanie mieszane stanowi połączenie traktowania bezpośredniego z traktowaniem pośrednim, gdzie wykorzystywane modele biologiczne najpierw poddaje się bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy a następnie tak potraktowane komórki zostają zawieszane w oddzielnie przygotowanych cieczach aktywowanych zimną plazmą. Celem określenia dawki zimnej plazmy dostarczanej do rozpatrywanych układów biologicznych, uściślony zostaje czas traktowania, nieprzekraczający zazwyczaj 300 s.

**Tabela 1.** Układy reakcyjno-wyładowcze wraz z ich parametrami operacyjnymi, które zostały wykorzystane do traktowania komórek linii nowotworu piersi i skóry.

<b>Źródło zimnych plazm</b>	<b>Gaz wyładowczy</b>	<b>Parametry wyładowania</b>	<b>Odległość [mm]</b>	<b>Cel</b>	<b>Czas ekspozycji [s]</b>	<b>Referencje</b>
<b>APPJ</b>	Powietrze	Napięcie 10 kV, natężenie wyładowań 5 mA,	20	Zawiesina komórek MDA-MB-231 i MDA-MB-453 w 5 mL kompletnego L-15, MCF10A w 5 mL DMEM/F12	120	Liu i wsp., 2017
<b>DBD</b>	Powietrze	Pobór energii 6,8 W, napięcie szczytowe 5 kV, sinusoidalna częstotliwość napięcia 15 kHz	0	Woda dejonizowana	1200	Subramanian i wsp., 2020
<b>DBD</b>	He, 80 L h <sup>-1</sup>	Sinusoidalne wysokie napięcie 12 kV, częstotliwość napięcia 24 kHz	5	Zawiesina komórek HeLa, MCF-7 w 2 mL kompletnego DMEM	40	Zhang i wsp., 2020
<b>APPJ</b>	He, 4 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 5 kV, częstotliwość napięcia 25 kHz	10	Zawiesina komórek HeLa i MDA-MB-231 w RPMI 1640/ Kompletnie RPMI 1640, 200 µL	300	Jezech i wsp., 2020
<b>DBD</b>	He, 3,5 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 6 kV	20	100 µL, DMEM	360	Mokhtari i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Ar, 2 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 7 kV, częstotliwość napięcia 27 kHz,	25	Zawiesina komórek MDA-MB-231 w kompletnym DMEM	60	Gurung i wsp., 2020
<b>Siateczkowy-DBD</b>	Ar, 1,8 L Min <sup>-1</sup>	Napięcie 0,3 kV, częstotliwość napięcia 12,9 kHz	4	Zawiesina komórek MCF-7 i MCF-7/TxR w 2 mL kompletnego RPMI 1640	10 x 30	Park i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	He, He/O <sub>2</sub> , 2 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 10 kV, częstotliwość napięcia 6 kHz,	10	Zawiesina komórek MCF-7 i MCF10A w kompletnym DMEM	300	Mirpour i wsp., 2014
<b>FE-DBD</b>	Powietrze	Napięcie 13,2 kV, częstotliwość napięcia 70 kHz, pobór energii 56,84 W	0	Zawiesina komórek MCF-7, AMJ13, AMN3, HBL w 100 uL kompletnie RPMI 1640	15	Adil i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	He, 1 L min <sup>-1</sup>	Sinusoidalne wysokie napięcie 1,4 kV, częstotliwość napięcia 8,8 kHz	13	2 mL kompletnego DMEM/F-12	50	Xiang i wsp., 2018
<b>DBD</b>	Powietrze	Napięcie 8 kV, pobór energii 5 W	5	Zawiesina komórek MDA-MB-231 w 100 uL PBS	120	Lin i wsp., 2020
<b>DBD</b>	Powietrze	Napięcie szczytowe 20 kV, częstotliwość napięcia 1,5 kHz, gęstość poboru energii 0,31 W cm <sup>-2</sup>	2	Zawiesina komórek MCF10A w 100 uL kompletnie DMEM/F-12	120	Kalghatgi i wsp., 2011

<b>Siateczkowyy-DBD</b>	Ar, 1 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 0,38 kV, natężenie prądu 12,6 mA i częstotliwość napięcia 12,9 kHz	4	Zawiesina komórek MCF10A i MCF-7 w kompletnym RPMI 1640	10 x 30	Kim i wsp., 2020
<b>APPJ</b>	Powietrze	Napięcie 4 kV, częstotliwość napięcia 1 kHz, natężenie prądu 33 µA	2	200 µL kompletne RPMI 1640 i DMEM	120	Almeida-Ferreira i wsp., 2022
<b>DBD</b>	Powietrze	Pobór energii 167-237 mW, częstotliwość impulsów 250 Hz	1	PBS	180	Daeschlein i wsp., 2018
<b>APPJ</b>	He, 3 L min <sup>-1</sup>	Sinusoidalne HV, częstotliwość 39,5 kHz, 6 kV napięcie szczytowe	25	500 µL kompletne RPMI 1640	90	Xu i wsp., 2018
<b>APPJ</b>	Ar, 2 L min <sup>-1</sup>	Częstotliwości radiowe, pobór energii 20 W, częstotliwość radiowa 10 MHz.	10	Tryptofan	480	Li i wsp., 2018
<b>kINPen 11</b>	Ar, 5 L min <sup>-1</sup>	Napięcie powtarzania impulsów 2,5 kHz, sinusoidalna częstotliwość napięcia 1 MHz, pobór energii 3,5 W	0	Zawiesina komórek w kompletnym RPMI 1640	120	Bekeschus i wsp., 2017
<b>DBD-PetriPlas<sup>+</sup></b>	Syntezyczne powietrze/O <sub>2</sub> 0,5 L min <sup>-1</sup>	zmiennoprądowe, częstotliwość 6 kHz, sinusoidalne napięcie 13 kV, 50% wypełnienie	2	Kompletne DMEM, 3 mL	180	Azzariti i wsp., 2019
<b>Surface-DBD</b>	Powietrze	Sinusoidalne wysokie napięcie 11 kV, sinusoidalna częstotliwość napięcia 10 kHz, średnia rozproszona gęstość mocy 0,06 W/cm <sup>2</sup>	10	Zawiesina komórek w PBS	180	Xia i wsp., 2019
<b>APPJ kINPen</b>	Ar, 3 L min <sup>-1</sup>	Sinusoidalne napięcie 2-6 kV, sinusoidalna częstotliwość napięcia 1 MHz	20	PBS, kompletne RPMI 1640	120	Rodder i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Powietrze/N <sub>2</sub> , 1,5 L min <sup>-1</sup>	zmiennoprądowe, wypełnienie 11%, częstotliwość 70 kHz, napięcie 0,5 kV,	10	MEM i RPMI 1640 z zawiesiną komórek	300	Yadav i wsp., 2020
<b>µ-DBD</b>	Powietrze, 1,5 L min <sup>-1</sup>	zmiennoprądowe, wypełnienie 7%, częstotliwość repetycji 4 Hz, sinusoidalne napięcie 1,4 kV, sinusoidalna częstotliwość napięcia 60 kHz,	0	Zawiesina komórek w RPMI 1640	180	Adhikari i wsp., 2020
<b>APPJ</b>	He/He+O <sub>2</sub>	napięcie 3,5 kV, częstotliwość 25 kHz, pobór energii 0,7 W	20	Kompletne DMEM	180	Mashayekh i wsp., 2015
<b>APPJ</b>	Ar, 20 L min <sup>-1</sup>	Sinusoidalne wysokie napięcie, napięcie 3 kV, sinusoidalna częstotliwość napięcia 37 kHz, pobór energii 3,16 W	20	Kompletne RPMI 1640	8	Shi i wsp., 2013
<b>Surface-DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	zmiennoprądowe, napięcie 15 kV, częstotliwość 22 kHz pobór energii 3,15 W	2	Komórki czerniaka sprężone z przeciwciałem NEU do AuNPs	30	Choi BB i wsp., 2015
<b>Surface-DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	zmiennoprądowe, napięcie 15 kV, częstotliwość 22 kHz	2	Komórki czerniaka sprężone z przeciwciałem p-FAK do AuNPs	30	Choi BBR i wsp., 2017
<b>µ-DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	Napięcie 17 kV, częstotliwość 500 Hz	1	Komórki czerniaka	10	Lin i wsp., 2019

Kolejną pręźnie rozwijającą się dziedziną wykorzystującą aktywność biologiczną zimnych plazm jest ich zastosowanie do rozkładu farmaceutyków z roztworów wodnych, a następnie określenie wpływu tak uzyskanych cieczy na zjawisko wielolekowej oporności bakteryjnej. Ze względu na ukierunkowanie układów generujących zimną plazmę do zastosowań półprzemysłowych i przemysłowych oczyszczania ścieków, ich konstrukcja może się różnić od tych dla zastosowań biomedycznych. Najpopularniejszym rozwiązaniem konstrukcyjnym dedykowanym rozkładowi antybiotyków z roztworów wodnych pozostają układy planarne, generujące wyładowania barierowe (Rycina 1 A). W tym przypadku, istnieje jednakże kilka modyfikacji konstrukcyjnych. Pierwszą modyfikacją układu planarnego wykorzystywanego w badaniach nad rozkładem antybiotyków stanowi zanurzenie dolnej elektrody w roztworze farmaceutyku, który tworzy warstwę grubości kilku kilkunastu milimetrów a następnie przyłożenie napięcia pomiędzy tak ustalonymi elektrodami. Zimne plazmy generowane w przestrzeni pomiędzy elektrodami, oddziałują bezpośrednio na roztwór wodny otaczający elektrodę. Układy te najczęściej określane są mianem systemów DBD z pływającą elektrodą (ang. *Floating electrode DBD*, FE-DBD) (Magureanu i wsp., 2011; Smith i wsp., 2018). Ponadto układy takie można zmodyfikować, poprzez dobranie atmosfery, w której inicjowane są wyładowania. Kolejną modyfikacją układów planarnych wykorzystujących wyładowania barierowe, jest ich dostosowanie do traktowania roztworów antybiotyków w trybie ciągłego przepływu przez układ. W tym celu, wewnątrz systemu montowana jest elektroda w kształcie walca lub płyty, z której spływa ciągłym strumieniem roztwór antybiotyku, równomiernie rozprowadzony po całej powierzchni. Elektroda w kształcie walca otoczona jest z zewnątrz drugą elektrodą. Poprzez przyłożenie napięcia pomiędzy tymi dwoma elektrodami, indukowana jest zimna plazma, oddziałująca na powierzchnię przepływającego roztworu antybiotyku. Takie rozwiązanie, niewątpliwie umożliwia prowadzenie procesu traktowania roztworów farmaceutyków zimną plazmą w sposób ciągły, zwiększając znacznie jego wydajność (Aggelopoulos i wsp., 2020). Kolejnym rozwiązaniem konstrukcyjnym stosowanym w badaniach nad degradacją farmaceutyków z roztworów wodnych stanowią układy generujące wyładowania koronowe (ang. *Corona discharge*). W najprostszym przypadku, metaliczna igła, pręt lub wiązka przewodów pełniących rolę elektrody wysokich napięć umiejscowiona zostaje nad zbiornikiem wypełnionym wodnym roztworem farmaceutyku, pełniącej rolę elektrody uziemienia. Przykładając wysokie napięcia pomiędzy tak umiejscowionymi elektrodami następuje generacja wyładowań zimnej plazmy, oddziałującej bezpośrednio na roztwór wodny



farmaceutyku (El Shaer i wsp., 2020; Guo i wsp., 2019). Coraz częściej spotykana jest modyfikacja tego układu, gdzie metaliczne elektrody w postaci igieł zostają zanurzone w roztworze traktowanego farmaceutyku. Nad zanurzonymi elektrodami umieszcza się następnie przeciwelektrodę w formie płaskiej metalicznej płytki. Przez metaliczne igły odgrywające rolę elektrod, przepuszczony zostaje gaz wyładowczy, który inicjuje wyładowania zimnej plazmy uwięzionej w pęcherzykach (ang. *Corona in bubbles*) (El Shaer i wsp., 2020). Kolejnym przykładem układów generujących zimną plazmę do rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych stanowią systemy oparte na APPJ (Rycina 2), gdzie szczególny nacisk jest położony na wytworzenie stożka zimnej plazmy o jak największej średnicy. Wykorzystanie wyładowań zimnej plazmy generowanej w układach APPJ odbywa się w tym przypadku najczęściej przy zachowaniu stałej objętości traktowanych roztworów antybiotyków (Park i wsp., 2019; Li i wsp., 2020). Ostatnim systemem, który zaczęto wykorzystywać do rozkładu farmaceutyków z roztworów wodnych jest układ opracowany w zespole badawczym, w którym niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana. Wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *Atmospheric Pressure Glow Discharges*, APGD) inicjowane są poprzez przyłożenie stałoprądowego lub o częstościach radiowych wysokiego napięcia pomiędzy metaliczną zaostrzoną elektrodę a elektrodę ciekłą, którą stanowi stale przepływający roztwór wodny farmaceutyku. Wyładowania jarzeniowe rozchodzące się w atmosferze bezpośrednio oddziałują na przepływający roztwór farmaceutyku (Dzimitrowicz i wsp., 2022). Niezwykle proste rozwiązanie konstrukcyjne, umożliwia uzyskanie wysokiej efektywności prowadzenia procesu degradacji ze względu na operowanie w trybie stałego przepływu jak prostota dostosowania dla użytku przemysłowego. Zaprezentowano zestawienie systemów wyładowczych zimnych plazm z ich parametrami operowania wykorzystywanych w pracach nad degradacją farmaceutyków z roztworów wodnych (Tabela 2).

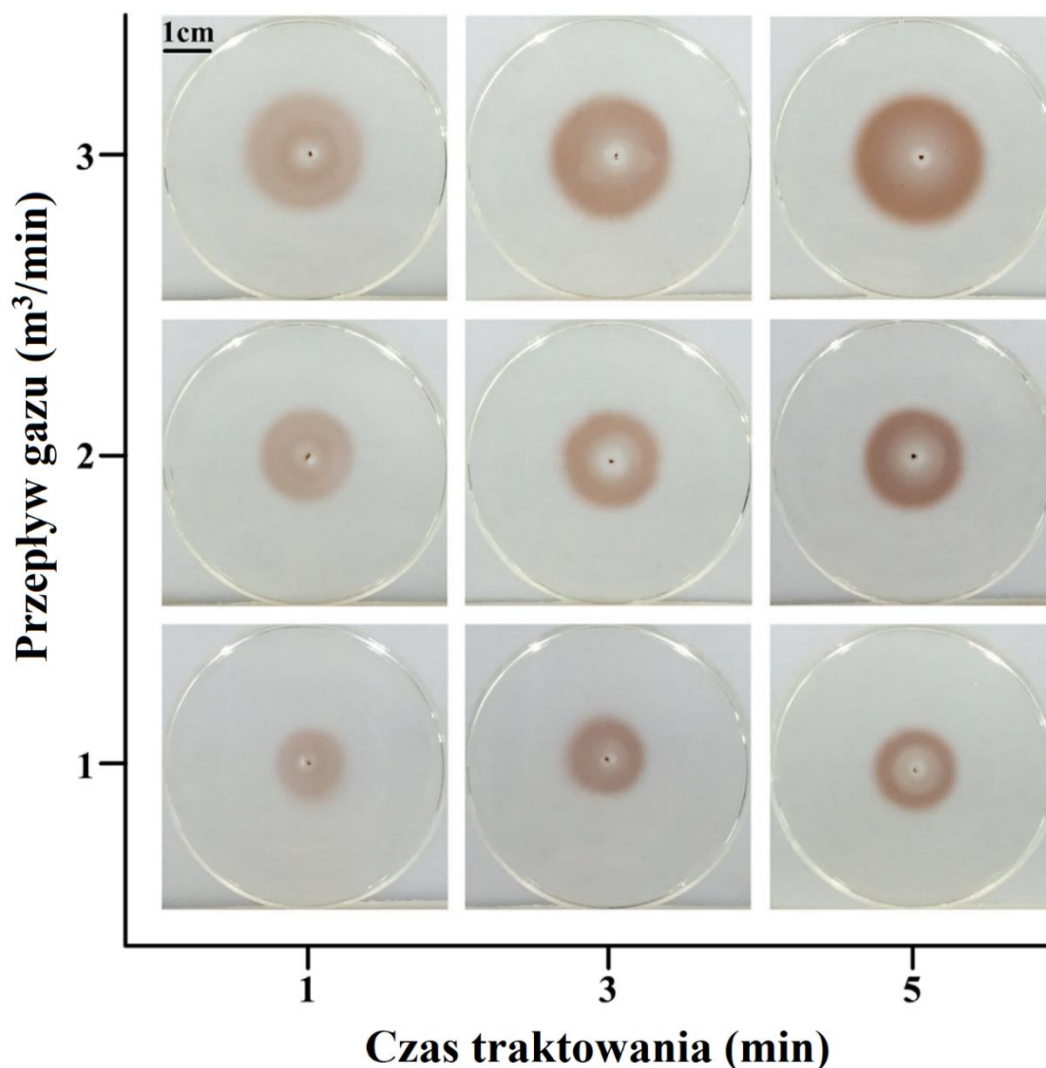
**Tabela 2.** Układy reakcyjno-wyładowcze wraz z ich parametrami operacyjnymi, które zostały wykorzystane do traktowania wodnych roztworów antybiotyków.

<b>Źródło zimnych plazm</b>	<b>Gaz wyładowczy</b>	<b>Parametry wyładowania</b>		<b>Czas traktowania [min]</b>	<b>Cel</b>	<b>Stożek rozkładu</b>	<b>Referencje</b>
<b>FE-DBD</b>	Tlen, 600 mL min <sup>-1</sup>	Napięcie 17 kV, natężenie wyładowań 110 A, częstotliwość repetycji 50 Hz, pobór energii 2 W.		120	Ofloksacyna, Amoksycylina, Ampicylina [100 mg dm <sup>-3</sup> ]	100 %, 100%, 100%	Magreanu i wsp., 2011
<b>DBD</b>	Powietrze	Napięcie 80 kV, częstotliwość repetycji 50 Hz,		25	Ofloksacyna, Cyprofloksacyna [25 mg dm <sup>-3</sup> ]	89%, 92%	Sarangapani i wsp., 2019
<b>FE-DBD</b>	Powietrze	Napięcie 11,2 kV, pulsy o częstotliwości nanosekundowej, z częstotliwością napięcia 690 fHz,		5	Ampicylina [6,988 mg dm <sup>-3</sup> ]	100 %	Smith i wsp., 2018
<b>DBD</b>	Powietrze, 1 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 26,2 kV, pulsy o częstotliwości nanosekundowej, z częstotliwością napięcia 300 Hz, pobór energii 1,28 W		20	Enrofloksacyna [40 mg dm <sup>-3</sup> ]	100 %	Aggelopoulos i wsp., 2020
<b>Korona i Korona w bąbelkach</b>	Powietrze, 1 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 3 kV, częstotliwość napięcia 5 kHz, natężenie 3 mA		30	Oksytetraacyklina, Doksycyklina [50 mg dm <sup>-3</sup> ]	70 %, 97 %	El Shaer i wsp., 2020
<b>Korona z kompozytem TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></b>	Powietrze, 4 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 18 kV, częstotliwość napięcia 50 Hz,		60	Chloramfenikol [20 mg dm <sup>-3</sup> ]	88,1 %	Guo i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Powietrze, 1,8 L min <sup>-1</sup>	częstotliwość napięcia 670 Hz, pobór energii 32,6 W		24	Cyprofloksacyna [10 mg dm <sup>-3</sup> ]	93,4 %	Hu i wsp., 2019
<b>DBD</b>	Powietrze, tlen 0,18 mL min <sup>-1</sup>	Napięcie 20 kV, częstotliwość napięcia 20 kHz, pobór energii 45 W,		15, 5	Paracetamol [25 mg dm <sup>-3</sup> ], Ceftriaksol [5 mg dm <sup>-3</sup> ]	100%, 100%	Iervolino i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Powietrze, 2,5 L min <sup>-1</sup>	Napięcie 19 kV		20	Tetracyklina, Sulfadiazyna, Cyprofloksacyna [50 mg dm <sup>-3</sup> ]	93,3%; 81,2%; 58,5 %	Li i wsp., 2020
<b>APGD</b>	Powietrze	Wypełnienie 50%, częstotliwość napięcia 50 kHz, częstotliwość modulacji 1400 Hz, pobór energii 84 W		-	Doksycyklina [54,5 mg dm <sup>-3</sup> ]	79	Dzimitrowicz i wsp., 2022

#### **4.2.Przestrzenna dystrybucja reaktywnych form tlenu i azotu dla zastosowań biologicznych.**

Aktywność biologiczną układów zimnych plazm przypisuje się ich zdolności do wytwarzania RFT i RFA (*ang. Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species*, ROS, RNS), generowanych w wyniku reakcji kaskadowych pomiędzy stożkiem zimnych plazm a otaczającą atmosferą, w której się rozchodzi, bądź środowiskiem wodnym, z którym pozostaje w kontakcie ( Bekeschus i wsp., 2019; Liu i wsp., 2017; Chauvin i wsp., 2017). Wykorzystując świadomość możliwego wytworzenia nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), tlenu azotu II (NO), jonów azotanowych (V) ( $NO_3^-$ ), azotanowych (III) ( $NO_2^-$ ) i amonowych ( $NH_4^+$ ), a także rodników hydroksylowych ( $OH^\bullet$ ), wodorowych ( $H^\bullet$ ), tlenowych (O), ozonu ( $O_3$ ) w efekcie kontaktu stożka zimnej plazmy ze środowiskiem wodnym lub pożywką hodowlaną (Bekeschus i wsp., 2019; Chauvin i wsp., 2017), tak aktywowane ciecze bądź reakcje z nimi wykorzystywane są do procesów gojenia ran (Kleineidam i wsp., 2019), zwalczania pasożytów (Fridman i wsp., 2008), a także w stomatologii (Sladek i wsp., 2004), syntezie nanocząstek (Dzimitrowicz i wsp., 2018) bądź w agrotechnice (Ling i wsp., 2014). W celu zbadania kluczowych parametrów koniecznych do uwzględnienia podczas badań z wykorzystaniem zimnych plazm tj. rozkład przestrzenny generowanych RFT i RFA jak również zdolność ich penetracji w głąb skóry i tkanek wykorzystywanych jest kilka metod (Tan i wsp., 2018). Celem uważniejszego prześledzenia zjawisk towarzyszących oddziaływaniu RFT i RFA do zastosowań biologicznych, przeprowadzono liczne prace badawcze skupiając się wokół określenia ich przestrzennej dystrybucji (Dobrynin i wsp., 2012; Szili i wsp., 2018; Naito i wsp., 2008; Kawasaki i wsp., 2016; Mitsugi i wsp., 2019; Liu i wsp., 2018; Duan i wsp., 2017; Nie i wsp., 2018). Jednym z bardziej popularnych podejść do określenia przestrzennego rozprzestrzenienia reaktywnych form jest zastosowanie żeli agarowych imitujących powierzchnię rany (Dobrynin i wsp., 2012; Szili i wsp., 2018). Kolejny model przygotowywany jest z cienkich warstw  $TiO_2$  (Naito i wsp., 2008) lub żeli z kompleksami jodku potasu ze skrobią (KI-skrobia) dla lepszej wizualizacji penetracji RFT. Wizualizacja reaktywnych form tlenu została zaprezentowana i omówione przez zespół Mitsugi (Mitsugi i wsp., 2019). Mieszanina KI-skrobia (w formie żelu) została potraktowana APPJ, pozwalając na zaobserwowanie wytworzenia RFT poprzez pojawienie się widocznych granatowych obszarów w formie pierścieni. Za kolor granatowy był odpowiedzialny kompleks jodu ze skrobią. Z kolei jod był produktem reakcji utleniania jonów jodkowych za pomocą wytworzonych RFT. Inna metoda dla oznaczenia wytworzonych RFT została przedstawiona przez Liu ze współpracownikami (Liu i wsp.,

2018). W tym przypadku pomiarów dokonano z użyciem modeli tkanek zawierających na powierzchni żel KI-skrobia. Wykazano, że potraktowanie modeli tkankowych zimnymi plazmami prowadzi do pojawienia się ciemnych brązowych wzorów w kształcie pierścieni oraz niewielkim punktem w centralnej części o najintensywniejszym zabarwieniu. Zaobserwowane różnice w odbarwionych obszarach były efektem wytworzenia RFT. Średnica zabarwionych powierzchni w kształcie pierścieni wzrastała wraz z natężeniem przepływu gazu plazmotwórczego (mieszanina helu z tlenem) (Rycina 3). Potwierdzono dodatkowo, że wraz z wydłużeniem czasu traktowania zimnymi plazmami nie wpływa w znaczącym stopniu na rozkład przestrzenny wytwarzanych RFT. Jednakże wydłużenie czasu napromieniowania zimnymi plazmami doprowadziło do wzrostu stężenia wytworzonych RFT obserwowanych jako pogłębienie koloru obszaru poreakcyjnego. Sprawdzono również wpływ kąta nachylenia stożka zimnych plazm względem traktowanej powierzchni na przestrzenną dystrybucję wytworzonych RFT. Kąty nachylenia wychodząc z położenia prostopadłego zostały dobrane w zakresie od  $0^\circ$  do  $90^\circ$ . Zauważono, że zwiększenie kąta nachylenia źródła zimnych plazm doprowadziło do zwiększenia obszaru zabarwionego na brąz podczas gdy kształt zabarwionego rejonu zmienił się w przypominający spadającą kroplę. Prezentowane wyniki potwierdzają konieczność doboru odpowiedniego kąta nachylenia źródła generującego zimne plazmy a stężenie generowanych RFT i może być trudne do kontrolowania (Liu i wsp., 2018).



**Rycina 3.** Wpływ czasu traktowania zimną plazmą i prędkości przepływu gazu (Hel z tlenem) wyładowczego na dystrybucję przestrzenną RFT na modelach żelowych KI-skrobii. Grafika wykorzystana z publikacji (Liu i wsp., 2018).

Ciekawa metoda oznaczania reaktywnych form tlenu i azotu została omówiona przez zespół Duan (Duan i wsp., 2017), którzy prześledzili głębokość penetracji poszczególnych reaktywnych indywiduów przez różnej grubości płyty świńskich mięśni. Reaktywne formy wytworzone w wyniku wyładowania w mieszaninie helu z tlenem plazmowego dżetu, po przeniknięciu przez różnej grubości modele tkanki, ulegały zawieszeniu w PBS, prowadząc do wytworzenia reaktywnych form tlenu i azotu o długim czasie życia tj.  $O_3$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ . Stwierdzono, że aktywne składniki wytworzone poprzez dżet zimnych plazm są w stanie przeniknąć tkanki o grubości  $1250\ \mu m$  z wyłączeniem  $O_3$  i  $NO_2^-$ . Wydłużenie czasu napromieniowania doprowadziło do znacznego zwiększenia stężenia głównego RFT – nadtlenu wodoru (Duan i wsp., 2017). Podobne badania zostały zrealizowane przez zespół Nie (Nie i wsp., 2018), opisując metodologię eksperymentu dla penetracji RFT i RFA do

podwójnie destylowanej wody, roztworu PBS i roztworu NaCl, oraz wodnych roztworów glukozy, ciekłych pożywek i dwóch roztworów surowicy o różnych stężeniach. Uzyskane wyniki były porównywalne z tymi, które zostały omówione powyżej, jednakże określono głębokość penetracji RFT i RFA zależała od rodzaju traktowanego układu ciekłego. Dla modelu tkanki o grubości 1250  $\mu\text{m}$  potwierdzono drogę maksymalną, jaką może pokonać większość reaktywnych form. Ponadto, stężenie tak wytwarzanych reaktywnych związków ulegało akumulacji wraz z wydłużeniem czasu traktowania zimnymi plazmami. Wytwarzanie RFT i RFA w sposób znaczny wzrastało wraz ze zwiększeniem udziału materii organicznej w napromieniowanych cieczach. Pozostałe techniki badawcze wykorzystywane do pomiarów stężenia reaktywnych form podczas prowadzonych prac z komórkami linii nowotworu piersi i czerniaka zostały ujęte i podsumowane w Tabeli 3. Główną techniką badawczą określającą reaktywne formy tlenu wewnątrz komórek wykorzystuje wskaźnik stresu oksydacyjnego, tj. CM-H2DCFDA. Oznaczanie nadtlenku wodoru przeprowadzane jest często z wykorzystaniem testu CBA (ang. *coumarin boronic acid*). Analizę zawartości RFA przeprowadza się z wykorzystaniem różnych metod kolorymetrycznych, jednakże najczęściej wykorzystywany w tym celu jest metoda Griessa dla oznaczeń  $\text{NO}_2^-$ . Często stosowana jest również modyfikacja tej metody, prowadząca do chemicznej redukcji jonów  $\text{NO}_3^-$  do  $\text{NO}_2^-$  i oznaczenie całkowitej zawartości tej formy z użyciem odczynnika Griessa. Na uwagę zasługuje coraz szersze wykorzystanie komercyjnie dostępnych kitów pomiarowych, bazujących na oznaczeniach kolorymetrycznych zarówno dla RFT jak i RFA.

**Tabela 3.** Metody wykorzystywane do określania i oznaczania RFT i REA w cieczach napromieniowanych zimną plazmą dla badań na komórkach nowotworowych, a także do ich oznaczania wewnątrz komórek nowotworowych poddanych ekspozycji na źródła zimnych plazm atmosferycznych.

Źródło zimnych plazm	Gaz plazmotwórczy	Metody		Reaktywne formy tlenu/ azotu	[Ref.]
		Ciekłe (C.)	Wewnątrz komórek (K.)		
APPJ	Powietrze	Kompletne L-15, Kompletne DMEM/F12	Ludzki piersi MDA-MB-231, MDA-MB-453	(K.) H <sub>2</sub> DCFDA dla Reaktywnych form tlenu	Li i wsp., 2017
APPJ	He	Kompletne RPMI 1640	-	(C.) MAK165-1KT kit pomiarowy dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Jezeł i wsp., 2020
DBD	He	Kompletne DMEM	-	(C.) Kolorymetryczna metoda Indygo dla O <sub>3</sub>	Mokhtari i wsp., 2019
APPJ	Powietrze	Kompletne RPMI 1640 i DMEM	-	(C.) Odczynnik Griessa dla NO <sub>2</sub> ; metoda oparta na oranżu ksylenolowym dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Almeida-Ferreira i wsp., 2022
APPJ	He	Kompletne RPMI 1640	Mysi czerniak B <sub>16</sub> -BL <sub>6</sub>	(C.) CBA dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; Spektrofotometria UV-Vis dla NO <sub>2</sub> ; (K.) DCFH-DA dla Reaktywnych form tlenu	Xu i wsp., 2018
APPJ	Ar	Roztwór tryptofanu w PBS	Mysi czerniak B <sub>16</sub>	(C.) CBA dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (K.) Dihydroetydyna dla O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ; CBA dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Li i wsp., 2018
DBD	Syntetyczne powietrze lub O <sub>2</sub>	Kompletne DMEM	Ludzki trzustki PANC-1 i ludzki czerniak Hmell	(K.) Test nadlenku wodoru Spectroquant dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , odczynnik Griessa dla NO <sub>2</sub> ; (C.) H <sub>2</sub> DCFDA dla Reaktywnych form tlenu	Azzariti i wsp., 2019
S-DBD	Air	Zawiesina komórkowa w PBS	Ludzki czerniak A375	(K.) Amplex Red Nadtlenek wodoru/Peroksydaza kit pomiarowy dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , kolorymetryczny kit pomiarowy azotan/azotyny (Cayman) dla NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (K.) CM-H <sub>2</sub> DCFDA dla ROS, DAF-FM dla NO	Xia i wsp., 2019
kINPen	Ar	Kompletne RPMI 1640, PBS	-	(C.) Amplex UltraRed odczynnik dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Rodder i wsp., 2019
APPJ	Powietrze i N <sub>2</sub>	RPMI 1640, MEM	-	(C.) QuantiChrom Nadtlenek kit pomiarowy dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , QuantiChrom Tlenek azotu- kit pomiarowy dla NO <sub>2</sub> i NO <sub>3</sub>	Yadav i wsp., 2020
APPJ	He+O <sub>2</sub>	Kompletne DMEM	Ludzki glejak mózgu U87	(K.) CM-H <sub>2</sub> DCFDA dla Reaktywnych form tlenu, Peroksyazotyn (ONOO <sup>-</sup> ) kit pomiarowy (Cell Technology)	Cheng i wsp., 2014

Prace podejmujące się tematyki wykorzystania aktywności biologicznej układów zimnych plazm atmosferycznych do degradacji antybiotyków z roztworów wodnych, wraz z obniżeniem zjawiska wielolekowej oporności wśród patogenów wykorzystują liczne techniki badawcze. Pierwszą techniką badawczą wykorzystywaną niemalże we wszystkich badaniach nad degradacją antybiotyków z udziałem zimnej plazmy pozostają metody bazujące na wysokosprawnej chromatografii cieczowej lub chromatografii gazowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC, Gas chromatography -GC*). Badania te pozwalają na dokładne oznaczenie zawartości farmaceutyków w roztworach wodnych zarówno przed jak i po traktowaniu zimną plazmą. Poprzez porównanie stężenia antybiotyku w próbkach traktowanych i nietraktowanych, wyznaczany jest parametr efektywności rozkładu, wyrażony najczęściej w procentach. Kolejną równie często wykorzystywaną techniką analityczną jest spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry – MS*), która swoje zastosowanie w tego typu badaniach znalazła przy określaniu produktów rozkładu w roztworach wodnych antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy. Badania te umożliwiają analizę mechanizmu rozkładu danego farmaceutyku, podając powstałym w trakcie produkty pośrednie. Istotnym parametrem zawierającym w pracach wykorzystujących układy zimnej plazmy do degradacji antybiotyków jest stopień mineralizacji, który wyznaczany jest z pomocą analizatorów całkowitej zawartości węgla organicznego (ang. *Total Organic Carbon, TOC*). Dla pełniejszego określenia mechanizmów oddziaływania zimnej plazmy z cząsteczkami antybiotyków w roztworach wodnych, często przeprowadzana jest analiza RFT i RFA. W procesach degradacji antybiotyków w skutek działania zimnej plazmy największą rolę upatruje się w aktywności RFT, w szczególności ozonu ( $O_3$ ), rodników hydroksylowych ( $OH^\bullet$ ), nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Podobnie jak zostało to opisane dla badań skupiających się wokół wykorzystania zimnej plazmy w zwalczaniu raka piersi i skóry,  $H_2O_2$  oznaczany jest najczęściej z wykorzystaniem technik kolorymetrycznych, w szczególności jodku potasu (KI), związków soli tytanu bądź metawanadanu amonu ( $NH_4VO_3$ ). Kwestie oznaczenia stężeń  $OH^\bullet$  i  $O_3$  są problematyczne dla oznaczeń kolorymetrycznych, w związku z czym najczęściej wykorzystywane są pomiary maskujące aktywność tych reaktywnych form. W tym celu, do wodnych roztworów antybiotyków, wprowadzane są związki maskujące tj. alkohol etylowy bądź butylowy dla maskowania  $OH^\bullet$ , a następnie takie roztwory poddawane są procesowi degradacji z pomocą zimnej plazmy. Uzyskane roztwory post-plazmowe analizowane są następnie pod kątem efektywności rozkładu farmaceutyku. Dzięki świadomości zamaskowania aktywności rodników  $OH^\bullet$ , w przypadku otrzymania mniejszego stopnia



degradacji możemy podsumować, że ta konkretnie RFT w wysokim stopniu jest zaangażowana w procesy rozkładu. Dla pomiarów RFA, doświadczenia z użyciem związków maskujących przeprowadzane są rzadko, skupiając się głównie nad wykorzystaniem komercyjnie dostępnych kitów pomiarowych, stanowiących zaplecze metod kolorymetrycznych. Dla pełniejszego wglądu w techniki badawcze, wykorzystywane do określenia stężeń RFT i RFA w roztworach wodnych antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy, proszę zapoznać się z Tabela 4.

**Tabela 4.** Metody wykorzystywane do określania i oznaczania RFT i RFA w wodnych roztworach farmaceutyków napromieniowanych zimną plazmą dla badań degradacji antybiotyków i eliminacji wielolekowe oporności patogenów bakteryjnych.

Źródło zimnych plazm	Gaz plazmotwórczy	Reaktywne formy tlenu/ azotu		Ref
		Ciekłe (C.)	Techniki badawcze	
<b>FE-DBD</b>	Tlen	Ofloksacyna, Amoksycyklina, Ampicylina [100 mg dm <sup>-3</sup> ]	UV/Vis dla chemicznego zapotrzebowania na tlen, detektor ozonu dla O <sub>3</sub>	Magurcanu i wsp., 2011
<b>DBD</b>	Powietrze	Ofloksacyna, Cyprofloksacyna [25 mg dm <sup>-3</sup> ]	KI dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Odczynnik Griessa dla NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Spectroquant kit pomiarowy dla NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; związki alkoholu butylowego i CCl <sub>4</sub> maskujące rodniki OH <sup>•</sup>	Sarangapani i wsp., 2019
<b>FE-DBD</b>	Powietrze	Ampicylina [6,988 mg dm <sup>-3</sup> ]	Brak pomiarów	Smith i wsp., 2018
<b>DBD</b>	Powietrze	Enrofloksacyna [40 mg dm <sup>-3</sup> ]	2,2,6,6-Tetrametylopiperydyna (TEMP) dla maskowania tlenu singletowego <sup>1</sup> O <sub>2</sub> i D-Mannitol dla maskowania rodników OH <sup>•</sup>	Aggelopoulos i wsp., 2020
<b>Korona i Korona w bąbelkach</b>	Powietrze	Oksytetracyklina, Doksycyklina [50 mg dm <sup>-3</sup> ]	Elektroda dla chemicznego zapotrzebowania na tlen, Elektroda dla konduktancji, Macherey-Nagel QuatoFix peroxide kit pomiarowy dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	El Shaer i wsp., 2020
<b>Korona z kompozytem TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></b>	Powietrze	Chloroamfenikol [20 mg dm <sup>-3</sup> ]	Metoda jodometryczna dla O <sub>3</sub> , kwas salicylowy dla maskowania rodników OH <sup>•</sup> , metoda siarczanu tlenku tytanu IV dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Guo i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Powietrze	Cyprofloksacyna [10 mg dm <sup>-3</sup> ]	PhotoLab 6100 – 18789 kit pomiarowy dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , PhotoLab 6100 – 00607 kit pomiarowy dla O <sub>3</sub> , PhotoLab 6100 – 09713 kit pomiarowy dla NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hu i wsp., 2019
<b>DBD</b>	Powietrze	Paracetamol [25 mg dm <sup>-3</sup> ], Ceftriakson [5 mg dm <sup>-3</sup> ]	Brak pomiarów	Iervolino i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Powietrze	Tetracyklina, Sulfadiazyna, Cyprofloksacyna [50 mg dm <sup>-3</sup> ]	KI dla O <sub>3</sub> , Szczwian potasu i tytanu dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Kwas 2-hydroksytereftalowy dla rodników OH <sup>•</sup>	Li i wsp., 2020
<b>APGD</b>	Powietrze	Doksycyklina [54,5 mg dm <sup>-3</sup> ]	KI ze skrobią dla całkowitej RFT, Metawanadan amonu dla H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Hanna HI 96707 kit pomiarowy dla NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> i Hanna HI 96728 kit pomiarowy dla NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Dzimitrowicz i wsp., 2022

### 4.3. Dawka promieniowania zimną plazmą a uzyskiwana odpowiedź biologiczna

Celem przybliżenia istotności uwzględnienia sposobu jak i długości zastosowania źródła zimnej plazmy do traktowania poszczególnych linii komórkowych, przytoczone zostaną wyniki prac eksperymentalnych z wykorzystaniem nowatorskiego układu reakcyjnego, który zostanie wykorzystany do dalej opisanych prac zrealizowanych na potrzeby przedstawianej rozprawy doktorskiej.

Przenośny układ reakcyjno-wyładowczy, na potrzeby prowadzonych prac został skonstruowany i zoptymalizowany (Dzimitrowicz i wsp., 2020) przez zespół badawczy, m.in. z moim udziałem, z wykorzystaniem metodologii odpowiedzi powierzchni, wykorzystując proces optymalizacji Box-Behnken. Szczegółowy opis omawianego układu reakcyjno-wyładowczego został zaprezentowany i zawarty w dalszej części sporządzonej rozprawy. Celem tak dobranego planu prowadzenia doświadczeń było ustalenie parametrów prądowo-napięciowych wykorzystanych do inicjacji zimnej plazmy na skutek wyładowań barierowych, skutkującą wytworzeniem stożek plazmy o temperaturze gazu poniżej 37 °C, zalecanej do zastosowań biomedycznych. Parametry operacyjne, wykorzystane na potrzeby przeprowadzenia procesu optymalizacji zostały dobrane w sposób następujący: Parametr A, odpowiadający częstotliwości modulacji napięcia z jego nastawami 2,10; 2,45 i 2,80 kHz. Parametr B, prezentujący wypełnienie z nastawami 25, 50 i 75 %. Parametr C – prędkość gazu wyładowczego, w tym przypadku Helu, ustaloną na wartości 4,0; 7,5 bądź 11,0 dm<sup>3</sup>/min. Tak określone parametry z wykorzystaniem procesu optymalizacji Box-Behnken doprowadziło do zaproponowania 15 kolejnych zbiorów parametrów A + B + C operacyjnych, wykorzystanych do generacji zimnej plazmy w wyniku wyładowań barierowych. Zadając wymaganą odpowiedź dobranych parametrów wyładowczych jako temperaturę stożka zimnej plazmy poniżej 37°C, przygotowany model statystyczny doprowadził do uzyskania nastaw: częstotliwości modulacji napięcia 2,10 kHz, wypełnienie 74 % i prędkości przepływu gazu wyładowczego 10,6 dm<sup>3</sup>/min. Autorski układ reakcyjno-wyładowczy, wykorzystując uzyskane na drodze analizy statystycznej parametry operacyjne został wykorzystany do bezpośredniego napromieniowania ludzkich linii nienowotworowych tj. linia komórkowa keratynocytów HaCaT; fibroblasty MSU-1.1; linia komórkowa skórno-śródbłonka HSkMEC.2. Wymienione modele *in vitro* zawieszono w 0,85 % (m/v) roztworze NaCl, uzyskując gęstość 1 x 10<sup>6</sup> komórek/cm<sup>3</sup>. Przygotowana zawiesina komórkowa w probówkach eppendrofa została ulokowana 15 mm

poniżej końca pióra plazmowego, eksponując następnie na źródło zimnej plazmy w czasie 10, 30, 60, 90, 180, 270 i 360 s. Celem tak dobranej metodologii prowadzenia badań z wybranymi modelami *in vitro* było określenie dawki promieniowania zimnej plazmy, mogącej wesprzeć procesy gojenia ran, uzyskując pozytywny wpływ na zdolności do proliferacji, migracji a także angiogenezy.

Zdolności do proliferacji w.w. modeli *in vitro* tj. komórek linii HSkMEC.2, HaCaT, MSU-1.1. wystawionych na bezpośrednią ekspozycję zimnej plazmy w czasie 10, 30, 60 i 90 s zostały zbadane z wykorzystaniem testu MTT, przeprowadzonego po 2, 5 i 7 dniach od rozpoczęcia eksperymentu. W początkowym etapie prowadzonego badania stwierdzono, że dla czasów ekspozycji przekraczających 90 s, odnotowano wyraźne zahamowanie proliferacji komórek i wystąpienie śmierci apoptotycznej.

Analizując zaprezentowane wyniki analiz testu MTT, wzrost zdolności do proliferacji wspomnianych linii komórkowych był istotny dla czasów ekspozycji nieprzekraczających 30 s. W poszczególnych przypadkach, dla czasów ekspozycji 60 i 90 s stwierdzono zahamowanie żywotności komórkowej. Optymalny czas bezpośredniego napromieniowania źródłem zimnych plazm atmosferycznych wynoszący 30 s, przyczynił się do uzyskania znaczącego wzrostu ruchliwości omawianych modeli biologicznych. Odnotowano ponadto znaczny przyrost liczby wytworzonych rurek pseudo-naczyń krwionośnych po 30 sekundowej ekspozycji komórek linii HSkMEC.2 na źródło zimnej plazmy. Liczba ta znacząco malała wraz z wydłużeniem czasu traktowania. W toku przeprowadzonych badań biologicznych, potwierdzono możliwość wykorzystania źródła zimnej plazmy generowanego w autorskim układzie reakcyjno-wyładowczym, celem uzyskania zwiększonej zdolności do proliferacji, migracji a także angiogenezy. Jednakże, uzyskiwana odpowiedź biologiczna w głównej mierze zależała od doboru odpowiedniej dawki napromieniowania tj. czasu ekspozycji na źródło zimnej plazmy. Obserwowany korzystny efekt aktywacji komórek linii HSkMEC.2, MSU-1.1 i HaCaT był prawdopodobnie związany z generacją RFT i RFA na skutek oddziaływania stożka zimnej plazmy z 0,85 % roztworem NaCl. Z przeprowadzonych oznaczeń stwierdzono, że wraz z wydłużeniem czasu traktowania wzrastało stężenie RFT i RFA, uzyskując dla najdłuższego czasu ekspozycji ponad 10 mg/dm<sup>3</sup> nadtlenku wodoru, a stężenie NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wyniosło poniżej 5 mg/dm<sup>3</sup>. Odnosząc uzyskane wyniki do obserwowanego efektu biologicznego względem wybranych modeli biologicznych, odnotowany wzrost zdolności do proliferacji, migracji a także angiogenezy związany jest najprawdopodobniej z aktywnością nadtlenku wodoru.

Bezpośrednie napromieniowanie źródłem zimnych plazm przyczynia się do zwiększonego stresu oksydacyjnego traktowanych komórek. Stres oksydacyjny, zależnie od poziomu jego wystąpienia może prowadzić do aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, wspomagających tym samym procesy gojenia ran. Mając na uwadze obserwowany wpływ wybranych dawek zimnej plazmy na komórki linii HSkMEC.2, MSU-1.1 i HaCat, jesteśmy w stanie modulować uzyskiwaną odpowiedź biologiczną poprzez odpowiednie dobranie warunków prowadzenia procesu, wpływając tym samym na stężenia poszczególnych RFT i RFA, które dostając się do wnętrza komórek doprowadzają do aktywacji określonych ścieżek sygnałowych, tym samym zapewniając zróżnicowaną odpowiedź biologiczną.

#### **4.4. Pośrednie traktowanie komórek nowotworowych zimnymi plazmami atmosferycznymi**

Rozpatrując sposób pośredni traktowania komórek linii nowotworu piersi i skóry za pomocą zimnych plazm, głównym czynnikiem dla takiego podejścia prowadzenia badań jest napromieniowanie odpowiednich cieczy (pożywka hodowlana i surowica), a następnie wykorzystanie takich cieczy jako nośników RFT i RFA (Chauvin i wsp., 2017). Celem osiągnięcia celu tj. wytworzenia reaktywnych składników podczas traktowania zimną plazmą, kilka układów reakcyjno-wyładowczych zimnych plazm zostało wykorzystanych, stosując APPJ (Li i wsp., 2018), DBD (Daeschlein i wsp., 2018; Azzariti i wsp., 2019, Subramanian i wsp., 2020; Jezeł i wsp., 2020; Mokhtari i wsp., 2019; Xiang i wsp., 2018) lub urządzenie biomedyczne kINPen (Rodder i wsp., 2019). Obok licznie dostrzegalnych zalet pośredniego traktowania zimnych plazm względem komórek czerniaka, występuje kilka ograniczeń, które krytycznie zostały przedstawione i omówione w wymienionych pracach (Li i wsp., 2018; Azzariti i wsp., 2019; Rodder i wsp., 2019). Pierwsza praca omawiająca pośrednie wykorzystanie zimnej plazmy względem nowotworu piersi, skupiła się nad potraktowaniem wody dejonizowanej w układzie z wyładowaniami DBD, operowanym w atmosferze powietrza. Aktywność biologiczna wody poddanej działaniu zimnej plazmy została zbadana względem komórek linii MDA-MB-231 a także mysich fibroblastów MMF. Woda przygotowana w układzie stacjonarnym w objętości 20 mL, została napromieniowana w czasie do 20 min. Przeprowadzając pomiary żywotności komórek wystawionych na działanie tak potraktowanej wody dejonizowanej, stwierdzono znaczącą redukcję żywotności komórek linii MDA-MB-231 a także zaburzenia aktywności komórek linii MMF. Obserwowany wpływ wody aktywowanej zimną plazmą został przypisany w głównej mierze obecności RFA ( $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$ ) i RFT ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nie zaś

znaczącemu spadkowi wartości pH. Na uwagę zasługuje również fakt, że wytworzona w ten sposób woda dejonizowana zachowała swoją aktywność przez 14 dni podczas przechowywania w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  (Subramanian i wsp., 2020). Praca zespołu Jezeh (Jezeh i wsp., 2020) wykorzystwała plazmowy dżet generowany w układzie DBD. Zimna plazma generowana w atmosferze mieszaniny helu z tlenem została wykorzystana do bezpośredniego a także pośredniego traktowania komórek ludzkiego nowotworu piersi (MDA-MB-231) i szyjki macicy (HeLa), jako kontrolę wykorzystując komórki ludzkiego fibroblastu. Bezpośrednie traktowanie przeprowadzono poprzez zawieszenie komórek w  $200\ \mu\text{L}$  kompletnej pożywki DMEM, a następnie napromieniowanie w czasie do 5 min. Pośrednie traktowanie przebiegało analogicznie, poddając traktowaniu objętość pożywki hodowlanej pozbawionej komórek. Zarówno podczas traktowania bezpośredniego jak i pośredniego, po 48 godzinach od ekspozycji na źródło zimnej plazmy, zaobserwowano znaczącą redukcję żywotności komórek linii MDA-MB-231 i HeLa. Spadek aktywności mitochondrialnej komórek nowotworowych wzrastał wraz z wydłużeniem czasu traktowania. W obydwu sposobach traktowania zimną plazmą odnotowano znaczący spadek żywotności komórek ludzkiego fibroblastu. Traktowanie bezpośrednio odnosząc do pośredniego przyczyniło się do większej ekspresji białek apoptotycznych – Kaspazy 3 i Kaspazy 8, wskazując na indukcję apoptozy wskutek działania zimnej plazmy atmosferycznej. Potwierdzone zostało wytworzenie większych ilości nadtlenu wodoru w wyniku traktowania bezpośredniego, przekładając się na zwiększoną indukcję śmierci apoptotycznej u komórek nowotworowych (Jezeh i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przez zespół Mokhtari (Mokhtari i wsp., 2019) skupiły się nad wykorzystaniem zimnej plazmy atmosferycznej generowanej w wyniku wyładowań DBD w atmosferze helu. Uformowany dżet zimnych plazm został użyty do potraktowania niewielkich objętości kompletnej DMEM. Przygotowane pożywki hodowlane aktywowane plazmą w różnym czasie zostało wykorzystane do dalszych badań względem komórek linii ludzkiego nowotworu piersi (MCF-7 i SKBR3), ludzkiego nowotworu płuc (A-549), ludzkiego nowotworu jelita grubego (SW742), ludzkiego nowotworu trzustki (ASPC-1), ludzkiego nowotworu mięsaka (G-292). Jako modele nienowotworowe wybrano komórki linii MCF-10A i FMGB-1. Największą wrażliwość na działanie pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą stwierdzono dla komórek linii SKBR3, najmniejszą natomiast w przypadku komórek linii SW742. Komórki nienowotworowe wykazały największą oporność na działanie układu zimnych plazm spośród badanych modeli biologicznych. Obserwowana aktywność biologiczna zimnej plazmy została przypisana w głównej mierze wytworzonemu

ozonowi, którego stężenie w pożywce DMEM wzrastało wraz z czasem traktowania (Mokhtari i wsp., 2019). Kolejna istotna praca poruszająca badania nad wykorzystaniem zimnej plazmy w traktowaniu komórek ludzkiego nowotworu piersi została opisana przez zespół Xiang (Xiang i wsp., 2018). Wykorzystując plazmowy dżet generowany w wyniku wyładowań DBD w atmosferze DBD, napromieniowano objętość 2 mL kompletnej pożywki DMEM i mieszaninę pożywek DMEM z F-12. Wytworzone w ten sposób pożywki hodowlane zostały wykorzystane do badań nad komórkami ludzkiego nowotworu piersi (MDA-MB-231, MDA-MB-468 i MCF-7) a także komórkami nienowotworowymi MCF-10A. Wraz z wydłużeniem czasu napromieniowania pożywki hodowlanej odnotowano znaczący spadek żywotności komórek nowotworu piersi zaliczanego do potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231, MDA-MB-468), podczas gdy aktywność mitochondrialna komórek linii MCF-7 i MCF-10A znacząco wzrosła. Pożywka DMEM aktywowana zimną plazmą przyczyniła się ponadto do znacznej indukcji apoptozy wyłącznie w komórkach linii MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Stwierdzone zostało ponadto selektywne zmniejszenie zdolności migracji komórek linii MDA-MB-231 i MDA-MB-468 poddanych działaniu pożywki DMEM napromieniowanej zimną plazmą, podczas gdy pozostałe rozpatrywane linie komórkowe nie wykazały zmian w ruchliwości. Rak potrójnie ujemny piersi często wiązany jest ze wzmożoną aktywnością kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK i NF- $\kappa$ B), potwierdzając że aktywność pożywki DMEM poddanej działaniu zimnej plazmy doprowadziła do znaczącego obniżenia poziomu fosforylacji kinazy domeny N-końcowej białka Jun (JNK) i p65, jednocześnie nieznacznie wpływając na ekspresję białka p38 w komórkach linii MDA-MB-231. Wywarta odpowiedź biologiczna została przypisana obecności nadtlenu wodoru w pożywkach DMEM i DMEM z domieszką F-12, gdzie najwyższe stężenie potwierdzono dla pożywki DMEM (Xiang i wsp., 2018).

Pierwsza praca wybrana do omówienia, przedstawia pośrednie zastosowanie zimnych plazm względem komórek czerniaka, gdzie przeprowadzono napromieniowanie tryptofanu, następnie sprawdzając efekt tak przygotowanego roztworu na żywotność komórek mysiego czerniaka (B16) i komórek mysich fibroblastów (L929) (Li i wsp., 2018). W układzie APPJ wyładowania były generowane z argonu wykorzystując prąd o częstotliwościach radiowych. Tak inicjowane wyładowania wykorzystano do napromieniowania roztworu tryptofanu, a następnie sprawdzając w jaki sposób wytworzone w tym procesie pochodne hydroksylowe, wodorotlenków i N-formylo-L-kinureiny oraz innych RFT. Stwierdzono znaczny wzrost stężenia nadtlenu wodoru wraz z wydłużeniem czasu traktowania zimną

plazmą, przyczyniając się do efektywnego obniżenia żywotności komórek linii B16. Przeciwny efekt uzyskano dla skróconego czasu traktowania zimną plazmą, doprowadzając do zwiększenia proliferacji komórek. Przeprowadzono porównanie wykorzystania zimnej plazmy z użyciem przygotowanego roztworu nadtlenu wodoru, który doprowadził do nieznacznego wpływu na komórki nowotworowe. W pracy tej potwierdzona została wysoka selektywność oddziaływania roztworu tryptofanu aktywowanego zimną plazmą na linie mysiego czerniaka i komórki fibroblastów L929. Selektywność oddziaływania napromieniowanego plazmą tryptofanu na komórki mysiego czerniaka prawdopodobnie jest związana z aktywnością oksydazy NADPH, prowadząc do wewnątrzkomórkowej zmiany stężenia RFT. Wykazano znacznie zwiększoną wrażliwość komórek nowotworowych na traktowanie roztworem tryptofanu poddanego działaniu zimnych plazm w porównaniu z komórkami nienowotworowymi (Li i wsp., 2018). Innym przykładem realizowanych prac przez zespół Azzariti (Azzariti i wsp., 2019), gdzie szczególną uwagę przyłożono do indukcji immunogennej śmierci komórkowej (*ang. Immunogenic cell death, ICD*) w populacji komórek linii ludzkiego czerniaka złośliwego (Hmel1), komórek nowotworu trzustki (PANC-1) i komórek nabłonka gruczołu sutkowego (HBL) poprzez RFT zawarte w cieczy poddanej działaniu zimnych plazm. Rozpatrywane modele biologiczne zostały wybrane na podstawie ich pochodzenia z próbek pobranych z biopsji ludzkiego czerniaka, do których były przypisane zmutowane białka Arg-24 Cys, zapobiegające wiązaniu białek CDK4 do P16A. Napromieniowanie cieczy zimnymi plazmami przeprowadzono z użyciem komercyjnego urządzenia PetriPlas+, wykorzystującym do wyładowań powietrze syntetyczne bądź tlen. W tak przygotowanym roztworze stężenie nadtlenu wodoru wzrastało wraz ze zwiększeniem gęstości energii, podczas gdy stężenie jonów  $\text{NO}_2^-$  znajdowało się poniżej limitu detekcji dla wybranej techniki badawczej (wykorzystując jako gaz wyładowczy tlen). Inkubując wybrane modele biologiczne przez 48 godzin w cieczy aktywowanej zimną plazmą, uzyskano znaczną redukcję żywotności komórek, a największą wrażliwość wykazały komórki linii Hmel1. Oznaczając żywotność komórek z wykorzystaniem testu MTT potwierdzono znaczny wpływ względem komórek Hmel1 poddanych działaniu cieczy aktywowanej zimną plazmą generowaną w atmosferze tlenu w czasie 3 min. Różnice w uzyskiwanej odpowiedzi względem rozpatrywanych modeli biologicznych zostały powiązane z najwyższym stężeniem RFT wewnątrz komórek linii Hmel1. Z drugiej strony, linie komórkowe Hmel1 i PANC-1 wykazały podwyższoną podatność w przypadku obecności białek chaperonu CTR (potwierdzonych analizą cytometrii przepływową, FCM) w otoczeniu



zewnątrkomórkowym i uwolnieniu molekuł ATP z uszkodzonych komórek, potwierdzając tym samym wystąpienie ICD. Stwierdzono również wysoką niewrażliwość komórek linii HBL na indukcję ICD. Analiza cytometrią przepływową wybranych modeli biologicznych, które były poddane działaniu cieczy aktywowanej zimną plazmą przez czas 24 i 48 godzin wykazała, że jedynie komórki nowotworowe uległy śmierci apoptotycznej. Warto odnotować, że w omówionej pracy po raz pierwszy zaprezentowano wyniki pośredniego traktowania komórek nowotworowych z wykorzystaniem układu opartego o wyładowania barierowe inicjowane w zamkniętym układzie (Azzariti i wsp., 2019). Jednakże metodologia prowadzonych prac, omówionych w tej publikacji zawiera pewne ograniczenia, związane ze stosunkowo długim czasem inkubacji w cieczy poddanej działaniu zimnych plazm, co może nieść za sobą problemy w klinicznym wykorzystaniu. Innym spojrzeniem na poruszaną problematykę badawczą zostało zaprezentowane w pracy zespołu Rodder (Rodder i wsp., 2019), gdzie uwaga została skupiona na modulacji komórek odpornościowych, a także markerów profilowych obecnych w komórkach złośliwych mysiego czerniaka B16-F10 poddanych działaniu zimnych plazm. W tym celu wykorzystano komercyjne urządzenie kINPen (wykorzystując argon jako gaz wyładowczy), aktywując roztwór PBS oraz kompletną pożywkę RPMI 1640 (z dodatkiem surowicy płodowej cieląt, FCS). Zawiesina komórkowa aktywowana w czasie 120 s została poddana analizie pod względem aktywności 12 różnych mysich cytokin i chemokin. Ustalono, że w wybranych warunkach komórki czerniaka wykazały znaczącą nadekspresję TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL4 i IL-1 $\beta$ . Ponadto wywołane zimnymi plazmami uszkodzenia komórkowe były obserwowane 6 godzin po aktywacji zimnymi plazmami w czasie 120 s, najprawdopodobniej poprzez zwiększoną ekspresję cząstek powiązanych z uszkodzeniami tj. ATP i CXCL1. W grupie doświadczalnej, gdzie limfocyty nieaktywne zostały poddane napromieniowaniu, odnotowano nadekspresję IL-10, CCL4, IL-4, IL-12 i IL-1 $\beta$ . Celem podsumowania, traktowanie zimnymi plazmami przyczyniło się do obniżenia żywotności komórek, a także doprowadziło do odpowiedzi zapalnej w obrębie nowotworu i aktywacji leukocytów prozapalnych. Podjęto się również aktywacji limfocytów po traktowaniu zimnymi plazmami i przeprowadzeniu pomiarów sygnalizacji wapniowej jak również fosforylacji kinazy Erk1/2. Wykazano, że limfocyty T wystawione działaniu zimnych plazm i komórek czerniaka napromieniowanych zimnymi plazmami doprowadzając do znacznego wzrostu poziomu wapnia. Z drugiej strony napromieniowanie zimnymi plazmami makrofagów nie zmieniło poziomu wapnia. Limfocyty T po 1 i 4 godzinach od napromieniowania zimnych plazm wykazały nieznaczny wzrost poziomu fosforylowanych

Erk1/2. Potwierdzono, że komórki odpornościowe zostały poddane stymulacji z wykorzystaniem źródeł zimnych plazm. Ostatnim etapem prowadzonych prac, opisano proces aktywacji komórek monocytów, które były inkubowane wraz z komórkami czerniaka poddawanymi napromieniowaniu zimnymi plazmami. Stwierdzono zwiększoną ekspresję markerów powierzchniowych CD28 dla obydwu grup limfocytów T tj. CD4+ i CD8+ po ich inkubacji z aktywowanymi zimnymi plazmami komórek czerniaka. Zaprezentowane wyniki zdają się jednoznacznie wskazywać na odpowiedź zapalną komórek odpornościowych, które zostały wystawione na działanie komórek nowotworowych aktywowanych zimnymi plazmami. Warto również zaznaczyć, że potwierdzono wpływ obecności surowicy FCS w kompletnej pożywce hodowlanej na zmniejszone stężenie wytwarzanego nadtlenu wodoru dla krótszych czasów naświetlenia, natomiast stężenie to wzrastało wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji. Efekt maskowania surowicy na wytwarzanie  $H_2O_2$  został dodatkowo potwierdzony poprzez uzyskanie zwiększonej żywotności traktowanych komórek wraz ze zwiększoną domieszką FCS. Podobną zależność uzyskano wraz z przeprowadzonymi pomiarami testu zarysowania, gdzie wykazano, że obecność FCS w pożywce poddanej działaniu zimnych plazm nie wykazuje znacznego zahamowania mobilności komórek. Jednakże w opinii autorów zaprezentowanej pracy, migracja komórkowa zostaje znacząco zahamowana wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na źródło zimnych plazm (Rodder i wsp., 2019). Należy nadmienić, że w prezentowanych zdjęciach testu zarysowania dla wszystkich grup poddanych traktowaniu zimnymi plazmami, dystans pomiędzy warstwami osadzonych komórek był mniejszy o 60  $\mu m$  w porównaniu z komórkami grupy nietraktowanej. Takie różnice w prezentowanych zarysowaniach mogły być powiązane ze zmniejszeniem zdolności do przywierania do naczyń hodowlanych komórek wystawionych na ekspozycję zimnych plazm, a przez to łatwiejszemu odrywaniu w trakcie nanoszenia zarysowań powierzchni warstwy komórkowej. Jednakże brak normalizacji lub uwzględnienia wielkości naniesionych zarysowań mógł doprowadzić do zakłóceń nanoszonych obliczeń i prezentacji wyników.

Niezwykle zajmujące i niestereotypowe podejście do prowadzonych prac zostało zaprezentowane przez zespół Daeschleina (Daeschlein i wsp., 2018), gdzie przeprowadzono pośrednie traktowanie komórek czerniaka. Celem zahamowania proliferacji komórek czerniaka, zimne plazmy zostały wykorzystane do traktowania roztworu PBS, a następnie bleomycyna, paklitaksel lub dakarbazyna jako chemoterapeutyki

zostały zaaplikowane. Wykazano, że komórki mysiego czerniaka B16-F10 traktowane cieczą aktywowaną plazmą wraz z paklitakselem doprowadziły do największego zaburzenia żywotności komórkowej (98%). Ponadto, grupa badawcza z PBS napromieniowana zimnymi plazmami wraz z bleomycyną wykazała 82% redukcję żywotności komórek linii A375. Zwiększoną efektywność traktowania uzyskano dla komórek glejaka wielopostaciowego poddanego działaniu cieczy aktywowanej plazmą wraz z paklitakselem – wykazując 96% redukcję. Odnotowano również dodatkowy wzrost skuteczności takiego podejścia wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji komórek na mieszaninę cieczy napromieniowanej wraz z chemoterapeutykami. Dla grup badawczych, gdzie wykorzystano jedynie roztwór PBS napromieniowany zimną plazmą, co doprowadziło do mniejszej redukcji żywotności komórek porównując do grupy wspomaganej działalnością chemoterapeutyków. Możliwym wytłumaczeniem obserwowanych zależności może być wytwarzanie RFT i RFA w roztworze PBS po traktowaniu zimną plazmą w ilości wystarczającej do wprowadzenia komórek nowotworowych do stanu, wykazującego zwiększoną podatność na działanie chemoterapeutyków (Yan i wsp., 2018). Możliwości aplikacyjne reaktywnych form tlenu i azotu wytwarzanych w cieczach poddanych działaniu zimnych plazm powinny być rozpatrywane jako wysoce obiecująca alternatywa do tradycyjnych terapeutyków zwalczających czerniaka. Niewątpliwym atutem tak przygotowywanych cieczy pozostaje łatwość ich przechowywania i aplikacji jak również perspektywy ich wykorzystania jako środków zwiększających efektywność najczęściej stosowanych kuracji przeciwko czerniakowi. Jednakże wspomniane drogi wykorzystania cieczy aktywowanych zimnymi plazmami powinny być dokładnie zbadane pod względem ewentualnych efektów ubocznych wewnątrz nowotworów i ludzkiego organizmu.

#### **4.5. Bezpośrednie traktowanie komórek nowotworowych zimnymi plazmami atmosferycznymi**

Rozpatrując dalsze badania nad efektywnością wykorzystania zimnej plazmy wobec komórek ludzkiego nowotworu piersi, przeprowadzono podsumowanie doniesień literaturowych związanych z mechanizmami towarzyszącymi oddziaływaniom ze źródłami zimnej plazmy. Podejmowane próby wytłumaczenia mechanizmu molekularnego wywierającego zmiany w aktywności komórkowej pod wpływem zimnej plazmy, zostały uwzględnione w kilku przypadkach. W pracach zrealizowanych przez Chang ze współpracownikami (Chang i wsp., 2014), przeprowadzono badania nad bezpośrednim

traktowaniem zimną plazmą typu plazmowy dżet komórek linii nowotworu płaskonabłonkowego jamy ustnej MSK, QLL1, SCC1483, SCC15 i SCC25. Uzyskane wyniki potwierdziły zatrzymanie w fazie sub-G1 nowotworu, związanego z uszkodzeniem DNA a także inicjacją ścieżki sygnałowej ATM/p53 u komórek linii SCC25 (Chang i wsp., 2014). Badania realizowane na modelach *in vitro* i *in vivo* dotyczących pomiarów gojenia ran, potwierdziły ekspresję kluczowych genów dla tego procesu, głównie IL-6, IL-8, MCP-1, TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 wywołanych traktowaniem z użyciem komercyjnego urządzenia MicroPlaSter, generującego zimną plazmę (Arndt i wsp., 2013). W ramach prac zrealizowanych przez Ma i współpracowników (Ma i wsp., 2014), wykorzystano szeroki wachlarz linii komórkowych tj. HeLa, IMR90, ASC, YD-9, G-361, HCT 116, HCT 116-E6, HT29, H1299, RKO, MES-SA, MES-SA/Dx5, HepG2, LoVo, DLD-1, HCT15, HCT15/CL02, które zostały poddane bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy generowanej w układzie typu plazmowy dżet, dobierając czas ekspozycji od 30 do 60 s, powtarzając traktowanie dziesięciokrotnie, zachowując godzinne interwały. Zaobserwowano indukcję śmierci apoptotycznej wśród komórek nowotworowych wykazujących ekspresję białka p53, poddanych bezpośredniej ekspozycji na zimną plazmę. Obserwowana indukcja śmierci apoptotycznej wynikała w głównej mierze z odpowiedzi na stres oksydacyjny wywoływany poprzez RFT generowane w wyniku aktywności zimnej plazmy (Ma i wsp., 2014). Nieliczne prace na chwilę obecną podejmują zbadanie wpływu zmian epigenetycznych jako efekt oddziaływania z zimną plazmą, takich jak metylacja DNA- będącej głównym czynnikiem onkogenezy. Zważywszy na fakt możliwości RFT do wywołania zmian w poziomie metylacji, czynnik ten jest wart rozpatrzenia podczas aplikacji źródeł zimnej plazmy. W pracach zrealizowanych przez zespół Park (Park i wsp., 2015) przeprowadzone zostały badania skupiające się wokół zmian poziomu metylacji obserwowanych w dwóch modelach biologicznych tj. MCF-7 z ekspresją receptora estrogenowego i MDA-MB-231 z brakiem ekspresji receptora estrogenowego, inicjowanych w wyniku traktowania zimną plazmą. Komórki linii nienowotworowe MCF-10A, MCF-12A i komórki nowotworu piersi, MCF-7, MDA-MB-231 wraz z komórkami nowotworu jelita grubego HCT-15 i nowotworu płuc NCI-H1299 poddano bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy generowanej w wyniku wyładowań barierowych w czasie 30 s, powtarzając traktowanie dziesięciokrotnie z godzinnymi przerwami bądź jednokrotnie przez okres 600 s. Wyniki te w sposób widoczny wskazują na selektywność oddziaływania zimnej plazmy zarówno pod względem typu traktowanych komórek jak i wystąpienia strony sekwencji CpG. Obserwowana w tych badaniach hipometylacja

komórek linii MDA-MB-231 związana była w znacznym stopniu z ich wysoką zdolnością do przerzutowania, przekładając się na wzmożoną obecność populacji komórek apoptotycznych (Park i wsp., 2015). Rozpatrując doniesienia zaprezentowane przez zespół Lin (Lin i wsp., 2020), gdzie komórki linii MDA-MB-231 zostały bezpośrednio potraktowane zimną plazmą w czasie 60 i 120 s, generowaną w wyniku wyładowań barierowych. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu wskazały, że komórki linii MDA-MB-231 poddane napromieniowaniu w czasie 120 s wykazały wzmożoną ekspresję genów i białek HIF-1  $\alpha$  i VEGFA, związanych z procesami angiogenezy. Czynniki te, tak bardzo istotne dla badanej linii komórkowej, przekładają się na zdolności do proliferacji i złośliwości rozpatrywanego modelu biologicznego, wpływając na zahamowanie procesów angiogenezy. Zmiany w ekspresji HIF-1 $\alpha$  i VEGFA były w głównej mierze związane z aktywnością RFT (Lin i wsp., 2020).

W pracach zrealizowanych przez zespół Almeida-Ferreira (Almeida-Ferreira i wsp., 2022) przeprowadzono badania nad bezpośrednim wykorzystaniem źródła zimnej plazmy typu plazmowy dżet względem linii ludzkiego nowotworu piersi MCF-7 (reprezentujący pozytywny receptor hormonalny) i linii HCC1806 reprezentującej potrójnie negatywny rak sutka. Komórki wybranych modeli *in vitro* zostały poddane bezpośredniej ekspozycji w czasie 60 i 120 s. Pomimo stwierdzonego niewielkiego wpływu na cykl komórkowy linii MCF-7, stwierdzono znaczący wzrost populacji komórek w fazie G2/M w porównaniu do komórek nietraktowanych po 60 s napromieniowania. Zaobserwowano ponadto znaczne obniżenie ekspresji w komórkach fazy G0/G1 w porównaniu z komórkami nietraktowanymi po 120 s (Almeida-Ferreira i wsp., 2022).

Kolejnym przykładem badań nad mechanizmem oddziaływania bezpośredniego traktowania źródłem zimnej plazmy jest praca zespołu Bekeschus (Bekeschus i wsp., 2019). Wykorzystując urządzenie medyczne kINPen 11 do generacji zimnej plazmy w atmosferze argonu, przeprowadzono bezpośrednie napromieniowanie komórek ludzkiego nowotworu piersi (MDA-MB-231, MCF-7), ludzkiego nowotworu jelita grubego (SW480), ludzkiego nowotworu prostaty (PC3) i komórki ludzkiego fibroblastu (NCF3). Analizując wyniki pomiarów żywotności komórkowej uzyskane w efekcie testu z resazuryną, komórki nowotworowe po traktowaniu wykazały znaczne spadki żywotności. Szczególnie w przypadku komórek linii MDA-MB-231 i SW480 potwierdzony został wzrost stresu oksydacyjnego wywołanego zimną plazmą, przyczyniając się do obniżenia żywotności komórkowej i w efekcie prowadząc do ich śmierci. W pracy została poruszona kwestia

wzmoczonej ekspresji białek chaperonowych HSP90 w komórkach rakowych, które odgrywają istotną rolę w obniżaniu poziomu stresu oksydacyjnego. Działanie bezpośrednie zimną plazmą doprowadziło w tym przypadku do hydrolizy białek HSP90 i jednocześnie degradacji genu PKD2 (kodującego białko policystynę-2). Mając na uwadze teoretycznie zmniejszoną wrażliwość komórek nowotworowych na stres oksydacyjny wywołany bezpośrednim traktowaniem zimną plazmą, przeprowadzono dodatkowe pomiary na komórkach z wycieszoną ekspresją białka HSP90. Zabieg ten doprowadził do znaczącego obniżenia żywotności komórek MDA-MB-231 i SW480, potwierdzając tym samym istotną rolę białka HSP90 w obniżaniu efektywności wykorzystania zimnej plazmy atmosferycznej (Bekeschus i wsp., 2019). Praca zespołu Liu (Liu i wsp., 2017) skupiła się nad wykorzystaniem źródła APPJ generującego zimną plazmę w atmosferze powietrza do bezpośredniego potraktowania komórek ludzkiego nowotworu piersi MDA-MB-453, MDA-MB-231 a także ludzkiej linii nienowotworowej MCF-10A zawieszonych w objętości 5 mL kompletnej pożywki hodowlanej L-15. Dla dłuższych czasów bezpośredniego traktowania zimną plazmą stwierdzono znaczące obniżenie żywotności komórek raka potrójnie ujemnego piersi MDA-453 i MDA-231, a także komórek linii nienowotworowej MCF-10A. Warto wspomnieć, że wśród komórek nowotworowych, wrażliwszą na zaproponowany sposób traktowania zimną plazmą okazała się linia komórkowa MDA-MB-453. Uzyskane różnice wrażliwości na traktowanie zimną plazmą mogły wynikać zdaniem autorów publikacji z różnic w morfologii poszczególnych linii komórkowych. Przy założeniu, że obserwowany efekt cytotoksyczności wywołany bezpośrednim oddziaływaniem zimnej plazmy wynika z wytworzenia RFT, komórki przed napromieniowaniem zimną plazmą zostały w kolejnym eksperymencie uprzednio potraktowane związkami maskującymi aktywność RFT. W efekcie odnotowano znaczące obniżenie żywotności komórek MDA-MB-231, podczas gdy komórki linii MDA-MB-453 i MCF-10A wykazały zwiększoną oporność na działanie zimnej plazmy (Liu i wsp., 2017). Badania opisane przez zespół Gurung (Gurung i wsp., 2020) wykorzystały układ APPJ generujący plazmowy dżet w atmosferze argonu. Komórki ludzkiego nowotworu piersi MDA-MB-231 zawieszone w niewielkiej objętości kompletnej pożywki DMEM zostały wystawione na bezpośrednią ekspozycję źródła zimnej plazmy. Bezpośrednia ekspozycja komórek raka piersi na źródło zimnej plazmy doprowadziła do ponad 50% redukcji ich żywotności. Obserwowana cytotoksyczność nie była w opinii autorów związana ze skokiem temperatury lub spadkiem wartości pH pożywki hodowlanej poddanej działaniu zimnej plazmy. Ponadto sprawdzono, w jaki sposób powierzchnia naczynia hodowlanego

poddanego bezpośredniemu napromieniowaniu źródłem zimnej plazmy wpłynie na umieszczoną na niej zawieszoną komórek MDA-MB-231. Potraktowana powierzchnia odznaczyła się znacznie zmniejszonym kontem zwilżalności, czego efektem było zwiększenie adhezji komórek, szybkości ich wzrostu a także zdolności do proliferacji (Gurung i wsp., 2020). Przytaczając prace przeprowadzone przez zespół Mirpour (Mirpour i wsp., 2014), układ APPJ generujący dżet zimnych plazm w atmosferze helu użyto do bezpośredniego potraktowania komórek ludzkiego nowotworu piersi MCF-7 i komórek nienowotworowych MCF-10A. Efektywność wykorzystania bezpośredniego napromieniowania komórek została przyrównana dodatkowo z grupą, zawierającą komórki wystawione na działanie farmaceutyku – Doksorubicyny. Zaproponowany sposób traktowania doprowadził do znacznego obniżenia żywotności komórek nowotworu piersi, aczkolwiek spadek ten był mniejszy w porównaniu z działalnością doksorubicyny. W przypadku komórek linii MCF-10A również uzyskano spadek żywotności komórkowej, jednakże był on znacznie mniejszy w porównaniu z grupą potraktowaną doksorubicyną. Wykorzystanie układu APPJ do uformowania dżetu zimnej plazmy w atmosferze mieszaniny helu z tlenem doprowadziło do znacznego zwiększenia efektywności traktowania komórek raka piersi. Spadek żywotności komórek linii MCF-7 dla najdłuższego czasu napromieniowania był większy w porównaniu z komórkami potraktowanymi doksorubicyną. Warto również zwrócić uwagę na zmiany w morfologii prowadzonej hodowli komórkowej raka piersi, jaka nastąpiła po bezpośredniej ekspozycji na plazmowy dżet. W dołkach płytek testowych z komórkami MCF-7 stwierdzono wystąpienie trzech obszarów. Część centralna, nad którą rozchodził się plazmowy dżet, określono mianem obszaru zmarzliny, zawierający przyklejone martwe komórki. Kolejnym obserwowanym obszarem była strefa pozbawiona komórek, z której w wyniku oddziaływania z stożka zimnej plazmy, komórki uległy odklejeniu. Ostatni obszar, zajęty pozostał przez żywe, przyklejone komórki. Ciekawe obserwacje odnotowano poprzez zwiększenie napięcia wyładowania, gdzie wraz ze wzrostem wartości napięcia uzyskano zwiększony spadek żywotności komórek raka piersi, obserwując jednocześnie zwiększoną powierzchnię strefy oderwanych komórek. Na uwagę zasługuje fakt, że głównym efektem bezpośredniego traktowania komórek MCF-7 była indukcja śmierci apoptotycznej, a populacja tych komórek wzrastała tylko do pewnego momentu długości napromieniowania, odnotowując następnie znaczący spadek wraz z wydłużoną ekspozycją na plazmowy dżet (Mirpour i wsp., 2014). Rozpatrując racę przygotowaną przez zespół Adil (Adil i wsp., 2020), wykorzystano układ oparty o wyładowania barierowe, gdzie przeciwelektrodę

stanowi zawiesina komórek w pożywce hodowlanej. Wyładowania zimnej plazmy generowane były w atmosferze powietrza. Jako modele do badania *in vitro* wykorzystano komórki ludzkiego nowotworu piersi tj. AMJ13, MCF-7, komórki mysiego nowotworu piersi AMN3, a jako linie nienowotworową komórki linii HBL. Przeprowadzając pomiary żywotności komórkowej, największą redukcję odnotowano w przypadku komórek linii AMJ13, a najbardziej odporne okazały się być komórki nowotworowe AMN3. W przypadku komórek linii nienowotworowej, uzyskano nieznaczną redukcję ich żywotności. Skutkiem przeprowadzenia bezpośredniego napromieniowania źródłem zimnej plazmy było oderwanie się komórek od powierzchni naczyń hodowlanych. Celem ustalenia możliwych powodów uzyskanej cytotoksyczności zastosowania zimnych plazm, zmierzono zawartość wewnątrzkomórkowych RFT. Spośród komórek nowotworowych, najwyższe stężenie zostało określona dla linii MCF-7 i AMJ13. W przypadku komórek linii HBL, potwierdzona została najniższa zawartość RFT. Zwiększona obecność wewnątrzkomórkowego stężenia RFT przyczyniła się we wszystkich przypadkach do indukcji śmierci apoptotycznej (Adil i wsp., 2020). Nowatorskie podejście wykorzystania zimnej plazmy zostało zaprezentowane przez zespół Kim (Kim i wsp., 2020). Jako źródło wzbudzenia został wykorzystany autorski układ generujący zimną plazmę w wyniku wyładowań barierowych, inicjowanych w atmosferze argonu. Komórki ludzkiego raka piersi tj. MCF-7 i T-47D wraz z komórkami nienowotworowymi MCF-10A zostały poddane bezpośredniemu napromieniowaniu źródłem zimnej plazmy w czasie 600 s lub dziesięciokrotnie po 30 s (zachowując godziną przerwę pomiędzy). Prace badawcze skupiające się wokół wykorzystania źródeł zimnej plazmy nad modelami *in vitro* raka piersi zostały zawarte i usystematyzowane w tabeli (Tabela 5).

**Tabela 5.** Układy reakcyjno-wyładowcze wykorzystywane do bezpośredniego (B.) i pośredniego (P.) traktowania linii komórkowych nowotworu piersi. Podsumowane zostały testy biologiczne, które wykorzystano do zbadania wpływu biologicznego działania zimnych plazm.

<b>Źródło zimnych plazm</b>	<b>Gaz wyładowczy</b>	<b>Cel traktowania</b>	<b>Sposób traktowania (B-bezpośredni, P-pośredni)</b>	<b>Badania biologiczne</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Ref.</b>
kINPen11	Ar	MDA-MB-231, MCF-7 w DMEM/RPMI 1640	B.wraz z PU-H71	Żywotność komórkowa, Western Blot, typ śmierci komórkowej	60, 120, 180	Bekeschus i wsp., 2019



<b>APPJ</b>	Powietrze	MDA-MB-231, MCF-10A w L-15/DMEM	B.	Żywotność komórkowa, Western Blot	60, 90, 120	Liu i wsp., 2017
<b>DBD</b>	Powietrze	Woda redestylowana dla komórek MDA-MB-231	P.	Żywotność komórkowa	1080	Subramanian i wsp., 2020
<b>DBD</b>	He	MCF-7 w DMEM	B.	Żywotność komórkowa, typ śmierci komórkowej	20, 40, 60, 120	Zhang i wsp., 2020
<b>APPJ</b>	He	MDA-MB-231 w RPMI 1640	B. i P.	Żywotność komórkowa, Western Blot	60, 120, 180, 240	Jezechi i wsp., 2020
<b>DBD</b>	He	DMEM dla MCF10-A i MCF-7	P.	Żywotność komórkowa	120, 240, 360	Mokhtari i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	Ar	MDA-MB-231 pokryte cienką warstwą DMEM	B.	Żywotność komórkowa	60, 120, 180, 240	Gurung i wsp., 2020
<b>Siateczkowy-DBD</b>	Ar	MCF-7 w RPMI 1640	B.	Tworzenie kolonii, proliferacja komórkowa, qPCR, Western Blot, typ śmierci komórkowej, transport leków i wrażliwość na nie	Dziesięć razy po 30 s, co 1 godzinę	Park i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	He, He/O <sub>2</sub>	MCF-10A, MCF-7 zawieszony w DMEM	B.	Żywotność komórkowa, typ śmierci komórkowej, wrażliwość na leki	30, 60, 120, 300	Mirpour i wsp., 2014
<b>FE-DBD</b>	Powietrze	AMJ13	B.	Żywotność komórkowa, proliferacja komórkowa	5, 10, 15	Adil i wsp., 2019
<b>APPJ</b>	He	MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 w DMEM lub DMEM/F-12 lub pożywki aktywowane plazmą	B. i P.	Żywotność komórkowa, typ śmierci komórkowej, test zarysowania, Western Blot	B. 10, 20, 30, 40, 50 s. P. 60, 120, 180, 240, 300 .	Xiang i wsp., 2018
<b>FE-DBD</b>	Powietrze	MCF-7 w pożywce pozbawionej surowicy	B.	Żywotność komórkowa, Ekspresja genowa, qPCR,	5, 10, 15	Adil i wsp., 2020
<b>Częstotliwości radiowe</b>	Ar	MDA-MB-231 w RPMI 1640	B.	Żywotność komórkowa, test zarysowania	5, 10, 15, 20, 25	Choi BBR i wps., 2017
<b>DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	MCF-10A, MCF-12A, MCF-7,	B.	Żywotność skomórkowa, typ śmierci komórkowej,	Dziesięć razy po 30 s, co 1	Park i wsp., 2015

		MDA-MB-231, HCT-15, NCI-H1299,		Pirosekwencjonowanie, analiza ścieżek sygnałowych RT-PCR.	godzinę bądź 600 s.	
<b>DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	MDA-MB-231 w PBS	B.	Żywotność komórkowa, morfologia komórkowa, typ śmierci apoptotycznej, Western Blot, qPCR	60, 120	Lin i wsp., 2020
<b>DBD</b>	Powietrze atmosferyczne	MCF-10A w DMEM/F-12	B.	Żywotność komórkowa, tworzenie kolonii, typ śmierci komórkowej, frakcjonowanie, Western Blot, oznaczanie dimer tymidynowych	15, 30, 45, 60, 75, 90, 115	Kalghatgi i wsp., 2011
<b>Siateczko wy-DBD</b>	Ar	MCF-10A, MCF-7 w RPMI 1640	B.	Tworzenie kolonii, Żywotność komórkowa, RT-PCR, Metylacja DNA	Dziesięć razy po 30 s, co 1 godzinę bądź 600 s.	Kim i wsp., 2020
<b>APPJ</b>	Powietrze atmosferyczne	MCF-7, HCC1806 w DMEM	B.	Żywotność komórkowa, Potencjał błony mitochondrialnej, Ekspresja białek BAX i BCL2, Tworzenie kolonii, Cykl komórkowy,	60, 120	Almeida-Ferreira i wsp., 2022

Rozpatrując sposób napromieniowania komórek linii czerniaka za pomocą zimnych plazm, modele biologiczne mogą być bezpośrednio wystawione na działanie stożka zimnej plazmy (Bekeschus i wsp., 2017; Xia i wsp., 2019; Damia i wsp., 2009). W szczególności, wspomniane sposoby traktowania opierały się o wykorzystanie układów reakcyjno-wyładowczych typu kINPen (Bekeschus i wsp., 2017), powierzchniowe DBD (*ang. Surface-DBD, S-DBD*) (Xia i wsp., 2019) lub plazmowy dżet APPJ (Damia i wsp., 2009). Bezpośrednia ekspozycja komórek linii czerniaka na zimne plazmy zaprezentowana przez zespół Xu (Xu i wsp., 2018), wskazała znaczne uszkodzenie komórek czerniaka wystawionych na działanie układu APPJ, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego. Zaproponowano, że zimna plazma wykazuje efekty cytotoksyczne względem mysiego czerniaka (B16BL6) głównie poprzez wytwarzanie RFT w fazie gazowej i ciekłej, które następnie wykazują aktywność wewnątrz komórek. Dostarczone do wewnątrzkomórkowego środowiska RFT mogą doprowadzić do stresu oksydacyjnego a tym samym dalej do uszkodzeń składników komórek, co zostało wcześniej opisane

(Fraszczak i wsp., 2010). W tym przypadku największe zmniejszenie żywotności komórkowej podczas napromieniowania zimnymi plazmami wystąpiło dla najkrótszego czasu napromieniowania. Komórki poddane wcześniejszemu działaniu acetylocysteiny (powszechnie wykorzystywany związek do maskowania wolnych rodników), które następnie poddano aktywności zimnych plazm w czasie 90 s, nie doprowadziło do obniżenia żywotności komórkowej (Xu i wsp., 2018). Obserwowane wyniki jednoznacznie potwierdziły brak fizycznego oddziaływania stożka zimnych plazm na żywotność rozpatrywanego modelu biologicznego. Komórki poddane bezpośredniemu traktowaniu zimną plazmą zostały zbadane z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM (ang. *Transmission Electron Microscopy*) wykazując, że zwiększenie czasu napromieniowania doprowadziło do znacznego powiększenia wielkości mitochondrium komórkowego, retikulum endoplazmatycznego i wycieków cytoplazmy. Ponadto obecność RFT wewnątrz komórek doprowadziła do degradacji DNA komórek nowotworowych (Xu i wsp., 2018). Celem potwierdzenia hipotetycznej roli stresu oksydacyjnego generowanego zimnymi plazmami, zmierzono zawartość wewnątrzkomórkowego stężenia reaktywnych form tlenu. Potwierdzono tym samym, że stężenie RFT wewnątrz komórek czerniaka napromieniowanych zimną plazmą wzrosło siedmiokrotnie w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Zauważono ponadto, że wydłużenie czasu napromieniowania znacznie zmniejsza zdolności antyoksydacyjne jak i zawartość glutationu. Wystąpienie peroksydacji lipidów i wolnych aldehydów malonowych, stanowiących typowe biomarkery uszkodzeń oksydacyjnych składników komórkowych zostało potwierdzone i wzrastało wraz z wydłużeniem czasu traktowania zimnymi plazmami, tym samym wskazując na obecność związków utleniających wewnątrz środowiska komórkowego, prowadząc do uszkodzeń za sprawą RFT (Xu i wsp., 2018). Kolejne podejście zbadania bezpośredniego traktowania komórek linii czerniaka zimną plazmą podjął zespół Bakeschus (Bakeschus i wsp., 2017). Rozpatrując współcześnie rozwijane trendy badawcze w zwalczaniu czerniaka, immunomodulacja stanowi ważny aspekt do zaproponowania skutecznego remedium. Celem zbadania immunogenności traktowania zimną plazmą, zostały zbadane liczne molekuly powierzchniowe związane z immunomodulacją mysiego czerniaka. Komórki linii mysiego czerniaka B16F10 zostały poddane bezpośredniemu traktowaniu zimną plazmą w różnych odcinkach czasowych. W trakcie prowadzonych badań stwierdzono znaczny przyrost wewnątrzkomórkowych utleniaczy wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na zimną plazmę. Najwyższy efekt cytotoksyczności uzyskano w trakcie 60 i 120 sekundowej ekspozycji na źródło zimnej plazmy. Dłuższy czas napromieniowania badanych linii

komórkowych doprowadził do znacznego obniżenia średniej wielkości komórek. Odształcenia komórek zostały zbadane i zliczone dla każdej komórki z wykorzystaniem techniki badawczej cytometrii przepływowej odształceń w czasie rzeczywistym (*ang. flowing real-time deformability cytometry*, RT-DC) a także technik obrazowania. Zmniejszenie powierzchni komórek nowotworowych poddanych działaniu zimnych plazm związane jest z zahamowaniem zdolności do proliferacji i ruchliwości komórek. Powiększenie średniej wielkości jąder komórkowych komórek mysiego czerniaka zdaje się być powiązane z zaburzeniami cyklu życiowego komórek. Wydłużenie czasu napromieniowania doprowadziło do wystąpienia najliczniejszej grupy komórek znajdujących się w terminalnym stadium śmierci komórkowej. Z analiz wystąpienia immunogennej śmierci komórek, ekspresja MC-1R (receptora melanokortyny 1) była zwiększona po 4 i 24 godzinach od potraktowania zimną plazmą. Następnie potwierdzono znaczne zwiększenie ekspresji białek głównego układu zgodności tkankowej klasy 1 (MHC 1) po 24 godzinach od traktowania. Ostatecznie odnotowano również znaczną ekspresję kluczowych molekuł dla wystąpienia immunogennej śmierci komórkowej – kalretikuliny (CTR), w szczególności po 4 i 24 godzinach od ekspozycji na zimne plazmy. Wyniki te wskazują na wystąpienie immunomodulacji komórek mysiego czerniaka poddanych działaniom zimnych plazm atmosferycznych (Bakeschus i wsp., 2017). Opierając się na przedstawionych wynikach badań eksperymentalnych, potwierdzono efektywność bezpośredniego traktowania zimnymi plazmami mysiego czerniaka, co może stanowić obiecującą alternatywę do immunomodulacji w onkologii (Bakeschus i wsp., 2017). W pracy zespołu Xia (Xia i wsp., 2019) zrealizowano badania nad wykorzystaniem bezpośredniego traktowania zimnymi plazmami komórek linii ludzkiego czerniaka. Wybierając komórki linii A375, A875 jak również komórki ludzkich keratynocytów HaCaT, poddano je napromieniowaniu w czterech przedziałach czasowych. Stwierdzono, że czas 2 i 3 minut ekspozycji prowadził do tworzenia pęcherzy i obniżenia gęstości wewnętrznej komórek nowotworowych, podczas gdy komórki linii HaCaT wykazały nieznaczne zmiany w morfologii komórki. Wykazano ponadto znaczną redukcję żywotności komórek w przypadku komórek linii A375 i A875 w sposób zależny od czasu traktowania. Szkodliwe oddziaływanie zimnych plazm na komórki HaCaT uzyskano dla czasów ekspozycji powyżej 2 minut traktowania. Uzyskane wyniki zdają się wskazywać na możliwą wysoką selektywność inicjacji śmierci komórkowej poprzez dobór odpowiedniej długości czasu traktowania zimną plazmą. Po 12 godzinach od wykorzystania zimnej plazmy na badane komórki odnotowano nieznaczny wzrost potencjału błonowego

mitochondrium. Zmiany w potencjale błonowym mogą być powiązane ze zdolnością przepuszczalności mitochondrialnej. Zjawisko to może prowadzić do tworzenia porów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, stwarzając tym samym możliwość do wymiany składników pomiędzy cytoplazmą i środowiskiem mitochondrium komórek. Ostatecznie, inicjując ostatni etap apoptotycznej śmierci komórkowej, doprowadza to do wzrostu zdolności wymiany molekuł wewnątrz komórki. Tym samym, wzrost zdolności przepuszczania błony komórkowej związany jest ze śmiercią apoptotyczną, co może zostać potwierdzone poprzez wykorzystanie barwników potencjometrycznych. Po następnych 18 – 24 godzinach, porównując potencjał przenikania błony mitochondrium, okazał się być on niższy w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Dalsze badania wykazały, że napromieniowanie zimną plazmą doprowadziło do znacznego wzrostu aktywacji kaspazy 2 i 3, lecz nie kaspazy 9, będącej białkiem powiązaniem z uszkodzeniem mitochondrium. Analiza ścieżek sygnałowych receptorów śmierci wskazała, że poziom TNF- $\alpha$ , Fas i FasL wzrastał podczas traktowania zimną plazmą w sposób zależny od czasu ekspozycji. Poziom TNFR1 wzrastał jedynie w przypadku komórek linii A375 napromieniowanej w czasie 3 min, podczas gdy w przypadku komórek A875 nie odnotowano wzrostu poziomu TNFR1. Warto nadmienić, że zaproponowane źródło wytwarzania zimnych plazm tj. powierzchniowe wyładowania barierowe (S-DBD), generujące głównie jony NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> w sposób zależny od długości traktowania. Stężenie tych RFA można było znacząco zwiększyć, poprzez wydłużenie czasu napromieniowania. Trzeci główny przedstawiciel reaktywnych form - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> był również generowany, jednakże jego stężenie malało wraz z wydłużeniem czasu traktowania. Stężenie wewnątrzkomórkowych RFT znacząco malało wraz z czasem ekspozycji w komórkach linii A375 i A875. Przeciwna sytuacja została stwierdzona dla stężenia wewnątrzkomórkowego NO, wzrastającego wewnątrz komórek wraz z wydłużonym czasem traktowania. Komórki linii A375 wykazały najwyższy poziom iNOS po napromieniowaniu zimną plazmą. Wprowadzenie inhibitorów iNOS bez dodatku związków maskujących RFT do środowiska komórkowego przyczyniło się do znaczącego obniżenia częstości śmierci apoptotycznej. Z tej perspektywy zasugerowano, że głównym czynnikiem inicjującym apoptotyczną śmierć komórkową jest aktywność wewnątrzkomórkowych związków NO, które regulowane są za pomocą Systryny-2. Systryny-2 są białkami zaangażowanymi w odpowiedź komórkową na warunki stresowe i regulują wzrost komórek i także ich przeżywalność, a jej poziom został określony w komórkach czerniaka A375 i A875 po traktowaniu zimnymi plazmami. Napromieniowanie zimną plazmą doprowadziło do zwiększonej ekspresji białek Systryny-2 w obydwu liniach

komórkowych wraz z wydłużeniem czasu traktowania. Ponadto ustalono, że śmierć apoptotyczna komórek linii A375 po napromieniowaniu została obniżona wraz ze zmniejszoną ekspresją białek Systryny-2. Wyciszając ekspresję Systryny-2 potwierdzono obniżenie poziomu iNOS podczas traktowania zimnymi plazmami, co doprowadziło do zmniejszonego wytworzenia wewnątrzkomórkowych związków NO. Z drugiej strony, znacząca ekspresja białek Systryny-2 następująca po zastosowaniu zimnej plazmy spowodowała zwiększone wytwarzanie iNOs, Fas i FasL, tym samym, doprowadzając do zwiększonej śmierci apoptotycznej (Xia i wsp., 2019). Nieco odmienne podejście do zbadania tematyki zostało przedstawione przez zespół Chen (Chen i wsp., 2018), gdzie badano indukcję śmierci apoptotycznej wśród komórek linii czerniaka, analizując materiał biologiczny wystawiony na działanie plazmowego dżetu APPJ. Do określenia aktywności metabolicznej komórek nowotworowych wykorzystano test MTT, a średnia dawka śmiertelna (*ang. median Lethal Dose 50*, LD50) zaobserwowana została po 3 minutach napromieniowania komórek źródłem zimnych plazm, podczas gdy dłuższe czasy napromieniowania prowadzą do zmniejszenia efektywności. Wzrost liczby komórek poddawanych traktowaniu zimną plazmą przyczyniał się do umniejszenia efektywności napromieniowania. Co ciekawe, natychmiast po napromieniowaniu komórek stwierdzono wystąpienie śmierci apoptotycznej, a nie nekrotycznej. Migracja komórek została zbadana z wykorzystaniem testu zarysowania, wskazując na nieznaczne zahamowanie mobilności komórek wraz z wydłużeniem czasu napromieniowania. Tym samym potwierdzono, że poddanie komórek czerniaka działaniu zimnej plazmy w znacznym stopniu prowadzi do zahamowania mobilności komórek, a także obniża ich żywotność, doprowadzając do śmierci apoptotycznej.

Perspektywy podejmowanych prac nad wykorzystaniem źródeł zimnych plazm do bezpośredniego traktowania komórek raka piersi i skóry, stanowią obiecującą alternatywę do stworzenia produktu klinicznego mogącego zmniejszyć rozmiar nowotworu, a także zainicjowanie zaprogramowanej śmierci komórkowej. Głównymi atutami prowadzenia bezpośredniego działania zimnej plazmy na raka piersi i czerniaka wydają się być precyzja kontrolowania traktowanego obszaru, szybkie szacowanie poczynionych szkód na napromieniowanych powierzchniach a także prostota adaptacji tej techniki w terapiach mieszanych z chemoterapeutykami lub terapią fotodynamiczną. Efektywność wykorzystania bezpośredniego napromieniowania zimną plazmą może być również powiązana z wytworzeniem RFT i RFA o krótkim czasie życia. Formy te, będąc

zaangażowane w aktywność przeciwnowotworową jak również uczestnicząc w reakcjach kaskadowych prowadzą do wytworzenia RFT i RFA o długim czasie życia bądź zwiększeniu stężenia tych form w środowisku wewnątrzkomórkowym. Z perspektywy stworzenia produktu klinicznego, takie urządzenia mogą być stosowane przez wyszkolony personel pielęgniarski bądź techniczny, rzutując na prostotę wykorzystania przygotowanego produktu.

#### **4.6. Podejście łączące bezpośrednie i pośrednie traktowanie komórek nowotworowych źródłami zimnych plazm atmosferycznych**

Ostatnimi czasy, na popularności zyskują prace badawcze wykorzystujące źródła zimnych plazm w sposób mieszany, jednocześnie podejmując traktowania bezpośredniego i pośredniego jedynie komórek linii czerniaka. Niewielkie zainteresowanie wykorzystaniem traktowania mieszanego względem komórek raka piersi może być uwarunkowane trudnym dostępem zmian nowotworowych dla systemów zimnej plazmy. Jednakże, prace skupiające się nad wykorzystaniem układów zimnej plazmy z innymi metodami zwalczania nowotworu piersi nie zostają poruszane.

Główną przyczyną realizowanych prac skupiających się wokół czerniaka jest potencjalna możliwość zastąpienia stosowania chemoterapeutyków ze względu na wysokie koszty kuracji i związanymi z ich stosowaniem licznymi skutkami ubocznymi dla całego organizmu. W podrozdziale **4.4. Pośrednie traktowanie komórek nowotworowych zimnymi plazmami atmosferycznymi** dedykowane do badań nad komórkami linii raka piersi i czerniaka zostały omówione przykłady braku szkodliwości cieczy aktywowanych zimną plazmą na komórki nienowotworowe, a koszty wytworzenia terapeutyku stanowią jedynie cenę medium ciekłego, gazu wyładowczego, eksploatacji elektryczności i układu reakcyjno-wyładowczego, czyniąc tę alternatywę przystępną dla pacjentów z każdym typem ubezpieczenia zdrowotnego. Ponadto synergiczne wykorzystanie zimnych plazm i cieczy nimi aktywowanych może w znacznym stopniu zwiększyć efektywność przeciwnowotworową takiego podejścia, ograniczając tym samym ewentualne skutki uboczne.

Rozpatrując doniesienia naukowe wykorzystujące podejście mieszane, w pracach zespołu Saadati (Saadati i wsp., 2018) wykorzystano jako model *in vitro* komórki linii B16F10, poddane działaniu zimnych plazm w sposób bezpośredni, pośredni, a także połączenie traktowania pośredniego z roztworami chemoterapeutyków. Analizując reaktywne formy z fazy gazowej, stwierdzono najintensywniejsze sygnały należące do NO,

$O_3$ ,  $OH^\bullet$ ,  $N_2$ ,  $N_2^+$  i  $O$ . Dla eksperymentów z traktowaniem bezpośrednim, żywotność komórkowa powiązana została z objętością nowotworu podskórnie wszczepionego, gdzie stwierdzono jego 50-krotną redukcję objętości. Największy wskaźnik przeżywalności modeli mysich z podskórnie wszczepionym nowotworem uzyskano w przypadku terapii łączonej, gdzie 70% grupy badawczej przetrwała do 40 dnia eksperymentu. W przypadku grupy kontrolnej, każda z myszy zeszła śmiertelnie przed 30 dniem eksperymentu. Badania te wskazały, że połączenie aktywności roztworu aktywowanego zimną plazmą i chemoterapeutyku wykazuje największą efektywność przeciwnowotworową i wysoki potencjał aplikacyjny względem nowotworów podskórnych. Wyniki te ponadto pozostają w dobrej korelacji z pracami wcześniej omówionymi przez zespół Daeschlein (Daeschlein i wsp., 2018).

Następna praca podjęła badania mające na celu określenie wpływu kilku parametrów na żywotność komórkową dwóch rodzajów czerniaka (Malme-3M i SK-MEL-28), a także glejaka wielopostaciowego (LN229 i U87). Wybrane linie komórkowe zostały poddane bezpośredniemu działaniu zimnych mikroplazm typu plazmowego dżetu ( $\mu$ -APPJ) i w sposób pośredni, inkubując komórki w cieczy aktywowanej zimną plazmą. Do inicjacji wyładowań zimnych plazm wykorzystano mieszanę helu z tlenem lub azotem jako gaz plazmotwórczy. Dodatek azotu przyczynił się do zwiększonego wytworzenia RFA, w szczególności rodników  $NO^\bullet$ , który może zmieniać uzyskiwaną odpowiedź przeciwutleniającą traktowanych komórek (Joshi i wsp., 1999). Ponadto stwierdzono zajście reakcji kaskadowych pomiędzy  $NO^\bullet$  i  $O_2^-$ , prowadząc do wytworzenia nadtlenoazotynów, które wykazują silny efekt przeciwnowotworowy (Fraszczak i wsp., 2010). Linia komórkową wykazującą największą oporność była SK-MEL-28 z połową maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half maximal inhibitory concentration*, ang. IC50) uzyskaną po 11 minutach napromieniowania. Najwyższa wrażliwość traktowania została stwierdzona dla linii U87, gdzie większość komórek uległa śmierci przy czasie bezpośredniego napromieniowania 7 minut. Badając traktowanie pośrednie, efektywność przeciwnowotworowa była porównywalna z tą uzyskaną dla traktowania bezpośredniego względem komórek linii SK-MEL-28 i U87. W pracy tej wskazano, że poszczególne modele biologiczne wykazują różną wrażliwość względem poszczególnych RFT i RFA, których stężenie zależne jest od sposobu traktowania i wykorzystanej mieszaniny gazu plazmotwórczego. Analiza cytometrii przepływowej potwierdziła, że śmierć nekrotyczna była główną przyczyną śmierci komórkowej inicjowanej poprzez działalność zimnej



plazmy. Ogólnie podsumowano, że we wszystkich grupach badawczych, komórki linii SK-MEL-28 i LN229 okazały się najmniej podatne na działalność zimnej plazmy w porównaniu z pozostałymi modelami biologicznymi. Komórki linii Malme-3M i U87, wykazują ekspresję białka p53 typu dzikiego a także genu CDKN2A, natomiast komórki linii SK-MEL-28 i LN229 wykazujące ekspresję zmutowanego białka p53 i dziki typ genu CDKN2A. Widoczne braki ekspresji białka p53 w tych liniach komórkowych najprawdopodobniej powiązane są z ich wysoką podatnością na traktowanie zimnymi plazmami. Ponadto, brak ekspresji białka p53 może prowadzić do wzrostu endogenego poziomu RFT, uwrażliwiając komórki na stres oksydacyjny i inicjację śmierci apoptotycznej. Tak jak wspomniano na początku tego podrozdziału, podejście łączące traktowanie pośrednie i bezpośrednie zimnymi plazmami znacząco podniosło potencjał przeciwnowotworowy. Możliwość zastąpienia chemoterapeutyku poprzez ciecze aktywowane zimnymi plazmami nie stanowi dużego zagrożenia na chwilę obecną. Jednakże szczegółowe prześledzenie reakcji kaskadowych pomiędzy reaktywnymi formami tlenu i azotu o długim czasie życia w cieczach napromieniowanych i molekułami w pożywkach hodowlanych lub innych terapeutyków powinno zostać przeprowadzone celem wyeliminowania ewentualnej szkodliwości względem środowiska nienowotworowego. Połączenie podejścia pośredniego i bezpośredniego może zapewnić w przyszłości nieagresywną metodę do indukowania śmierci apoptotycznej komórek o wysokim stopniu selektywności i wrażliwości względem komórek czerniaka.

Materiał zaprezentowany w tej części został opublikowany w artykule: Terefinko D., Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. „*Biological Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Skin Cancer*” *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, vol. 41, s. 507-529. IF=2.990, MNISW=100.

#### **4.7. Aktywność biologiczna zimnych plazm atmosferycznych w zmniejszaniu zjawiska wielolekowej oporności patogenów bakteryjnych**

Początkiem badań nad antybiotykami było przypadkowe odkrycie Aleksandra Fleminga, gdzie na długo przetrzymywanej płytce Petriego wokół kolonii pleśni *Penicillium*, powstała zauważalna strefa zahamowania wzrostu bakterii gronkowca złocistego – *Staphylococcus aureus*. Dyfundujący do podłoża biologicznie aktywny czynnik została nazwana przez Fleminga mianem penicyliny, a jej rok odkrycia 1928 uważany jest za początek rozkwitu badań nad wtórnymi produktami metabolizmu mikroorganizmów do zastosowań względem zakażeń bakteryjnych- antybiotyków

(Markiewicz i wsp., 2001). Od tego przełomowego momentu, farmaceutyki te były uważane za remedium na wszelkiego rodzaju zachorowania bakteryjne. Pogląd ten przyczynił się do wielkoskalowej produkcji sięgającej 100 000 ton rocznie na całym świecie (Nikaido i wsp., 2009). Wielotonażowa produkcja, łatwość dostępu i powszechność wykorzystania antybiotyków, przyczyniają się do licznych problemów z tym związanych. Leki te często bywają przypisywane w sposób nieprawidłowy, bez uprzedniego zbadania wrażliwości poszczególnych szczepów bakteryjnych na czynnik aktywny, bądź pod kątem objawów wywoływanych przez patogeny. Często pomija się dobierania odpowiednich dawek antybiotyku, a także odpowiedniego poinformowania pacjentów o konieczności zrealizowania kuracji do jej końca. Wspomniane praktyki doprowadzają do rozwinięcia zjawiska lekooporności patogenów względem najczęściej wykorzystywanych farmaceutyków. Problem ten jest naglący i z czasem przybiera na sile. Środowiska naukowe szacują, że ze względu na rozwijający się proces lekooporności szczepów bakteryjnych, doprowadzi do ponad 10 milionowego wzrostu zgonów ludzi do roku 2050 (Kwon i wsp., 2021). Próbuąc wyjść tym problemom naprzeciw, podejmowane są starania stworzenia nowych antybiotyków- obecnie 13 nowych związków znajduje w fazie 3 badań klinicznych. Niewielka ilość prowadzonych prac nad nowymi farmaceutykami, wiąże się m.in. z wysokimi kosztami prowadzonych badań, długiego czasu ich realizacji, a także dużymi nakładami pieniędzy i ludzi zaangażowanych w badaniach. Tak niewielka ilość rozpracowywanych nowych medykamentów połączona z postępującym zjawiskiem rozwoju bakterii lekoopornych, niesie za sobą niezbedność podjęcia prac nad zachowaniem potencjału antybakteryjnego najczęściej wykorzystywanych antybiotyków wykorzystywanych w medycynie i weterynarii. Najczęstszymi kierunkami wykorzystania antybiotyków pozostają medycyna i hodowle zwierzęce, przyczyniając się do największego wkładu w zanieczyszczenie środowiska naturalnego (Giger i wsp., 2003). Wody gruntowe i powierzchniowe zanieczyszczane są antybiotykami poprzez działalność ludzką- nieodpowiednio gospodarując odpady medyczne, jak również przenikając z moczem i odchodami z gospodarstwa domowego lub ośrodków medycznych.

Przypatrując się przemysłowi żywnościowemu i hodowli zwierząt, antybiotyki są szeroko wykorzystywane nie tylko do zwalczania zachorowań bakteryjnych, prewencyjnie, a także do przyspieszania wzrostu i zwiększenia masy ciała (Kuppusamy i wsp., 2018). Sumaryczne wykorzystanie antybiotyków do wytwarzania żywności przekracza ilości farmaceutyków aplikowanych w ochronie zdrowia człowieka (Gelband i wsp., 2015).

Antybiotyki przenikają do środowiska naturalnego poprzez zastosowanie obornika do nawożenia gleby, wraz z moczem a także na każdym etapie przetwórstwa żywności (Kuppusamy i wsp., 2018). Wynikiem takich działań jest dostrzegalna akumulacja antybiotyków i ich pochodnych w powietrzu, wodzie, a także obserwowana bioakumulacja w glebie, niosąc tym samym wysokie zagrożenie dla całego środowiska (Ding i wsp., 2014). Na szczególną uwagę zasługuje odnotowywany negatywny wpływ zanieczyszczeń antybiotykami na ekosystem wodny (Kovalakova i wsp., 2020; Xu i wsp., 2021). Przy niewielkich stężeniach farmaceutyków tj. 10 mg/dm<sup>3</sup> stwierdzono zauważalne zaburzenia wytwarzania tlenu, wiązania azotu i zaburzenia łańcucha pokarmowego ekosystemu wodnego, głównie wśród glonów i sinic (Kovalakova i wsp., 2020). Rozpatrując wielopokoleniową ekspozycję Rozwielitki wielkiej (*Daphnia magna*) na tetracyklinę o stężeniu od 0,1 do 5,0 mg/dm<sup>3</sup>, odnotowano zaburzenia ich morfologii, długości życia i płodności (Xu i wsp., 2021). Akumulacja farmaceutyków w środowisku naturalnym przykłada się do rozwoju trwającej selekcji oporności lekowej wśród patogenów bakteryjnych (Nikaido i wsp., 2009). Zjawisko to prowadzi do coraz częstszej izolacji szczepów wielolekowej oporności (*ang. multidrug resistant*, MDR), skutecznie obniżając perspektywy terapeutyczne wśród zarażonych pacjentów. Wartym przytoczenia przykładem jest oporny na metacylinę szczep *Staphylococcus aureus* (*ang. methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), który również wykazuje oporność na działanie aminoglikozydów, tetracykliny, makrolidy, linkozamidy i chloroamfenikolu (Nikaido i wsp., 2009). Do zwalczania tak opornych patogenów wykorzystuje się antybiotyki glikopeptydowe – Wankomycynę, wykorzystywaną najczęściej w terapii względem zagrażających życiu infekcjom bakterii Gram(+). Jednakże w środowisku zanieczyszczanym przez odpady szpitalne, potwierdzono wystąpienia szczepów *Staphylococcus aureus* odpornych na działanie wankomycyny (VRSA). Zjawisko to, tym bardziej niebezpieczne ze względu na fakt odnotowania 18 964 zgonów w wyniku infekcji *Staphylococcus aureus* w roku 2006 w USA (Active Bacterial Core Surveillance 2010). Wzrastająca corocznie ilość zgonów wywołanych zakażeniami bakteryjnymi rzutuje na konieczności poszukiwania nowych rozwiązań celem zahamowania procesu nabywania wielolekowej oporności wśród szczepów bakteryjnych. Jednym z możliwych rozwiązań pozostaje ograniczenie dostępu swobodnie występujących mikroorganizmów na dawki subletalne najczęściej aplikowanych antybiotyków w medycynie, weterynarii i przemyśle żywnościowym, tym samym redukując częstotliwość przenoszenia genetycznych uwarunkowań oporności (występujących m.in. w plazmidach, transpozonie lub integracie

) (Ding i wsp., 2014) wśród zjadliwych patogenów człowieka. Najczęściej wykorzystywane stacje oczyszczania ścieków wykazują znikomą zdolność do usuwania antybiotyków a także innych leków biobójczych ze ścieków. Z tego też względu występuje wysokie zapotrzebowanie na rozwijanie i wykorzystanie efektywnych metod do rozkładu biologicznie aktywnych molekuł ze środowiska wodnego o różnym pochodzeniu. Obecnie rozwijanych jest kilka różnych podejść eliminacji antybiotyków ze ścieków, włączając w to metody Zaawansowanych Procesów Utleniania (*ang. Advanced Oxidation Process, AOP*) tj. reakcje foto-Fentona, ozonowanie i procesów fotokatalitycznych (Elmolla i wsp., 2010; de Souza Santos i wsp., 2015; Liu i wsp., 2014). Obok zadowalającego stopienia efektywności rozkładu antybiotyków przez zaawansowane procesy utleniania, wytworzone produkty pośrednie wykazują wysoki poziom toksyczności (Elmolla i wsp., 2010; de Souza Santos i wsp., 2015; Liu i wsp., 2014). Z tego też względu, procesy angażujące zimne plazmy atmosferyczne mogą stanowić obiecującą alternatywę dla procesów zaawansowanego utleniania. Efektywność rozkładu antybiotyków z wykorzystaniem zjawiska zimnej plazmy związana jest w głównej mierze z generacją RFT i RFA, w szczególności jonów  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , ozonu ( $\text{O}_3$ ), nadtlenku wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), rodników hydroksyloowych ( $\text{OH}^\bullet$ ), tlenu atomowego ( $\text{O}$ ) (Bruggeman i wsp., 2016) i promieniowania UV (Magureanu i wsp., 2021).

Obecnie prowadzone są nieliczne badania skupiające się wokół możliwości wykorzystania układów reakcyjno-wyładowczych generujących zimną plazmę do rozkładu antybiotyków z cieczy. Układy zimnej plazmy zostały jak dotąd zaangażowane do badań nad rozkładem ofloksacyny (OFX) (Magureanu i wsp., 2011; Sarangapani i wsp., 2019), doksycykliny (DXC) (El Shaer i wsp., 2020; Sokolov i wsp., 2018; Dzimitrowicz i wsp., 2022), ampicyliny (AMP) (Magureanu i wsp., 2011; Smith i wsp., 2018), chloroamfenikolu (ChRP) (Guo i wsp., 2019), Cyprofloksacyny (Sarangapani i wsp., 2019; Park i wsp., 2019; Li i wsp., 2020) i enrofloksacynę (Aggelopoulos i wsp., 2020). W przytoczonych pracach, wyładowania barierowe (Sarangapani i wsp., 2019; Magureanu i wsp., 2011; Smith i wsp., 2018; Aggelopoulos i wsp., 2020; Iervolino i wsp., 2019), pulsowe wyładowania koronowe (*ang. Puls-corona discharge, PCD*), APPJ (Park i wsp., 2019; Li i wsp., 2020), a także wyładowania zimnej plazmy prowadzone nad jak pod powierzchnią wody (el Shaer i wsp., 2020; Guo i wsp., 2019) były wykorzystywane. W przytoczonych pracach badawczych zimna plazma generowana była w atmosferze tlenu (Magureanu i wsp., 2011) lub powietrza (Sarangapani i wsp., 2019; Smith i wsp., 2018; Aggelopoulos i wsp., 2020; Guo i wsp.,

2019; el Shaer i wsp., 2020; Sokolov i wsp., 2018; Park i wsp., 2019; Iervolino i wsp., 2019; Li i wsp., 2020; Dzimitrowicz i wsp., 2022 ). Proces rozkładu farmaceutyków prowadzony był z użyciem wyłącznie roztworów wodnych pojedynczego antybiotyku. Ponadto przytoczone układy reakcyjno-wyładowcze operowane były w trybie stacjonarnym, ograniczając tym samym objętości napromieniowanych roztworów wodnych, tym samym ograniczając efektywność prowadzonego procesu. Jedynie w przypadku pracy zespołu Sokolova wykorzystano cyrkulacyjny przepływ traktowanego roztworu (Sokolov i wsp., 2018).

Podjęte zostały starania nad stworzeniem i przeprowadzeniem wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operowania pióra plazmowego a także szczotki plazmowej, dedykowanych do procesów degradacji antybiotyków z roztworów wodnych. Główną motywacją podejmowanych prac była chęć zaproponowania ekologicznej metody umożliwiającej przeprowadzenie oczyszczania wody z Ofloksacyny (OFX), Doksycykliny (DXC), Ampicyliny (AMP), Chloroamfenikolu (ChRP) oraz mieszanin tych antybiotyków o wybranych stężeniach. Mając również na uwadze możliwość rozwoju wielolekowej oporności patogenów wystawionych na działanie dawek subletalnych wymienionych farmaceutyków, roztwory po traktowaniu zimną plazmą były wykorzystane do badań względem bakterii z grupy Gram(-) i Gram(+).

## **5. Cel i zakres prowadzonych prac**

Celem pracy było zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej. Podjęte prace odznaczały się interdyscyplinarnym charakterem łącząc ze sobą badania z obszaru chemii plazmy i określenia jej aktywności biologicznej. Zadania badawcze zostały podzielone na trzy etapy:

- I. Pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi
- II. Bezpośrednie i mieszane zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi
- III. Bezpośrednie zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków

## **Zadanie I. Pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi**

**Pierwszym zadaniem badawczym** zaprezentowanej rozprawy było przygotowanie i scharakteryzowanie układu wyładowczego, generującego helowe zimne plazmy atmosferyczne w wyniku wyładowań barierowych do wywołania zmian w żywotności, zdolności do migracji i indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej wobec linii komórkowych ludzkiego nowotworu piersi – MCF-7 i MDA-MB-231 i nienowotworowej linii MCF-10A.

**Hipoteza badawcza:** omawiany układ wyładowczy, generujący zimne plazmy w atmosferze helu, w wyniku wyładowań barierowych stanowi bogate źródło reaktywnych form tlenu i azotu, mogących wpłynąć na zaburzenie procesów metabolicznych, zdolności do migracji i wywołania apoptozy w komórkach ludzkiego nowotworu piersi, poddanych działaniu tychże wyładowań w sposób pośredni, bezpośredni, i mieszany.

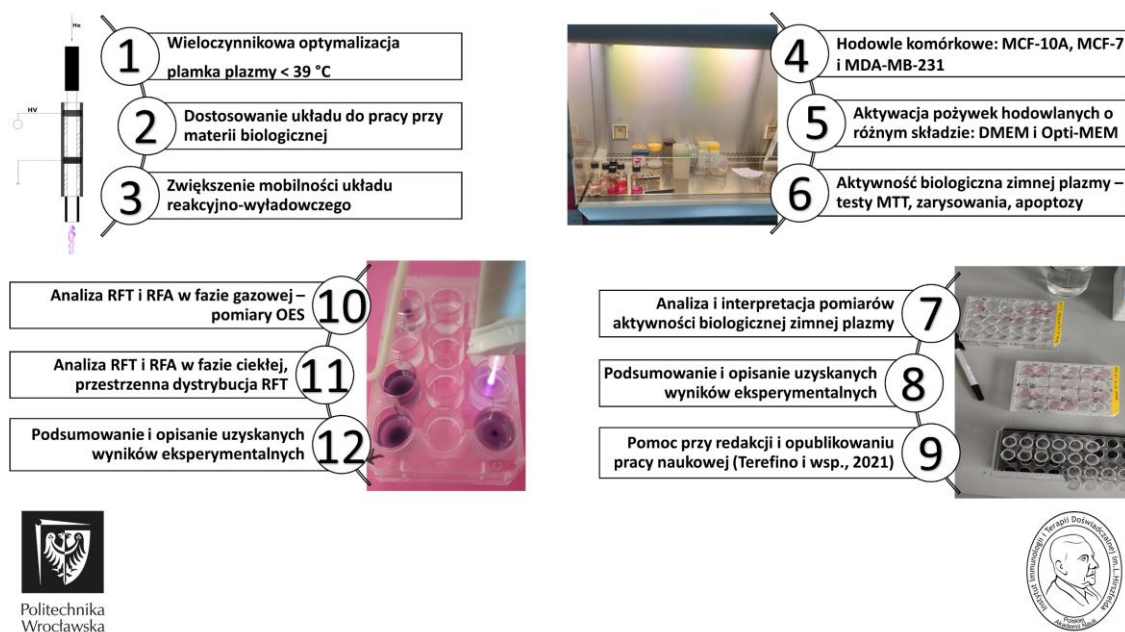
Celem wywołania określonej odpowiedzi biologicznej, układ wyładowczy generujący zimną plazmę został wykorzystany do napromieniowania pożywek hodowlanych takich jak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) i Opti-MEM (Optimum Modified Eagle Medium), a następnie wykorzystania tak przygotowanych pożywek do hodowli linii komórek ludzkiego nowotworu piersi – MCF-7 oraz MDA-MB-231, a także ludzkiej nienowotworowej linii komórkowej MCF-10A. Ponadto, wpływ warunków poddawania pożywek hodowlanych, aktywacji wyładowaniami barierowymi (np., czas napromieniowania, skład pożywki, jego rodzaj i objętość) został zbadany ze względu na uzyskiwaną odpowiedź biologiczną i efektywność wywoływanych zaburzeń aktywności mitochondrialnej, zmniejszenia ruchliwości komórek i indukowania zaprogramowanej śmierci komórkowej. Dodatkowo opisano, w jaki sposób dobrane warunki przygotowania pożywki poddanej aktywacji, wpływają na generację reaktywnych form tlenu i azotu, którym przypisywana jest uzyskiwana aktywność biologiczna.

Wychodząc tym ograniczeniom naprzeciw, przeprowadzono badania określające wpływ dwóch rodzajów pożywek hodowlanych poddanych napromieniowaniu zimną plazmą na aktywność biologiczną trzech linii komórkowych: ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 i ludzkich komórek nienowotworowych MCF-10A. Do przeprowadzenia prac badawczych został wykorzystany nowatorski układ wyładowczy,

charakteryzujący się niskimi kosztami operacyjnymi, wysoką mobilnością i prostotą operowania. Układ ten został również z powodzeniem zastosowany w badaniach nad ludzkimi liniami komórek skóry, w którym to projekcie miałem szczęście pracować (Dzimitrowicz i wsp., 2020), a jego innowacyjność została doceniona przyznaniem patentu na wynalazek (Pat. nr 241305). W przytoczonych badaniach, poddając ludzkie komórki skóry krótkim czasom napromieniowania zimną plazmą, generowaną przez wspomniany układ wyładowczy, uzyskiwano znaczną poprawę żywotności badanych komórek, mogącą wspierać procesy gojenia ran. Podjąłem próby sprawdzenia, w jaki sposób zmiana sposobu traktowania, czasu ekspozycji na zimną plazmę oraz rodzaj cieczy poddanej aktywacji przyczynia się do wywołania zmian w biologii komórek nowotworowych. Tym samym doświadczalnie został potwierdzony efekt maskujący surowicy płodowej cieląt (*ang. Fetal Bovine Serum, FBS*) na RFT wytworzone w pożywce napromieniowanej przez zimną plazmę, a także różnice w uzyskiwanej odpowiedzi biologicznej względem analizowanych linii komórkowych. Celem wy tłumaczenia różnic w uzyskiwanej odpowiedzi biologicznej rozpatrywanych modeli, przeprowadzono analizę jakościową i ilościową RFT i RFA obecnych w napromieniowanej pożywce hodowlanej. Na koniec dokonano podsumowania uzyskanych wyników i zależności wraz z opisaniem sposobu oddziaływania zimnych plazm z modelami biologicznymi.

Celem lepszego zobrazowania interdyscyplinarnego charakteru przeprowadzonych prac badawczych, poszczególne etapy wraz z jednostkami ich realizacji zostały ujęte w Rycinie 4.





**Rycina 4.** Chronologiczne przedstawienie etapów realizacji poszczególnych celów badawczych mających na celu przeprowadzenie pośredniego zastosowania układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi. Etapy 1-3; 10-12 zostały zrealizowane w Politechnice Wrocławskiej, Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej, etapy 4-6; 7-9 zostały zrealizowane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych.

## 6. Materiały i metodyka badawcza dla realizacji zadania I

### 6.1. Hodowle komórkowe

Do zbadania aktywności biologicznej pożywki hodowlanej poddanej działaniu zimnej plazmy, wykorzystałem modele *in vitro* nowotworu piersi, wybierając dwie linie komórkowe. Pierwsza linia, ludzka linia nowotworu piersi o słabej zdolności przerzutowania MCF-7 (Soule i wsp., 1973), a także ludzka linia nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Cailleau i wsp., 1978). Oprócz różnic w zdolności przerzutowania wymienione linie komórkowe różnią się tempem proliferacji. Wysoka zdolność przerzutowania i agresywny charakter linii komórkowej MDA-MB-231, jest również związany z podwyższonym poziomem ekspresji białka p53. Jako model komórek nienowotworowych, stanowiący kontrolę negatywną, wykorzystano ludzką linię komórkową MCF-10A, uzyskaną ze spontanicznie unieśmiertelnionej tkanki nabłonkowej piersi (Soule i wsp., 1990). Linie komórkowe wykorzystane do oznaczania aktywności biologicznej zimnych plazm atmosferycznych pochodzą z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych ATCC (ang. *American Type Cell Culture*, ATCC). Hodowle komórkowe przed przeprowadzeniem badań nad pośrednim zastosowaniem układu zimnej plazmy atmosferycznej były prowadzone w pożywce Opti-MEM z dodatkiem GlutaMaxu (Thermo Fisher Scientific Inc., New York, USA), wzbogacanym 3% dodatkiem FBS

(Gibco, Powzięte z Brazylii, Campinas, Brazylia), 100 U/ cm<sup>3</sup> roztworu penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy). Ze względów na bibliograficzne zalecenia prowadzenia hodowli komórkowej dla linii MCF-10A, do pożywki były dodatkowo wprowadzane: insulina, naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, 20 µg/cm<sup>3</sup>), suplement do wzrostu komórek śródbłónka (ECGS, 50 µg/cm<sup>3</sup>) i hydrokortyzon (0,5 µg/cm<sup>3</sup>). Odczynniki te były nabyte od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Niemcy). Hodowla wybranych modeli *in vitro* była prowadzona w inkubatorze, ustalając temperaturę na 37 °C, w atmosferze powietrza z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Do kolejnych pasażów komórkowych wykorzystywano roztwór 0,05% Trypsyny i 0,02% EDTA (w/v).

## 6.2. Pożywki hodowlane

Pośrednie traktowanie wybranych linii komórkowych, przeprowadzono wybierając dwie pożywki hodowlane, różniące się między sobą zawartością składników odżywczych – pożywka DMEM, o niższej zawartości i Opti-MEM o wyższej zawartości składników odżywczych. Celem zbadania wpływu pożywek hodowlanych poddanych działaniu zimnej plazmy na aktywność biologiczną komórek m.in. ich żywotność, ruchliwość i indukcję śmierci komórkowej, przygotowano szereg grup eksperymentalnych (usystematyzowane w Tabela 6). Początkowo określone objętości (3,0 cm<sup>3</sup> bądź 1,5 cm<sup>3</sup>) pożywek hodowlanych (DMEM lub Opti-MEM wzbogacony o GlutaMAX) zostały uzupełnione o 100 U/cm<sup>3</sup> roztworu penicyliny i 100 µg/ cm<sup>3</sup> streptomycyny, następnie przeniesione do oddzielnych dołków testowej płytki 12 dołkowej i poddane aktywacji źródłem zimnej plazmy atmosferycznej. Do zbadania efektu maskującego FBS, w pierwszej fazie doświadczeń, 3% dodatek FBS został wprowadzony do pożywki przed ich napromieniowaniem, podczas gdy dla drugiej fazy doświadczeń 3% FBS był wprowadzany natychmiast po zakończeniu aktywacji pożywki przez zimną plazmę. Odległość pomiędzy powierzchnią pożywki w dołku płytki testowej a końcem pióra plazmowego została ustalona na 25,00 ± 0,01 mm za pomocą elektrycznego wysokościomierza (ACCUD Europe, Vienna, Austria).

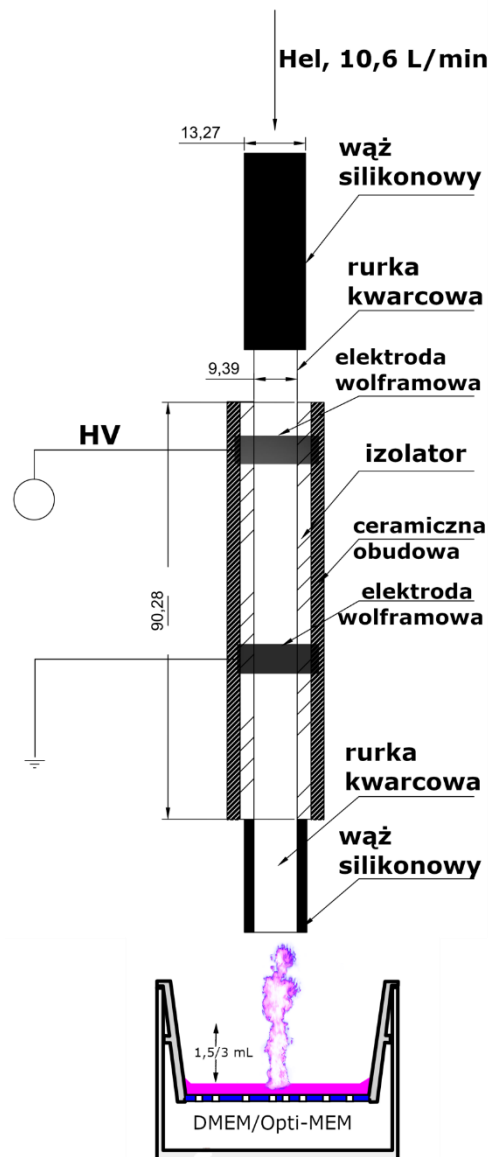
**Tabela 6.** Usystematyzowanie grup badawczych pożywek hodowlanych poddanych aktywacji zimną plazmą.

<b>Grupa</b>	<b>Pożywki hodowlane aktywowane zimną plazmą, sposób przygotowania</b>
Kontrola I	Komórki inkubowane w nietraktowanej, kompletnej pożywce DMEM
Kontrola II	Komórki inkubowane w nietraktowanej, kompletnej pożywce Opti-MEM
Grupa I	Komórki inkubowane w DMEM napromieniowanym w objętości 3,0 cm <sup>3</sup> , z dodatkiem 3% FBS
Grupa II	Komórki inkubowane w DMEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , z dodatkiem 3% FBS
Grupa III	Komórki inkubowane w DMEM napromieniowanym w objętości 3,0 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3% FBS
Grupa IV	Komórki inkubowane w DMEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3% FBS
Grupa V	Komórki inkubowane w Opti-MEM napromieniowanym w objętości 3,0 cm <sup>3</sup> , z dodatkiem 3% FBS
Grupa VI	Komórki inkubowane w Opti-MEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , z dodatkiem 3% FBS
Grupa VII	Komórki inkubowane w Opti-MEM napromieniowanym w objętości 3,0 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3% FBS
Grupa VIII	Komórki inkubowane w Opti-MEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3% FBS

### 6.3. Aktywacja pożywki hodowlanej

Do aktywacji pożywki hodowlanej zimną plazmą autorski układ wyładowczy (chroniony patentem P 429275) został zastosowany. Główną jego część stanowi korpus z żywicy epoksydowej E-57, w której umieszczono kwarcową kapilarę z dołączonymi dwoma elektrodami w kształcie pierścieni. Wnętrze epoksydowego korpusu zostało wypełnione materiałem izolującym CORIAN. Elektrody zostały podłączone generatora wysokich napięć o częstotliwości radiowej, z możliwością regulacji częstotliwości modulacji i wypełnienia. Z kolei głowica z kwarcową kapilarą została połączona za pomocą rurki silikonowej z przepływomierzem gazu. Jako gaz wyładowczy stosowano Hel 5.0 (Hel, 99,999 %) Regulację przepływu Helu w zakresie od 0 do 11,0 dm<sup>3</sup>/min realizowano za pomocą przepływomierza pływakowego. Wytworzenie stożka plazmy o temperaturze poniżej 40 °C - odpowiedniej do zastosowań biomedycznych, zostało uzyskane poprzez zastosowanie przepływu gazu wyładowczego 10,6 dm<sup>3</sup>/min (He), a także częstotliwości modulacji 2,14 kHz i wypełnienia 74,29 %. Z pomiarów charakterystyki prądowo-napięciowych dokonanych z wykorzystaniem wysokorozdzielczego 2-kanalowego cyfrowego oscyloskopu (Tektronix, TBS 1000, Beaverton, USA), ustalono napięcie – 6,0 kV, przebieg napięcia- kwadratowy, i ogólna częstotliwość- 66,45 kHz. Tak dobrane parametry umożliwiły wytworzenie stożka plazmy o temperaturze ok. 37 °C i długości jej widzialnej części 38,0 mm. (Rycina 5). Proces dobierania odpowiednich ustawień generatora z wykorzystaniem zaawansowanych metod statystycznych, został opisany w publikacji (Dzimitrowicz i wsp.,2020) a także podrozdziale 4.3. Dawka promieniowania zimną plazmą a uzyskiwana odpowiedź biologiczna. Wymienione grupy pożywek hodowlanych zostały wystawione na ekspozycję zimnej plazmy w różnym czasie. Tak przygotowane na świeżo próbki (z dodatkiem 3% FBS przed lub po napromieniowaniu)

zostały zebrane w oddzielnych probówkach, w objętościach niezbędnych do przeprowadzenia dalszych badań i pomiarów.



**Rycina 5.** Autorski układ reakcyjno-wyładowczy, generujący zimną plazmę atmosferyczną wykorzystany do aktywowania pożywki hodowlanej DMEM lub Opti-MEM. Główne elementy pióra plazmowego zostały przedstawione i wyszczególnione.

#### 6.4. Badanie aktywności metabolicznej komórek – test MTT

Określenie wpływu wybranej pożywki hodowlanej poddanej aktywacji zimną plazmą na aktywność metaboliczną komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231, oraz MCF-10A jako kontrolę negatywną, przeprowadzono z wykorzystaniem testu MTT. Polega on na wykorzystaniu zdolności enzymu – dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcenia soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy, MTT) o kolorze pomarańczowym w ciemnoniebieski produkt – formazan. Rozpuszczając formazan

w roztworze DMSO, uzyskujemy barwną zawiesinę, której głębokość absorpcji przy długości fali 570 nm jest wprost proporcjonalna do aktywności mitochondrialnej badanych układów *in vitro*. Analizę przeprowadzono w następujący sposób: komórki w liczbie  $5 \times 10^3$  na dołek płytki testowej 96-dołkowej, zostały przeniesione i zawieszono w objętości  $0,1 \text{ cm}^3$  kompletnej pożywki hodowlanej. Tak przygotowane płytki testowe były inkubowane przez 24 godziny, następnie ostrożnie opróżnione ze starej pożywki, a dalej uzupełnione o objętość  $0,1 \text{ cm}^3$  jednej z pożywek hodowlanych nietraktowanych (Tabela 6) lub pożywek aktywowanych zimną plazmą (Tabela 6, Grupy I-VIII). Płytki testowe uzupełnione o wybrane pożywki aktywowane zimną plazmą były inkubowane w warunkach standardowych tj. w inkubatorze, utrzymując temp.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  w atmosferze powietrza z dodatkiem 5%  $\text{CO}_2$  przez określony czas – 0 dni, 1 dzień i 2 dni. Po zakończonym okresie inkubacji,  $0,01 \text{ cm}^3$  odczynnika MMT było wprowadzane do każdego przygotowanego dołka płytki testowej, osiągając stężenie  $10 \text{ mg/cm}^3$ . Tak uzyskane zawiesiny były inkubowane przez 3 godziny w inkubatorze (warunki standardowe j.w.), utrzymując pełne zaciemnienie. Dołki następnie zostały całkowicie opróżnione i osuszone, a celem rozpuszczenia utworzonych kryształów formazanu, do każdego dołka zostało wprowadzone  $0,1 \text{ cm}^3$  roztworu DMSO (Dimetylosulfotlenek, POCH SA., Gliwice, Polska). W celu sprawdzenia różnic głębokości uzyskanego niebieskiego zabarwienia zmierzono wartości absorpcji przy długości fali 570 nm, wykorzystano w tym celu czytnik płytek testowych Victor 2 (Perkin Elmer, Vaughan, Kanada). Aby uzyskać wystarczającą liczbę danych do prowadzenia analizy statystycznej, każde doświadczenie było przeprowadzone w trzykrotnych powtórzeniach, dla trzech niezależnych eksperymentów.

### **6.5. Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania**

Aby ocenić w jaki sposób pożywki hodowlane poddane napromieniowaniu zimną plazmą wpływa na ruchliwość wybranych modeli *in vitro*, przeprowadzono test zarysowania. Badane linie komórkowe tj. MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A zostały osadzone w liczbie  $1,5 \times 10^5$  komórek na oddzielne dołki płytki testowej – 24 dołkowej, zawieszając je w objętości  $0,35 \text{ cm}^3$  kompletnej pożywki hodowlanej Opti-MEM, a następnie zostały inkubowane przez 24 godz. w inkubatorze (warunki standardowe). Po uzyskaniu jednolicie pokrytej powierzchni dołka przez odpowiednie komórki, powierzchnia została zarysowana sterylną końcówką  $0,2 \text{ cm}^3$  mikropipety automatycznej, uzyskując w ten sposób pojedynczą rysę przechodzącą przez środek dołka. Odklejone komórki w wyniku przeprowadzonego zarysowania, zostały usunięte wraz z objętością

starej pożywki. Przyklejone komórki na dnie dołków płytki testowej zostały wypełnione objętością  $0,35 \text{ cm}^3$  określonej pożywki hodowlanej (Tabela 6) lub pożywki poddanej działaniu zimnej plazmy (Tabela 6, Grupy IV i VIII) o czasie ekspozycji 180 s lub 210 s. Tak przygotowane 24-dołkowe płytki testowe były przechowywane przez 30 godz. w inkubatorze (warunki standardowe). Obserwacja migracji komórek była możliwa poprzez rejestrację zdjęć cyfrowych po czasie 0, 2, 8, 24 i 30 godz. od rozpoczęcia testu, wykorzystując w tym celu kamerę CCD dołączoną do mikroskopu optycznego (powiększenie 4x). Zdjęcia były rejestrowane każdorazowo w tym samym miejscu, lokalizując środkowy fragment naniesionego zarysowania. Obszar zarastania warstwy komórkowej był obliczany z wykorzystaniem oprogramowania ZEN 3.1 Blue edition (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Niemcy), a wyniki przedstawione jako względne zamknięcie rany (RWC [%], ang. *Relative Wound Closure*), opisane w literaturze (Beyeler i wsp., 2014). Na potrzeby analizy statystycznej, doświadczenie przeprowadzano w duplikatach, dla trzech niezależnych eksperymentów.

#### **6.6. Badanie apoptozy komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny**

Dalszym etapem prowadzonych prac, było zbadanie wpływu uzyskanej pożywki hodowlanej na możliwe wywołanie apoptozy/nekrozy w wybranych modelach raka piersi *in vitro* tj. MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A. Przeprowadzono zatem barwienia komórkowe, wykorzystując w tym celu Aneksynę V i Jodek Propidyny (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection kit APC, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, USA) (Van Engeland i wsp., 1998; Crowley i wsp., 2016). Doświadczenie zostało przeprowadzone następująco: wybrane modele biologiczne zostały umieszczone na odpowiednich, oddzielnych dołkach płytek testowych, 24-dołkowych z zachowaniem liczby  $1,5 \times 10^5$  komórek na dołek zawieszając je w  $0,35 \text{ cm}^3$  kompletnej pożywce Opti-MEM. Tak osadzone komórki na płytkach testowych zostały umieszczone w inkubatorze (warunki standardowe) przez okres 30 godzin. Po czasie inkubacji, dołki zostały ostrożnie osuszone ze starej pożywki i zastąpione objętością  $0,35 \text{ cm}^3$  świeżo przygotowanej pożywki hodowlanej napromieniowanej zimną plazmą w czasie 210 s (Tabela 6, Grupy IV i VIII). W przypadku komórek z grup kontrolnych zostały one zawieszane w objętości  $0,35 \text{ cm}^3$  nietraktowanej, kompletnej pożywki hodowlanej. Czas ekspozycji omawianych modeli *in vitro* na wybrane pożywki został ustalony na: 0 dni, 1 dzień i 2 dni. Po określonym czasie inkubacji komórki zostały zebrane z ustalonych dołków płytek testowych z użyciem roztworu 0,05% Trypsyny i 0,02% EDTA do odpowiadających plastikowych probówek

okrągłodennych typu FALCON. W kolejnym etapie, komórki w probówkach zostały przemyte 1,00 cm<sup>3</sup> roztworu PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, USA), i odwirowane z prędkością 1200 rpm. Uzyskany pellet komórkowy został następnie zawieszony w 1,00 cm<sup>3</sup> roztworu buforu wiążącego (Binding buffer 10X, sporządzonego zgodnie z zaleceniami producenta) i ponownie odwirowany w 1200 rpm. Pellet komórkowy po usunięciu supernatantu został zdyspergowany i zawieszony w roztworze Aneksyny V (zgodnie z zaleceniem producenta), pozostawiając zawiesinę w zaciemnieniu przez 15 min. Po zakończeniu inkubacji z roztworem Aneksyny V, do probówek dodano 1,00 cm<sup>3</sup> roztworu buforu wiążącego celem jego przemycia i odwirowania w 1200 rpm. Końcowym etapem oznaczenia było usunięcie supernatantu i zawieszenie komórek w probówce w 0,20 cm<sup>3</sup> roztworu jodku propidyny (zgodnie z zaleceniami producenta). Tak przygotowane zawiesiny komórkowe były utrzymywane w niskiej temperaturze, przechowując je w łaźni lodowej. Zabarwione komórki zostały następnie analizowane przy użyciu cytometru przepływowego FACS-Calibur (Becton-Dickinson, New York, USA). Populacje komórek: apoptotycznych (pozytywna Aneksyna V i negatywny jodek propidyny), nekrotycznych (negatywna Aneksyna V i pozytywny jodek propidyny), oraz komórek żywych (negatywna Aneksyna V i negatywny jodek propidyny) zostały oznaczone z wykorzystaniem trybu pomiarowego FL4 ( $\lambda_{em}=660$  nm) i FL2 ( $\lambda_{em}=535$  nm). Uzyskane wyniki pomiarowe analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Flowing Software 2 (Flowing Software ver. 2.5.1, Flowing Software, Turku, Finlandia). Na potrzeby analizy statystycznej, doświadczenie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, dla trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki zostały opracowane i prezentowane jako wartości średnie  $\pm$  SD.

## **6.7. Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie gazowej – pomiary OES**

Celem wyjaśnienia przyczyn uzyskiwanej aktywności biologicznej względem analizowanych modeli *in vitro* poddanych działaniu pożywki hodowlanej napromieniowanej zimną plazmą, przeprowadzono jakościowe i ilościowe pomiary RFT i RFA. Oznaczenie tych reaktywnych form generowanych w fazie gazowej, obejmującej obszar kontaktu pomiędzy powierzchnią traktowanej pożywki a stożkiem zimnej plazmy, został przeprowadzony z wykorzystaniem Optycznej Spektroskopii Emisyjnej (OES, ang. *Optical Emission Spectroscopy*). Promieniowanie emitowane przez plazmę DBD było ogniskowane za pomocą soczewki achromatycznej UV (f=60) na szczelinę wejściową (10  $\mu$ m) spektrometru Shamrock SR-500i (Andor, Belfast, Wielka Brytania). Analizowano

obszar promieniowania kontaktu plazmy z pożywką (wzbogaconej o suplementy  $100 \text{ U/cm}^3$  penicyliny i  $100 \mu\text{g/cm}^3$  streptomycyny) w objętości  $1,50 \text{ cm}^3$  i stożkiem zimnej plazmy. Spektrometr OES wyposażony był w dwie siatki holograficzne ( $1800$  i  $1200$  linii na  $\text{nm}^{-1}$ ) oraz kamerę CCD, model Newton DU-920P-0E (Andor, Wielka Brytania). Parametry operacyjne i pomiary zostały zrealizowane z użyciem oprogramowania Solis S (Andor, Belfast, Wielka Brytania). Kamera CCD pracowała w trybie całkowitego zbierania danych (FVB) przy czasie integracji  $1 \text{ s}$ . Widma OES zostały zarejestrowane w zakresie  $200 - 900 \text{ nm}$ . W przypadku zakresu spektralnego powyżej  $400 \text{ nm}$ , stosowano filtry PG-5 (Zeiss Jena, Niemcy) celem eliminacji widm promieniowania wyższych rzędów.

### **6.8. Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne**

Analiza jakościowa i ilościowa zawartości RFT i RFA w traktowanych zimnymi plazmami pożywkach hodowlanych została wykonana z wykorzystaniem technik kolorymetrycznych. Za pomocą tych testów potwierdzono obecność jonów  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  w pożywkach hodowlanych pozbawionym czerwieni fenolowej (czas traktowania  $180 \text{ s}$ ), która mogła by zaburzyć prowadzone pomiary kolorymetryczne. Wybrane oznaczenia przeprowadzono w poniższy sposób. Zawartość jonów  $\text{NO}_2^-$  oznaczono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu spektrofotometrycznego HI 96708 (HANNA Instruments, Olsztyn, Polska) wraz z odczynnikami dostarczonymi przez producentów. Próbkę pożywek hodowlanych pozbawionego czerwieni fenolowej poddano napromieniowaniu w czasie  $180 \text{ s}$  w objętości  $1,50 \text{ cm}^3$  każdorazowo celem uzyskania końcowej objętości  $5,0 \text{ cm}^3$  do analizy. Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z instrukcjami dołączonymi przez producenta, jako kontrolę pozytywną wykorzystując pożywki hodowlane niepoddane traktowaniu. Do oznaczenia zawartości  $\text{NO}_3^-$  wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw spektrofotometryczny HI 96728, wraz z odczynnikami rekomendowanymi przez producenta (HANNA Instruments, Olsztyn, Polska). Metodyka prowadzonych pomiarów była identyczna z tą z oznaczenia zawartości  $\text{NO}_2^-$ , przestrzegając instrukcji zapewnianych przez wytwórców zestawu pomiarowego. Na potrzeby analiz statystycznych, wyniki zebrano z trzech niezależnych eksperymentów.

Do wyznaczenia stężenia jonów  $\text{NH}_4^+$  w pożywce poddanej działaniu zimnej plazmy wykorzystano metodę opartą na reakcji z odczynnikiem Nesslerera (Morrison, 1971). Absorbancję produktów wytworzonych pomiędzy jonami oznaczanymi odczynnikiem



Nesslera ( $K_2Hg_2I_4$ ) oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 420 nm, wykorzystując spektrofotometr UV/Vis Specord 210 Plus (Analytik Jena AG, Jena, Niemcy). Uzyskane wyniki pomiarowe zostały odniesione do sporządzonej krzywej kalibracji złożonej z 5 punktów pomiarowych. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano pożywki hodowlane niepoddane ekspozycji zimnej plazmy. Na potrzeby analiz statystycznych, wyniki zebrano z trzech niezależnych eksperymentów.

Oznaczenie zawartości nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w przygotowanych próbkach pożywek napromieniowanych zimną plazmą, dokonano za pomocą metody opartej o reakcję z metawanadanem amonu (Rubio-Clemente i wsp., 2017). W tym celu przygotowano roztwór, w którym zmieszano  $NH_4VO_3$  o stężeniu  $6,2 \text{ mmol/dm}^3$  z  $H_2SO_4$  o stężeniu  $0,058 \text{ mol/dm}^3$ . Oznaczenie zawartości  $H_2O_2$  przeprowadzono w pożywkach hodowlanych o różnej zawartości składników odżywczych tj. DMEM (bez czerwieni fenolowej, Opti-MEM bez czerwieni fenolowej i DPBS), poddanych działaniu zimnej plazmy w czasie 180 s, a dodatek 3% FBS był wprowadzany zarówno przed traktowaniem lub po jego zakończeniu. Następnym etapem przeniesiono  $2,50 \text{ cm}^3$  analizowanej pożywki do kolby miarowej objętości  $25,00 \text{ cm}^3$ , dodano  $2,50 \text{ cm}^3$  roztworu  $NH_4VO_3$  z  $H_2SO_4$  i uzupełniono kolbę miarową do kreski z użyciem wody dejonizowanej. Po upływie 5 min od przyrządzenia mieszaniny i jej dokładnym wymieszaniu zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm, wykorzystując wcześniej wspomniany spektrofotometr. Uzyskane wartości absorbancji zostały odniesione do krzywej kalibracji złożonej z 5 punktów (0, 1, 3, 5 i  $6 \text{ mg/cm}^3$ ) przygotowanej w identyczny sposób w jaki analizowano traktowane pożywki hodowlane. Jako kontrolę wykorzystano wspomniane pożywki, które nie zostały poddane napromieniowaniu. Wyniki zostały zebrane z 3 niezależnych powtórzeń.

### **6.9. Badanie przestrzennej dystrybucji reaktywnych form tlenu – pomiary jodku potasu ze skrobią**

Do sprawdzenia, w jaki sposób następuje przestrzenna generacja i dystrybucja RFT generowanych w trakcie wyładowania zimnej plazmy, przeprowadzono pomiary z wykorzystaniem żelowych modeli. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną, roztwarzając 0,3% (m/v) jodku potasu, 0,5% (m/v) skrobi i 1,2% agaru bakteriologicznego (m/v) w objętości  $200 \text{ cm}^3$ , utrzymując przygotowaną zawiesinę na mieszadle magnetycznym z prędkością mieszania 1000 rpm i temperaturą  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ . Roztwór ogrzewano do momentu uzyskania klarownego roztworu, utrzymującego się przez ponad 5 min.

Następnym etapem klarowny roztwór został przeniesiony w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> do dołków, płytki testowej 12-dołkowej i pozostawiony do zastygnięcia, tj. do osiągnięcia temperatury pokojowej. Tak przygotowane modele żelowe zostały umieszczone pod ujściem pióra plazmowego w jego centralnym położeniu, ustalając odległość od traktowanej powierzchni na 30,00, 25,00 i 20,00 mm. Czas napromieniowania powierzchni źródłem zimnych plazm został wybrany na 60, 120 i 180 s. Żelowe modele po ich napromieniowaniu zostały wyjęte z płytek testowych, sfotografowane i poddano analizie graficznej z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ 1.8.0 (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA). Podobną analizę przeprowadzono sporządzając roztwór zawierający 0,3% (m/v) jodku potasu, 0,5% (m/v) skrobi w objętości 200 cm<sup>3</sup>, przygotowując w sposób identyczny do tego opisanego powyżej. Następnym etapem klarowny roztwór został przeniesiony w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> do dołków, płytki testowej 12-dołkowej i pozostawiony do osiągnięcia temperatury pokojowej. Tak przygotowane mieszaniny reakcyjne były umieszczane pod głowicą plazmy w jego centralnym położeniu, ustalając odległość od traktowanej powierzchni na 25,00 mm. Czas napromieniowania został wybrany na 180 s. Podczas napromieniowania prowadzona była obserwacja całej objętości dołka płytki testowej.

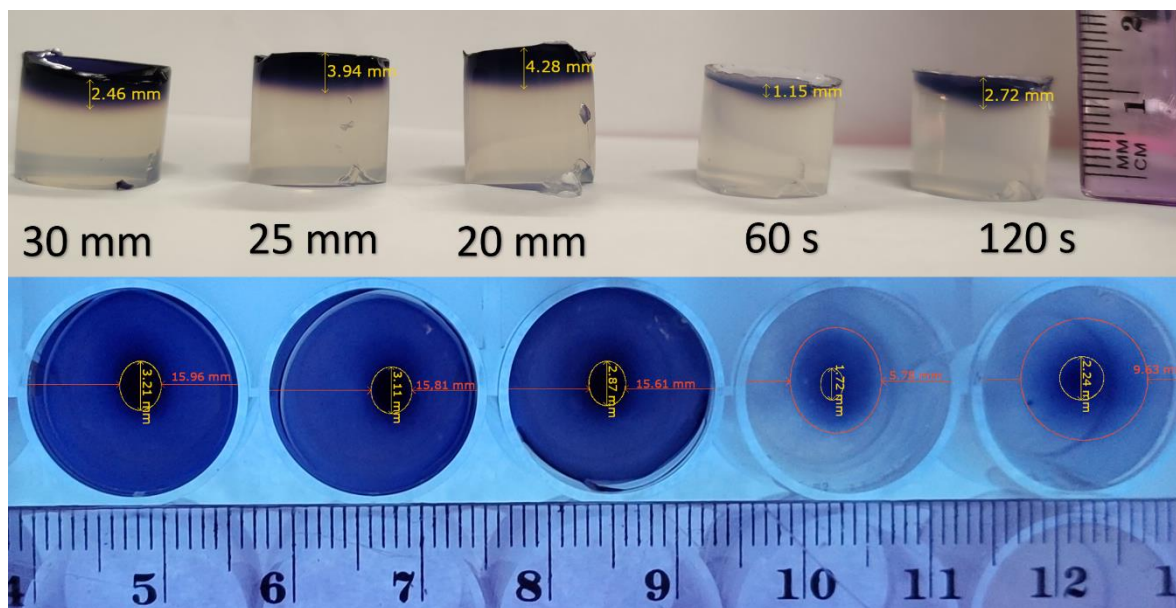
Graficzne przedstawienie wyników pomiarowych zrealizowanych w pracy, a także poddanie ich statystycznej analizie przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Porównanie wyników eksperymentalnych pomiędzy grupami badanymi a kontrolą negatywną uzyskanych dla testów biologicznych, zostały zrealizowane z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc. Analiza statystyczna wyników uzyskanych dla analiz ilościowych i jakościowych reaktywnych form tlenu i azotu przeprowadzono porównując średnie wartości kontroli do wyników grup badanych z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy ANOVA z porównywaniem ich parami między badanymi grupami testem Tukeya post hoc.

## **7. Wyniki i dyskusja dla pośredniego zastosowanie układu zimnej plazmy**

### **7.1. Aktywacja pożywki hodowlanej**

Wybrane pożywki hodowlane tj. DMEM i Opti-MEM z dodatkiem GlutaMAXX zostały poddane napromieniowaniu zimną plazmą zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale **6.3. Aktywacja pożywki hodowlanej**, wykorzystując wspomniany nowatorski układ reakcyjno-wyładowczy. Pożywki hodowlane poddane aktywności zimnej plazmy nie

wykazały widocznych zmian w morfologii i kolorze po napromieniowaniu w czasie 30, 45, 90, 120, 150, 180 i 210 s. Jednakże jedyną odnotowaną zmianą po zakończonym procesie napromieniowania zimnymi plazmami była redukcja objętości uzyskanej pożywki o około 13% dla objętości wyjściowej 3,00 cm<sup>3</sup> i 20% dla objętości wyjściowej 1,50 cm<sup>3</sup>. Obserwowane zmniejszenie objętości wskutek procesu napromieniowania zimną plazmą należy upatrywać w tworzeniu aerozoli cząsteczek ciekłej pożywki ze strumieniem helu, a także w niewielkim stopniu jako efekt odparowania cieczy, związany oddziaływaniem pomiędzy rozpędzonymi elektronami generowanymi w trakcie wyładowań barierowych a powierzchnią traktowanych cieczy. Ubytek objętości traktowanej pożywki w wyniku oddziaływań termalnych został wykluczony ze względów na niewielkie zmiany temperatury, wynoszące 1,8 °C (temperatura wyjściowa 21,7 °C, temperatura po traktowaniu 23,5 °C). Zbadano również, w jaki sposób reaktywne formy tlenu generowane podczas napromieniowania zimną plazmą rozchodzą się w przestrzeni, celem sprawdzenia konieczności mieszania roztworów podczas ich traktowania oraz mechanizmu wytwarzania w sposób ciągły RFT. Z uzyskanych wyników stwierdzono brak konieczności mieszania zawartości dołków płytki testowej podczas traktowania zimną plazmą, ze względu na konieczność postępu reakcji kaskadowych, które zachodzą w bezpośrednim sąsiedztwie traktowanego obszaru. Widoczne pogłębienie koloru niebieskiego wraz z wydłużeniem czasu napromieniowania modeli żelowych, wynika głównie ze zwiększonej generacji RFT. Średnica obszaru uzyskania reakcji kolorotwórczej dla czasu traktowania 60 s wyniosła 5,78 mm, dla 120 s była równa 9,63 mm, a dla czasu 180 s wynosiła 15,81 mm. Zaobserwowano ponadto, że zmniejszenie odległości do traktowanej powierzchni przyczynia się do zmniejszenia średnicy obszaru o największym stopniu przereagowania, a tym samym największej akumulacji stężenia reaktywnych form tlenu. Odwrotna zależność została zaobserwowana pod względem głębokości penetracji generowanych form, gdzie wraz ze zmniejszeniem odległości od traktowanej powierzchni uzyskano zwiększoną głębokość obszaru przereagowanego, uzyskując 2,46 mm dla odległości 30,00 mm od powierzchni i 4,28 mm dla odległości 20 mm (Rycina 6). Celem uzyskania pośrednich wyników wytwarzania reaktywnych form tlenu, opierając się o graficznie dokonane analizy, wybrano odległość od traktowanej powierzchni na 25,00 mm. Podobną zależność zaobserwowano również podczas doświadczenia traktowania roztworu zawierającego jodek potasu ze skrobią, gdzie przy jednakowym czasie napromieniowania, potwierdzono uzyskanie wyższej intensywności niebieskiego zabarwienia dla roztworów niepoddanych mieszanii w trakcie napromieniowania.



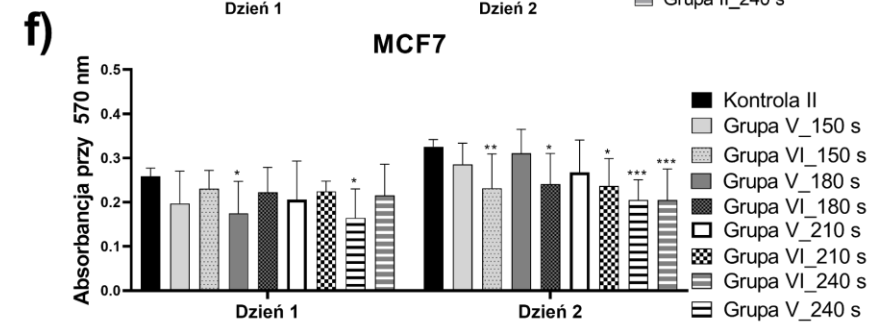
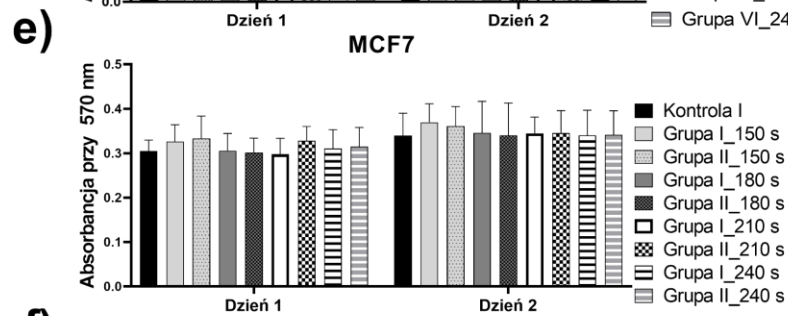
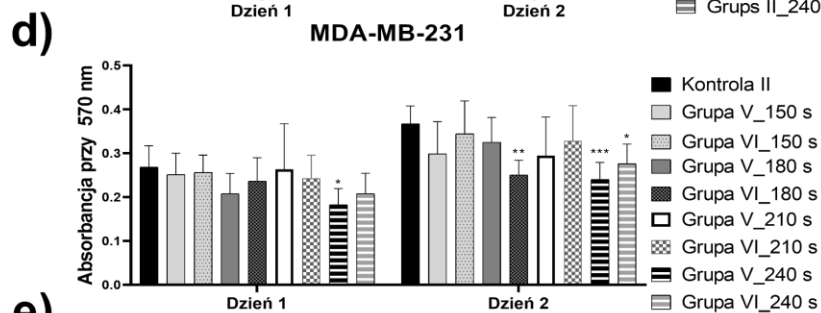
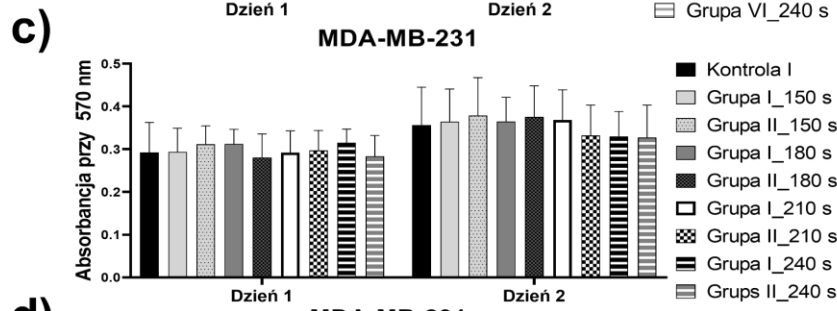
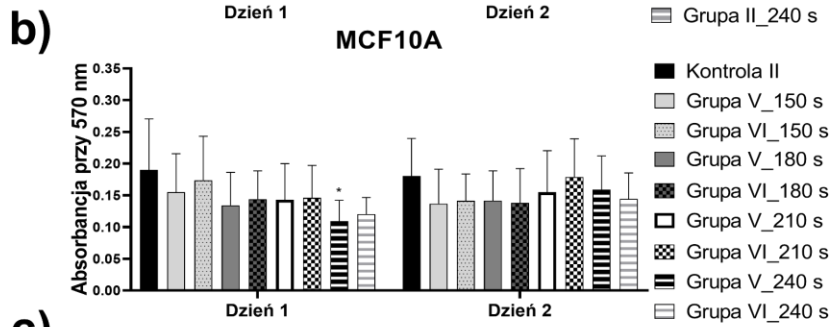
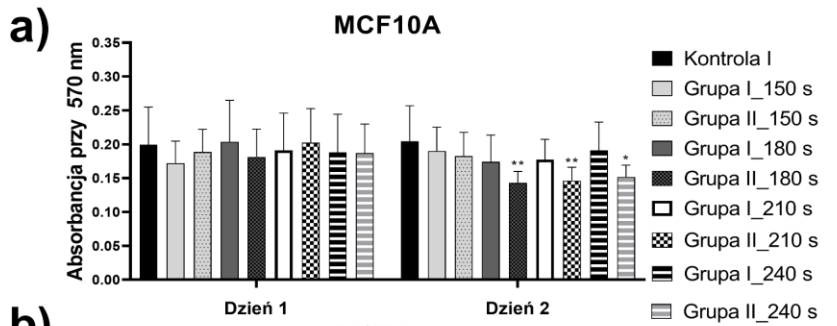
**Rycina 6.** Graficzna prezentacja przestrzennej dystrybucji Reaktywnych Form Tlenu (RFT) generowanych wskutek oddziaływania źródła zimnej plazmy na powierzchni modeli żelowych Jodku potasu ze skrobią. Modele żelowe zostały poddane napromieniowaniu w czasie 180 s, zachowując odległość od pióra plazmowego 30, 25 i 20 mm, a także utrzymując odległość 25 mm, czas ekspozycji został dobrany na 60 i 120 s.

Tak dobrane eksperymentalnie warunki napromieniowania pożywek hodowlanych, a także parametry prądowo – napięciowe umożliwiające generację zimnej plazmy tj. przepływ helu –  $10,6 \text{ dm}^3/\text{min}$ , częstotliwość modulacji  $2,14 \text{ kHz}$  i wypełnienie  $74,29 \%$  zostały wykorzystane do przygotowania poszczególnych próbek, których aktywność biologiczna zostanie omówiona w dalszej części niniejszej rozprawy. Do przeprowadzenia poszczególnych testów biologicznych, wykorzystano określone objętości pożywek hodowlanych napromieniowanych zimną plazmą, które uzyskano poprzez wielokrotne przygotowanie porcji odpowiednio  $3,00$  i  $1,50 \text{ cm}^3$ , pamiętając o utracach objętości wraz z procesem napromieniowania.

## **7.2. Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na aktywność metaboliczną komórek – test MTT**

Żywotność komórek wystawionych na kontakt pożywki hodowlanej poddanej aktywacji zimną plazmą została określona testem MTT. Minimalna dawka toksyczna dla komórek stanowiących kontrolę negatywną (MCF-10A) została określona jako czas napromieniowania pożywki, prowadzący do obniżenia aktywności mitochondrialnej. Zaburzenia żywotności zostały odnotowane jedynie w przypadku, gdy 3% dodatek FBS był obecny w DMEM i Opti-MEM podczas traktowania zimną plazmą (Rycina 7). Odwrotną sytuację zaobserwowano, gdy wprowadzano dodatek 3% FBS po napromieniowaniu pożywki zimną plazmą, uzyskując wysoką odporność komórek linii MCF-10A na

aktywność tak przygotowanych pożywek hodowlanych. Niewielka podatność komórek linii MCF-10A na traktowanie zimnymi plazmami w sposób pośredni lub bezpośredni została również zbadana i omówiona przez inne zespoły naukowców (Mokhtari i wsp., 2019; Mirpour i wsp., 2014; Xiang i wsp., 2018). Celem ustalenia minimalnego czasu traktowania pożywek mogących doprowadzić do zaburzeń aktywności mitochondrialnej i zmniejszenia zdolności proliferacji, przeprowadzono badania wstępne względem wybranych modeli *in vitro* tj. MCF-7 i MDA-MB-231. Ustalono, że dla krótszych czasów napromieniowania tj. 45-150 s, nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w aktywności mitochondrialnej badanych linii komórkowych (Rycina 7). Dla dalszej realizacji badań wydłużono czas napromieniowania pożywek zimną plazmą do 150, 180, 210 i 240 s. a uzyskane wyniki przedstawiono poniżej (Rycina 7). Wybrane rodzaje pożywek (Tabela 6, Grupy V i VI), doprowadziły do uzyskania znaczących zaburzeń w żywotności badanych modeli *in vitro* nowotworu piersi. Komórki linii MDA-MB-231 i MCF-7 wykazały znaczące zmiany w aktywności mitochondrialnej (\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0004$ ). Komórki linii MDA-MB-231 inkubowane przez 24 godziny w pożywce hodowlanej Opti-MEM, doprowadzając do uzyskania statystycznie istotnego zaburzenia zdolności do proliferacji. Wydłużając czas ekspozycji komórek linii MDA-MB-231 do 48 godzin, Opti-MEM napromieniowane przez 180 i 240 s doprowadziło do znaczących zaburzeń w aktywności mitochondrialnej komórek. Dla badań przeprowadzonych względem linii komórkowej MCF-7, inkubowanych w czasie 24 godzin, widoczne zmiany w tempie proliferacji zaobserwowano dla czasu aktywacji pożywki wynoszącego 180 i 240 s. Efekt zaburzenia aktywności mitochondrialnej został spotęgowany po 48 godzinach prowadzenia doświadczenia, wykorzystując Opti-MEM aktywowane w czasie 150, 180, 210 i 240 s (\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , odpowiednio). Opierając się na przedstawionych wynikach, podejrzewać należało, że zmniejszenie objętości pożywki poddawanej napromieniowaniu, prowadziło do zwiększenia akumulacji reaktywnych form tlenu i azotu, wywołując tym samym wzmożoną odpowiedź względem badanych modeli biologicznych (Grupy I, II, V i VI). Ponadto poprzez zwiększenie zawartości FBS w pożywkach hodowlanych poddawanych napromieniowaniu zimną plazmą tj. Opti-MEM, potwierdzono wzrost uzyskiwanej biotoksyczności. Dobierając odpowiedni rodzaj pożywki hodowlanej, a także czas napromieniowania 180 s, uzyskano wyniki odpowiedzi biologicznej określone mianem minimalnej dawki toksycznej.

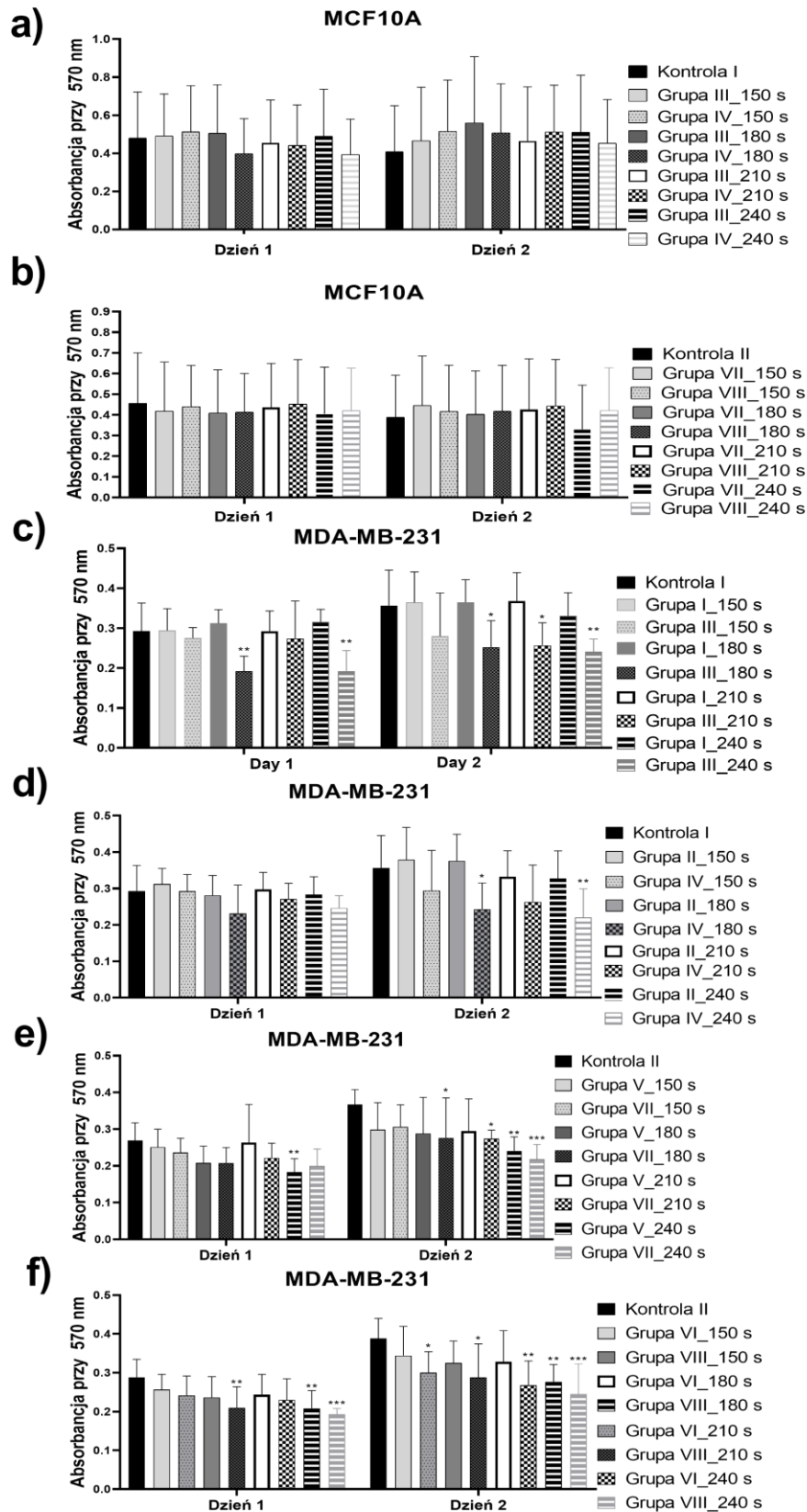


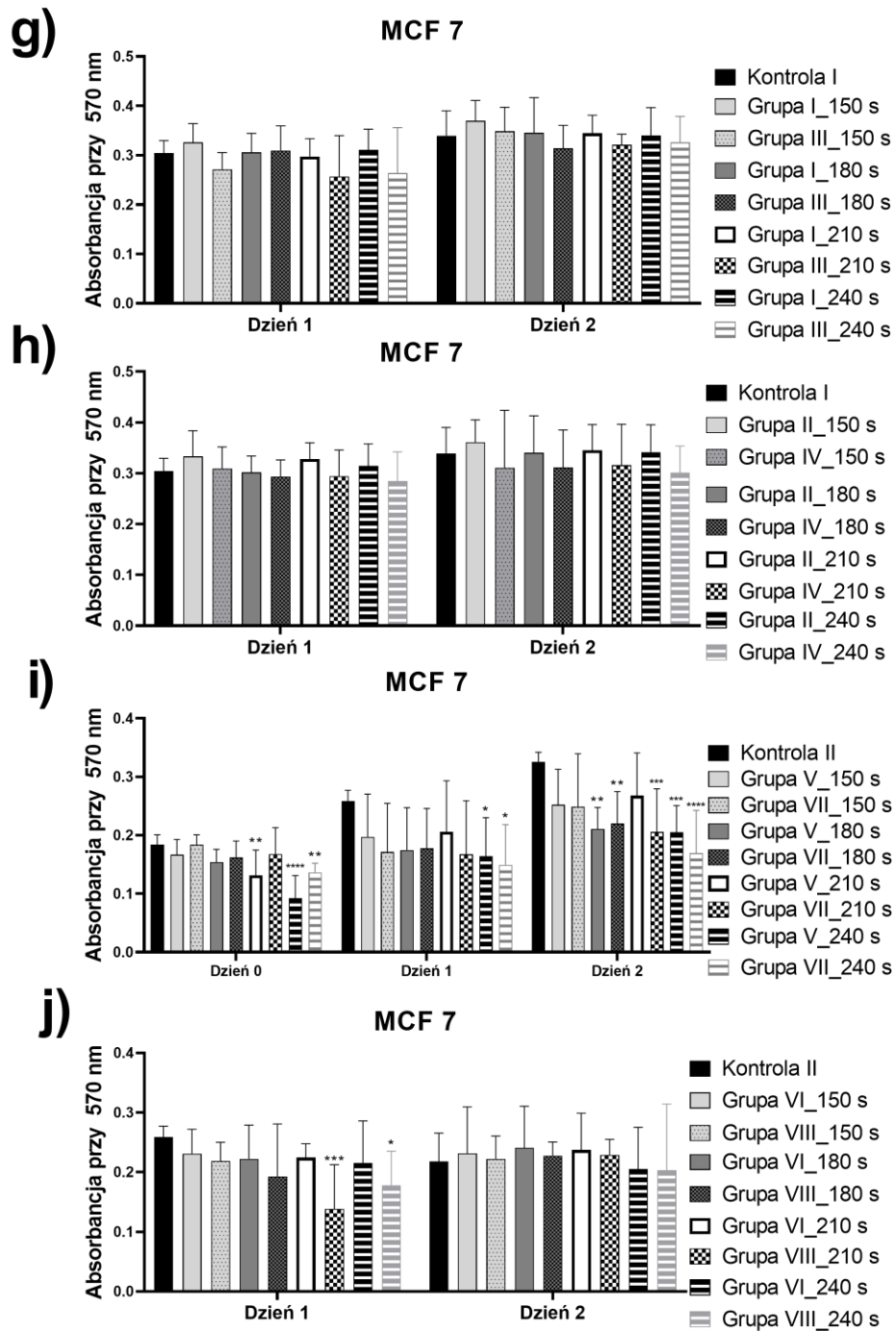
**Rycina 7.** Pomiary żywotności komórek ludzkiej linii nowotworowej o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiej linii nowotworowej o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7, a także nienowotworowej ludzkiej linii MCF-10A za pomocą testu MTT, poddanych inkubacji w okresie od 0 do 2 dni w pożywkach hodowlanych aktywowanych zimną plazmą (czas ekspozycji 150, 180, 210 i 240 s). Grafy a, c, e uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> (Grupa I) lub 1,5 cm<sup>3</sup> (Grupa II) pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą. Grafy b, d, f uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231 i MCF-7 inkubowane w 3,0 cm<sup>3</sup> (Grupa V) lub 1,5 cm<sup>3</sup> (Grupa VI) pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą. W obydwu przypadkach, FBS był wprowadzany do analizowanej pożywki przed traktowaniem zimną plazmą. Jako kontrolę, komórki nietraktowane przez pożywki aktywowane zimną plazmą zostały wykorzystane (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II- nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,01; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0004).

Zdolność zahamowania tempa proliferacji za pomocą zimnych plazm atmosferycznych jest również obiektem badań innych zespołów badawczych. Praca realizowana w zespole Bekeschus (Bekeschus i wsp., 2019) skupiała się na bezpośrednim napromieniowaniu komórek linii nowotworowych MDA-MB-231 i SW 480 źródłem zimnych plazm atmosferycznych, zawieszonych w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS. Uzyskane wyniki wskazywały na statystycznie istotną redukcję żywotności komórek nowotworowych. Xiang wraz z zespołem wykazali, że pożywki hodowlane napromieniowane przez zimną plazmę atmosferyczną – DMEM i DMEM/F-12, wykazały selektywność oddziaływania względem komórek nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania (Xiang i wsp., 2018). Ponadto wykazano, że wykorzystanie pożywki poddanej działaniu zimnych plazm atmosferycznych względem komórek linii MCF-10A i MCF-7, doprowadziła do nieznacznego zwiększenia aktywności mitochondrialnej. Nieco odmienne wyniki badań zostały przedstawione przez Mokhtari wraz z zespołem, gdzie podjęto się określenia aktywności biologicznej pożywki DMEM poddanej działaniu zimnych plazm atmosferycznych względem komórek nowotworu piersi – MCF-7, SKBR3, ludzkiego nowotworu płuc A-549, ludzkiego nowotworu jelita SW742, ludzkiego nowotworu wątroby ASPC-1, oraz pierwotnych komórek kostniakomięsaka G-292. Jako modele kontroli negatywnej, komórek nienowotworowych wybrano linie MCF-10A, FMGB-1. Udowodniono, że pożywki hodowlane poddane działaniu zimnych plazm atmosferycznych wykazały znaczącą redukcję żywotności komórkowej komórek linii MCF-7, podczas gdy komórki linii MCF-10A pozostały nietknięte negatywnym oddziaływaniem dla krótszych czasów traktowania. Wspomniane modele biologiczne tj. komórki linii MCF-7 i MCF-10A, poddanie bezpośredniemu napromieniowaniu źródłem zimnych plazm atmosferycznych w czasie 60 s. doprowadziło do znacznego obniżenia tempa proliferacji komórek linii MCF-7, podczas gdy dla komórek linii MCF-10A nie

stwierdzono negatywnego wpływu. Rozpatrując doniesienia literaturowe dotyczące maskującego efektu FBS na reaktywne formy tj.  $\text{OH}^\bullet$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mokhtari i wsp., 2019), przeprowadzone zostały dodatkowe doświadczenia, w których FBS było wprowadzane natychmiastowo po napromieniowaniu zimną plazmą. Wybrane pożywki hodowlane poddane napromieniowaniu zimną plazmą w czasie 150, 180, 210 i 240 s., do których FBS był dodawany natychmiast po aktywacji (Grupy III, IV, VII i VIII) zostały wykorzystane do określenia zmian aktywności mitochondrialnej względem komórek linii MDA-MB-231 i MCF-7 (Rycina 8).







**Rycina 8.** Porównanie wpływu dodatku FBS do pożywek po procesie aktywacji zimną plazmą na zdolność do proliferacji ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiego nowotworu piersi o niewielkiej zdolności przerzutowania MCF-7, ludzkiej nienowotworowej linii MCF-10A. Wspomniane linie komórkowe były inkubowane w pożywce aktywowanej plazmą w czasie 150, 180, 210 i 240 s. Grafy a, c, g uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa I) lub bez dodatku FBS (Grupa III). Grafy a, d, h uwzględniają linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231 i MCF-7 inkubowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa II) lub bez dodatku FBS (Grupa IV). Grafy b, e, i uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa V) lub bez dodatku FBS (Grupa VII). Grafy b, f, j uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7 inkubowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup>

pożywki Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą z dodatkiem FBS (Grupa VI) lub bez dodatku FBS (Grupa VIII). W obydwu przypadkach, FBS był wprowadzany do analizowanej pożywki przed traktowaniem zimną plazmą. Jako kontrolę, komórki nietraktowane przez pożywki aktywowane zimną plazmą zostały wykorzystane (Kontrola I – nietraktowana żywka DMEM, Kontrola II- nietraktowana żywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\*  $p < 0,013$ ; \*\*  $p < 0,0014$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Porównując wyniki uzyskane dla komórek linii MDA-MB-231 inkubowanych w DMEM aktywowanym plazmą w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> (bez dodatku 3 % FBS), stwierdzono statystycznie istotne zaburzenie żywotności komórek dla czasu traktowania pożywki wynoszącym 180 i 240 s podczas pierwszej doby prowadzonego eksperymentu (\*\*  $p < 0,0014$ ), natomiast po dwóch dniach prowadzonych badań, istotnie znaczące zahamowanie tempa proliferacji zostało odnotowane dla czasów napromieniowania 180, 210 i 240 s (\*  $p < 0,013$ , \*  $p < 0,013$ , \*\* $p < 0,0014$ , odpowiednio). Pomiary przeprowadzone dla Opti-MEM aktywowanego zimną plazmą w objętości 3,0 i 1,5 cm<sup>3</sup>, obniżenie tempa proliferacji zostało stwierdzone dla wszystkich czasów napromieniowania tj. 150, 180, 210 i 240 s. (\*  $p < 0,013$ , \*\*  $p < 0,0014$ , \*\*\* $p < 0,0002$ , odpowiednio). Analizując wyniki uzyskane poprzez wykorzystanie DMEM aktywowanego zimną plazmą (Rycina 8, g i h), nie doprowadziło do widocznych zmian w aktywności mitochondrialnej komórek linii MCF-7. Jednakże wykorzystanie pożywki Opti-MEM aktywowanej w objętości 3,0 cm<sup>3</sup> doprowadziło do statystycznie istotnego spadku żywotności komórek, gdy 3 % FBS był dodawany po napromieniowaniu. Rozpatrując rolę wprowadzania 3 % dodatku FBS do pożywki po aktywowaniu zimną plazmą, eksperymentalnie potwierdzono zwiększenie uzyskiwanego efektu cytotoksycznego względem linii komórek MDA-MB-231 oraz MCF-7. Największe obniżenie aktywności mitochondrialnej zostało potwierdzone dla komórek nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231. Prace zrealizowane w zespole Rodder'a ze współpracownikami dowodzą, że wzrost stężenia FBS w analizowanych roztworach podczas traktowania zimną plazmą doprowadziło do zmniejszenia stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, znacznie redukując populację nieżywych komórek (Rodder i wsp., 2019).

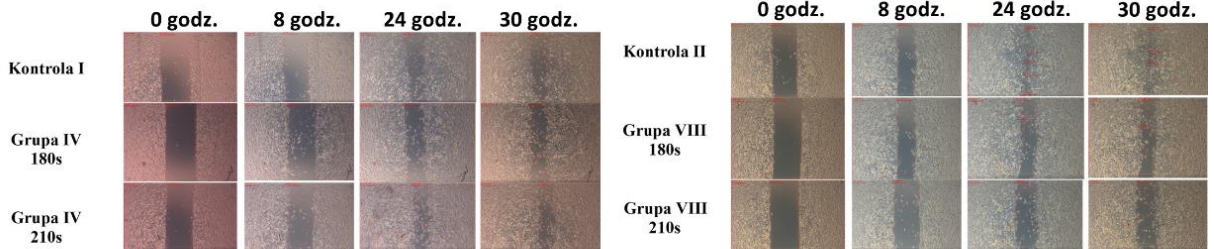
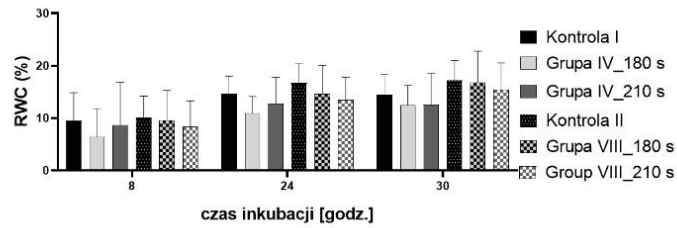
### **7.3. Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na zdolności migracji komórek – test zarysowania**

Określenie zdolności do migracji komórek poddanych działaniu wybranych pożywek poddanych napromieniowaniu zimną plazmą zostało określone z wykorzystaniem testu

zarysowania. Wybrane pożywki tj. DMEM lub Opti-MEM w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> zostały aktywowane zimną plazmą w czasie 180 i 210 s (wyznaczone jako minimalna dawka toksyczna), gdzie 3 % FBS dodawano po traktowaniu zimną plazmą. Zdjęcia płytek testowych z naniesionymi zarysowaniami komórek inkubowanych w traktowanych pożywkach były utrwalane w ciągu 30 godz. prowadzonego eksperymentu. W prezentowanych wynikach (Rycina 9), obliczenia powierzchni zamknięcia zarysowania w komórkach linii MCF-10A potwierdzono, że aktywność obydwu pożywek poddanych działaniu zimnej plazmy nie przyczyniło się do zaburzenia ich zdolności do migracji. Wyniki z przeprowadzonego testu zarysowania pozostają w dobrej korelacji z tymi, uzyskanymi z badań aktywności mitochondrialnej. Odmienną sytuację obserwowano dla pomiarów wobec komórek nowotworu o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7, gdzie statystycznie istotne obniżenie powierzchni zarysowania było obserwowane dla DMEM aktywowanego zimną plazmą (180 i 210 s) w ciągu pierwszych 8 godzin prowadzenia doświadczenia (\*\*p < 0,002, \*\*p < 0,002 odpowiednio). Wspomniana seria pomiarowa została zakończona po 24 godzinach ze względu na brak zauważalnych różnic obliczonego RWC w obydwu rodzajach aktywowanej pożywki. Dla drugiej grupy eksperymentalnej obszar zarastania zarysowania obserwowano przez 30 godzin, gdzie pożywka DMEM była napromieniowana zimną plazmą przez 180 i 210 s. Rozpatrując wyniki dla linii MDA-MB-231, największe obniżenie ruchliwości komórek zostało odnotowane dla pożywki DMEM traktowanej w czasie 180 s, gdzie po 24 godzinach prowadzonego doświadczenia zaobserwowano znaczne zahamowanie tempa migracji. Podobne wyniki uzyskano dla aktywowanego zimną plazmą Opti-MEM w czasie 180 i 210 s. (\*\*p < 0,002; \*\*\*p < 0,001). Ponadto w przypadku DMEM napromieniowanego zimną plazmą przez 180 s, migracja komórek była zahamowana po 30 godzinach prowadzonych obserwacji (\*p < 0,016), podczas gdy porównywalne zahamowanie migracji komórek odnotowano dla Opti-MEM aktywowanego zimną plazmą w czasie 210 s (\*p < 0,016).

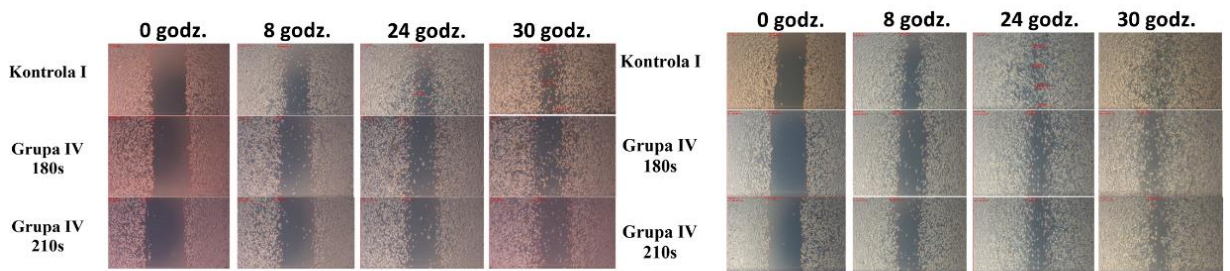
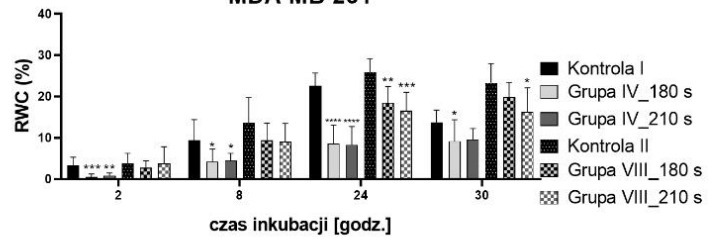
a)

**MCF10A**



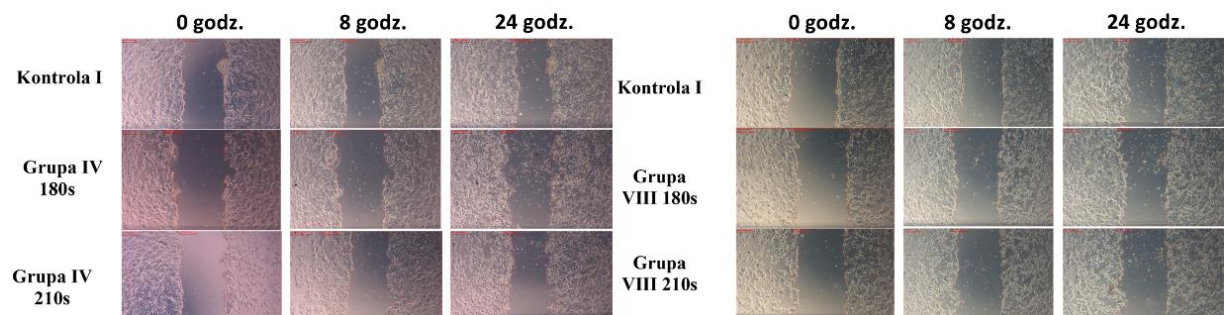
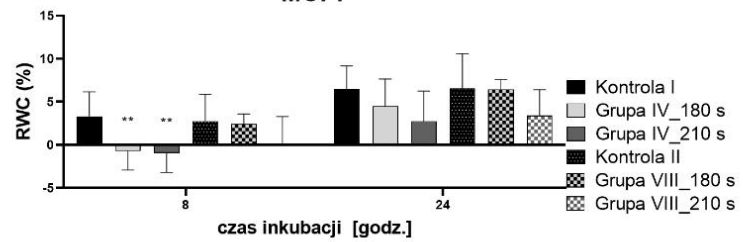
b)

**MDA-MB-231**



c)

**MCF7**

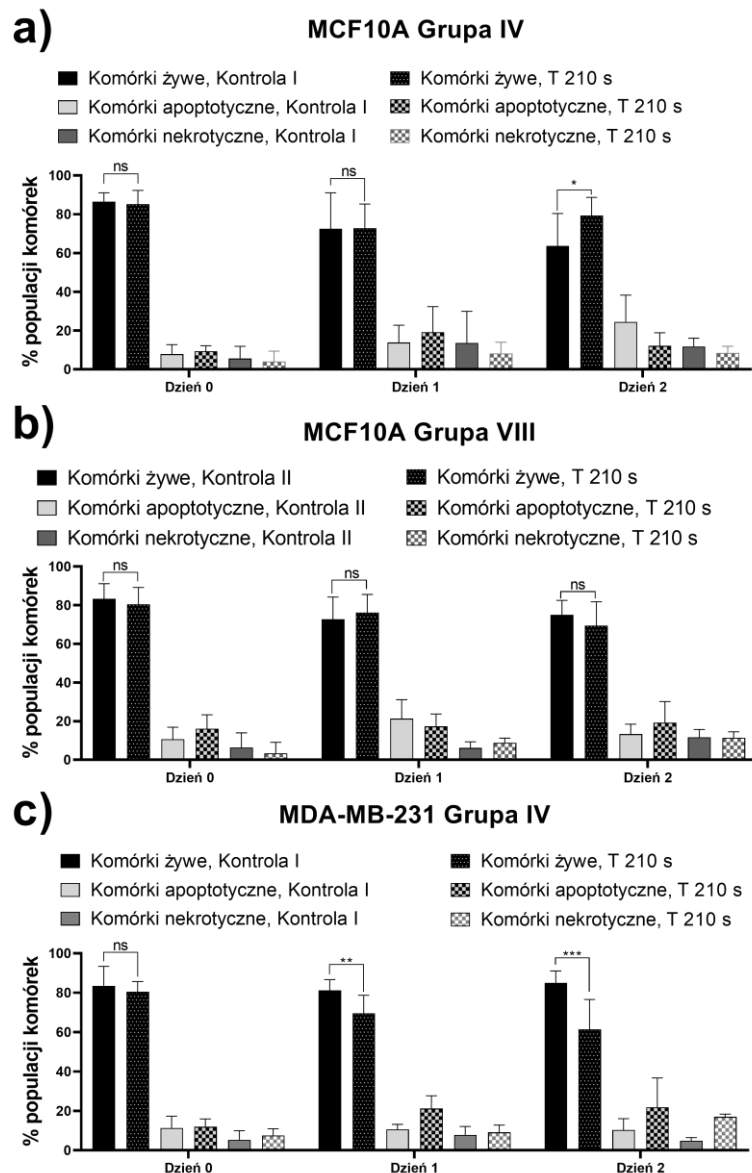


**Rycina 9.** Wyniki testu zarysowania wykorzystanego do oceny zdolności migracji ludzkiej linii komórek nienowotworowych MCF-10A (Graf a), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Graf b) i ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 (Graf c). Wytworzona warstwa komórkowa pokrywająca powierzchnię dołka płytki testowej została zarysowana, a oderwane komórki wraz ze starą pożywką zostały zastąpione przez: 1,5 cm<sup>3</sup> pożywką DMEM aktywowaną zimną plazmą w czasie 180 i 210 s (Grupa IV) lub 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki Opti-MEM aktywowanej w czasie 180 i 210 s (Grupa VIII). Obszar względnego zamknięcia rany (RWC) został obliczony w oparciu o 30 godzinną obserwację szerzej opisany w podrozdziale **6.5. Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania**. Wyznaczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe pochodzące od trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,016; \*\* p < 0,002; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

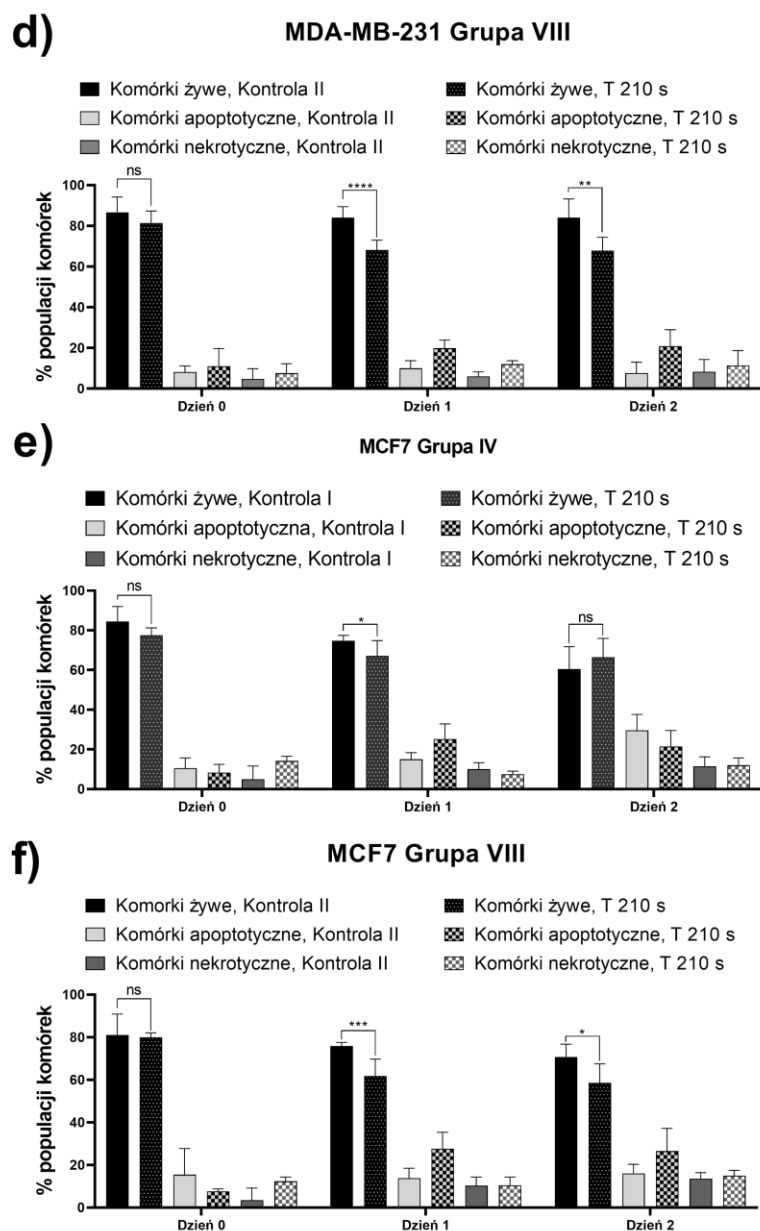
#### **7.4. Wpływ pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą na apoptozę komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny**

Określenie typu śmierci komórkowej indukowanej w następstwie oddziaływania z pożywką hodowlaną poddaną działaniu zimnej plazmy zostało przeprowadzone z wykorzystaniem barwienia komórkowego Aneksyną V i Jodkiem Propidyny (PI). Oznaczona populacja komórek żywych wśród linii MCF-10A pozostała niezmienną pod wpływem działania aktywowanej zimną plazmą pożywki hodowlanej. Na uwagę zasługuje zaobserwowany statystycznie znaczący wzrost liczby komórek żywych poddanych działaniu pożywki DMEM napromieniowanej w czasie 210 s (Rycina 10) (\*p < 0,015). Rozpatrując poradniki prowadzenia hodowli komórek MCF-10A, rekomendowaną pożywką pozostaje DMEM, a uzyskane wyniki analiz wskazują na pozytywny efekt wykorzystania zimnej plazmy. Wyniki uzyskane dla komórek linii nowotworu piersi o słabej zdolności przerzutowania MCF-7, odnotowano statystycznie znaczne zmiany w populacji komórek żywych, poddanych działaniu DMEM aktywowanego zimną plazmą podczas pierwszego dnia prowadzonych doświadczeń (Rycina 10, e) (\*p < 0,015). Zastosowanie zimnej plazmy do napromieniowania Opti-MEM (Rycina 10, f) znacząco przyczyniło się do obniżenia populacji komórek żywych, inicjując apoptozę przy pierwszym i drugim dniu prowadzonego doświadczenia ( Dzień 1- od 76,75 % do 61,83 %, \*\*\*p < 0,0004; Dzień 2 – od 74,00 % do 58,50 %, \*p < 0,015). Analizy przeprowadzone dla przerzutującego nowotworu piersi (MDA-MB-231), poddanego działaniu pożywki o mniejszej zawartości składników odżywczych DMEM aktywowanego zimną plazmą, doprowadziły do znacznej indukcji apoptozy, zarówno dla pierwszego i drugiego dnia eksperymentów (Dzień 1 - od 81,17 % do 69,75%, \*\*p < 0,0015; Dzień 2 – od 85,00 % do 60,88 %, \*\*\*p < 0,0004). Największą populację komórek apoptotycznych uzyskano dla komórek MDA-MB-231 poddanych działaniu pożywki Opti-MEM aktywowanej za pomocą zimnej plazmy (Dzień 1 – od 84,00 % do 68,12 %, \*\*\*\*p < 0,0001; Dzień 2 – od

84,00 % do 67,86 %,  $**p < 0,0015$ ). Warto nadmienić, największa redukcja populacji komórek żywych została potwierdzona w przypadku komórek nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania (MDA-MB-231), w ciągu jednego i dwóch dni prowadzonych pomiarów ( $**p < 0,002$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ ,  $**p < 0,002$  odpowiednio). Uzyskane wyniki pozostają w zgodności z wcześniej prezentowanymi danymi z podrozdziałów 7.2. i 7.3. jak również z wynikami prezentowanymi w literaturze. Ponadto warto zwrócić uwagę na wysoki stopień selektywności pożywek hodowlanych poddanych działaniu zimnych plazm, gdzie komórki MCF-10A nie uległy szkodliwemu oddziaływaniu, podczas gdy komórki linii MDA-MB-231 wykazują wysoką podatność na prezentowany sposób traktowania.







**Rycina 10.** Wyniki przedstawiające procentowy udział populacji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii MCF-10A (Grafy a i b), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Grafy c i d), ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania (Grafy e i f). Linie komórkowe MCF-10A (Graf a), MDA-MB-231 (Graf c) i MCF-7 (Graf e) inkubowane przez 2 dni w pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 210 s (Grupa IV). W pożywce Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 210 s (Grupa VIII) inkubowane były linie komórkowe MCF-10A (Graf b), MDA-MB-231 (Graf d), MCF-7 (Graf f). Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,015; \*\* p < 0,0015; \*\*\* p < 0,0004; \*\*\*\* p < 0,0001, ns – nie statystycznie istotne).

Selektywność oddziaływania pożywek hodowlanych na indukcję apoptozy została potwierdzona przez innych badaczy, sprawdzających wykorzystanie pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą względem komórek linii MDA-MB-231 (Xiang i wsp., 2018).



Podrobniej, znaczny wzrost populacji komórek apoptotycznych został zauważony jedynie wśród komórek nowotworowych o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, podczas gdy komórki linii MCF-10A oraz MCF-7 nie wykazują negatywnego wpływu traktowania zimnymi plazmami. W przypadku bezpośredniego napromieniowania zimną plazmą, uzyskano znaczącą indukcję apoptozy u komórek linii MCF-7 (Zhang i wsp., 2020; Park i wsp., 2019), podczas gdy u komórek linii MCF-10A (Mirpour i wsp., 2014) nie stwierdzono przyrostu populacji komórek apoptotycznych.

Przedstawiono również graficzne podsumowanie wyników uzyskanych w trakcie badań biologicznych. Jak można zauważyć, w większości przypadków aktywność życiowa komórek linii MCF-10A nie została zaburzona, wskazując na brak negatywnego wpływu zimnych plazm atmosferycznych względem ludzkiej nienowotworowej linii komórkowej. Rozpatrując wyniki prezentowane dla linii komórkowej MCF-7, zauważalne zmiany w ich procesach życiowych wystąpiły wyłącznie w grupie Opti-MEM aktywowanego zimną plazmą, wykazując minimalną dawkę toksyczną napromieniowania 180 s. Ponadto, przeprowadzenie napromieniowania pożywki w objętości 1,50 cm<sup>3</sup> w sposób istotny zwiększa uzyskiwaną odpowiedź biologiczną. Potwierdzono również, efektywność wywoływanej odpowiedzi biologicznej przez pożywki poddane aktywacji zimnej plazmy zostaje zwiększona, gdy FBS zostaje wprowadzony po zakończonym procesie aktywacji. Zaburzenia żywotności komórek zostają umniejszone wraz z wydłużeniem czasu prowadzenia doświadczeń. Obserwacje te, zostały potwierdzone podczas testu zarysowania, gdzie znaczne zahamowanie tempa migracji nastąpiło wyłącznie w początkowej fazie testu i co najbardziej zaskakujące, jedynie w przypadku pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą. Podobną zależność potwierdzono w przypadku zliczania populacji komórek apoptotycznych, gdzie największy spadek liczby komórek żywych został potwierdzony podczas pierwszego dnia badań. Rozpatrując wpływ składu pożywek hodowlanych poddanych aktywacji zimną plazmą na żywotność komórek MDA-MB-231 był następujący: pożywka DMEM pozbawiona FBS w trakcie napromieniowania wykazała efekt cytotoksyczny względem komórek przy minimalnej dawce toksycznej traktowania wynoszącej 180 s, doprowadzając do największej redukcji po dwóch dniach inkubacji. Poddane aktywacji Opti-MEM doprowadziło do zaburzeń żywotności komórek większości badanych grup, szczególnie przy dwóch dniach inkubacji z identyczną dawką toksyczną. Co ciekawe, ruchliwość komórek została znacznie zahamowana podczas badań z wykorzystaniem DMEM aktywowanego plazmą, podczas gdy dla doświadczeń z

napromieniowanym Opti-MEM zahamowanie mobilności komórek odnotowano dla dłuższego czasu inkubacji. Ostatecznie redukcja populacji komórek żywych nastąpiła zgodnie z tym samym trendem.

**Tabela 7. Graficzne podsumowanie uzyskanych wyników z testów żywotności komórkowej MTT (Ryciny 7 i 8), testu zarysowania (Rycina 9), indukcji apoptozy (Rycina 10).**

MTT test	MCF-10A		MCF-7		MDA-MB-231	
	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 1	Dzień 2
Skład medium hodowlanego aktywowanego zimnymi plazmami	Grupa I					
	Grupa II	180	210 240			
	Grupa III			180 240	180 240	180 210 240
	Grupa IV				180 240	180 240
	Grupa V	180		180 240	180 240	240 240
	Grupa VI			150 180 210 240	180 210 240	180 210 240
	Grupa VII	240		180 210 240	180 210 240	180 210 240
	Grupa VIII			210 240	180 240	150 180 210 240
Test zarysowania	MCF-10A		MCF-7		MDA-MB-231	
	8 godz.	24 godz.	8 godz.	24 godz.	2 godz.	8 godz.
Skład medium hodowlanego aktywowanego zimnymi plazmami	Grupa IV		180 210		240 210	180 210
	Grupa VIII				240 210	180 210
Typ śmierci komórkowej	MCF-10A		MCF-7		MDA-MB-231	
	Dzień 0	Dzień 1	Dzień 0	Dzień 1	Dzień 0	Dzień 1
Skład medium hodowlanego aktywowanego zimnymi plazmami	Grupa IV		210		210	210
	Grupa VIII			210	210	210

□ symbol \*p istotności statystycznej wybranego testu

○ symbol \*\*p istotności statystycznej wybranego testu

△ symbol \*\*\*p istotności statystycznej wybranego testu

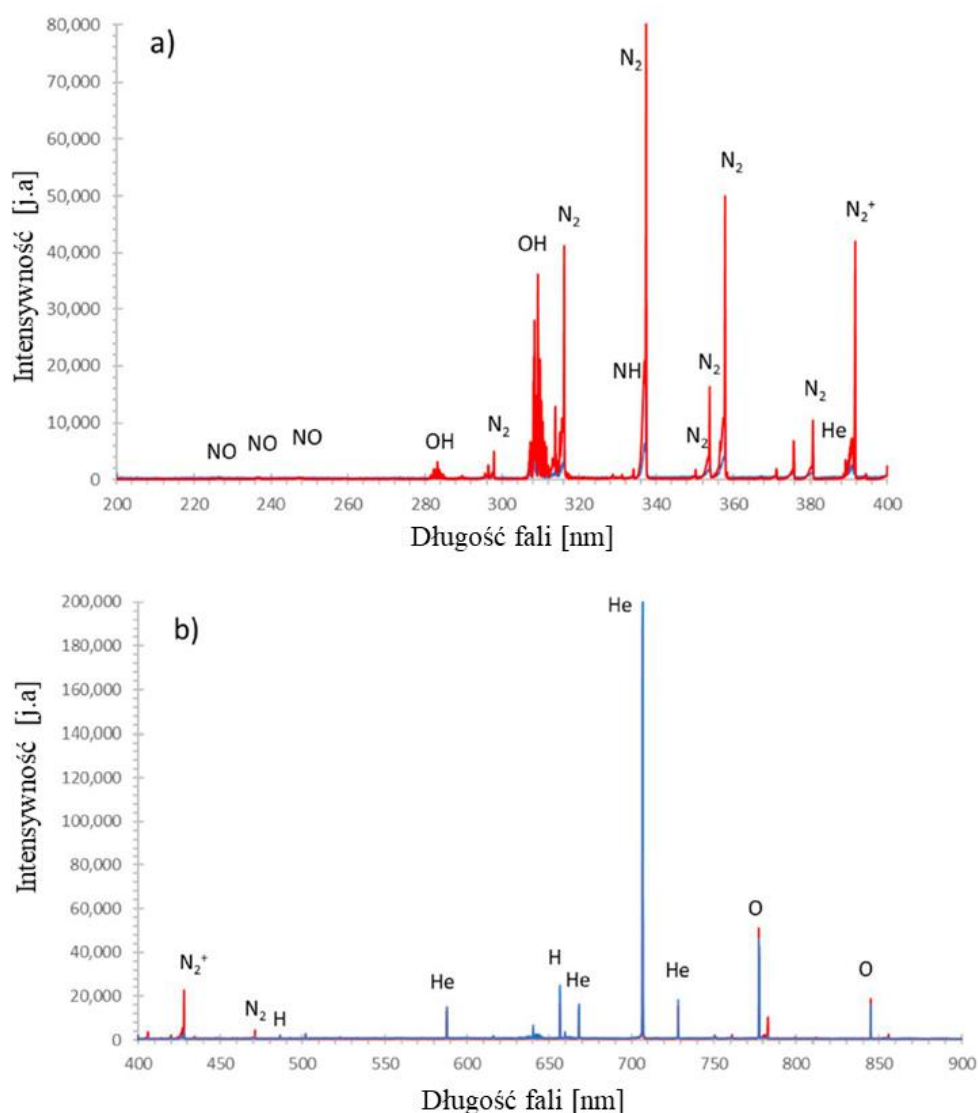
◇ symbol \*\*\*\*p istotności statystycznej wybranego testu

150, 180, 210, 240 – czas napromienienia medium zimnymi plazmami

## 7.5. Oznaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie gazowej – pomiary OES

Reakcje kaskadowe będące wynikiem oddziaływania zimnej plazmy i cieczy prowadzą do wytworzenia reaktywnych form tlenu i azotu. Największą uwagę należy poświęcić reaktywnym formom o długim czasie życia tj.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Przeprowadzono analizę jakościową i ilościową wspomnianych reaktywnych form celem określenia reakcji i procesów, bezpośrednio zaangażowanych w odpowiedź przeciw nowotworową wytworzoną dzięki pożywkom hodowlanym poddanych aktywacji zimną plazmą.

Pierwszym etapem prowadzonych analiz było ilościowe oznaczenie reaktywnych form obecnych w fazie gazowej, wytwarzanych w obszarze kontaktu stożka zimnej plazmy z pożywką DMEM oraz Opti-MEM wykorzystując Optyczną Spektrometrię Emisyjną (OES). Z danych prezentowanych na grafice (Rycina 11), zaobserwowano wytworzenie zbliżonych reaktywnych cząstek powstałych w wyniku oddziaływania z dwoma typami pożywek hodowlanych. Na widmach emisyjnych zimnej plazmy zidentyfikowano następujące pasma cząstek: NO,  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2^+$ , NH, OH jak i inne linie atomowe O, H, He (Rycina 11). W zakresie 200-260 nm zaobserwowano pojawiające się widma układu  $\gamma$  NO ( $A_2\Sigma^+ - X_2\Pi$ ), których główne pasma były przy 226,9 nm (0-0), 237,0 nm (0-1) oraz 247,9 nm (0-3). Następnie zidentyfikowano liczne pasma  $\text{N}_2$ , należące do systemu  $C_3\Pi_u - B_3\Pi_g$ , którego główne pasma o największej intensywności zostały zaobserwowane przy długościach fali 319,9 nm (1-0), 337,1 nm (0-0), 357,7 nm (0-1) i 380,4 nm (0-2). Na widmie obecne są także bardzo mocne pasma należące do rodników  $\text{OH}^\bullet$  systemu  $A_2\Sigma^- - X_2\Pi$  z górnymi poziomami przy 309,4 nm (0-0) i 286,1 nm (0-1). Zidentyfikowano także pasma cząsteczek  $\text{N}_2^+$ , należące do systemu  $B_2\Sigma^+u - X_2\Sigma^+g$  z intensywnymi górnymi poziomami pasm zostały obserwowane przy długości 391,4 nm (0-0) i 427,8 nm (0-1). Zarejestrowano również liczne linie atomowe helu (He I) przy długości 388,8 nm, 587,5 nm, 667,8 nm, 706,5 nm i 728,1 nm. Obecne również były linie H I przy długości 486,1 nm i 656,2 nm jak również linie O I przy długości fali 777,2 nm, 777,4 nm oraz 844,6 nm. Opierając się na pomiarach jakościowych OES, potwierdzona została obecność reaktywnych form tlenu i azotu podczas aktywowania DMEM i Opti-MEM za pomocą zimnej plazmy (Rycina 11).

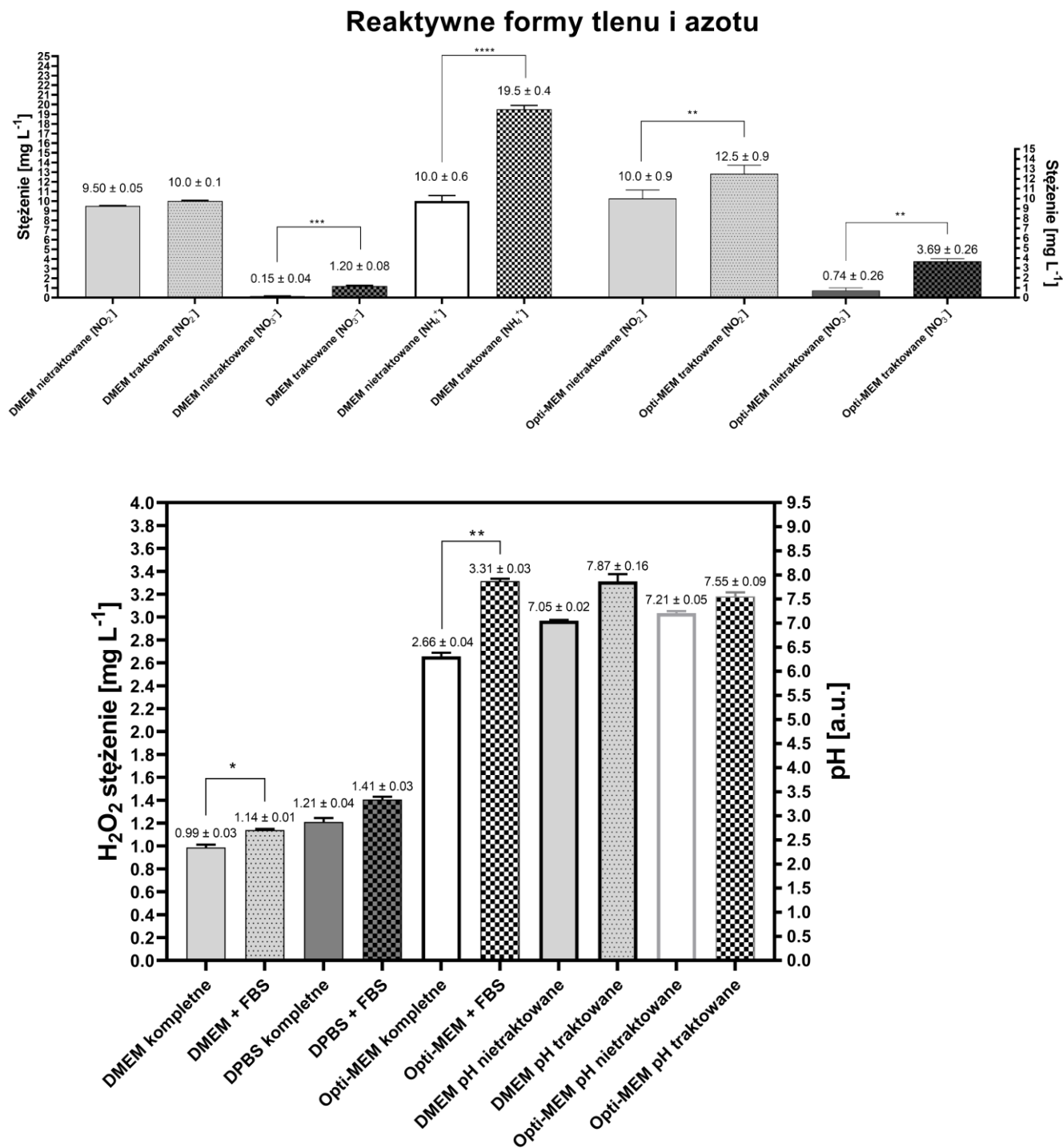


**Rycina 11.** Widma emisji ze strefy kontaktu stożka zimnej plazmy z pożywką DMEM (linia czerwona) i Opti-MEM (linia niebieska) w obszarze 200 - 400 nm (a) i 400 – 900 nm (b).

## 7.6. Oznaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne

Ilościową analizę stężenia wybranych reaktywnych form o długim czasie życia, w szczególności jony  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_3^-$  (Rycina 12), a także cząsteczek  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rycina 12) w analizowanych próbkach pożywek hodowlanych zostały przeprowadzone, wykorzystując metody kolorymetryczne. Potwierdzono zmiany stężenia wspomnianych reaktywnych form w wyniku napromieniowania zimną plazmą pożywki DMEM (pozbawionej czerwieni fenolowej) i Opti-MEM (pozbawionej czerwieni fenolowej). Ponadto stężenie nadtlenu wodoru ulegało zmianie w poszczególnych pożywkach. Potwierdzono nieznaczne zmiany stężeń jonów  $\text{NO}_2^-$  w trakcie prowadzonych analiz. Porównując stężenia w pożywce aktywowanej plazmą (czas napromieniowania równy 180 s) z pożywką nietraktowaną były

porównywalne tj.  $10,0 \pm 0,1 \text{ mg/dm}^3$  i  $9,50 \pm 0,05 \text{ mg/dm}^3$  odpowiednio dla DMEM. Analizy przeprowadzone dla Opti-MEM wykazały statystycznie istotny wzrost stężenia azotynów w porównaniu z pożywką nietraktowaną tj.  $10,0 \pm 0,9 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $12,5 \pm 0,9 \text{ mg/dm}^3$  (\*\*  $p < 0,006$ ). Większe zmiany stężenia, zostały zmierzone dla zawartości jonów  $\text{NH}_4^+$ . Uzyskane wyniki pomiarów dla pożywki DMEM napromieniowanej wyniosły  $19,5 \pm 0,4 \text{ mg/dm}^3$ , natomiast dla pożywki nienapromieniowanej odpowiednio  $10,0 \pm 0,6 \text{ mg/dm}^3$  (czas napromieniowania: 180 s), prowadząc do statystycznie istotnej różnicy (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). W przypadku analiz zawartości jonów  $\text{NO}_3^-$  dla pożywki DMEM stwierdzono wysoką różnicę stężeń w pożywce poddanej traktowaniu zimną plazmą ( $1,20 \pm 0,08 \text{ mg/dm}^3$ ) i nietraktowanej ( $0,15 \pm 0,04 \text{ mg/dm}^3$ ) (\*\*\* $p < 0,006$ ). Porównywalnie statystycznie istotne zmiany stężenia jonów  $\text{NO}_3^-$  zostały potwierdzone w pożywce Opti-MEM po traktowaniu zimną plazmą ( $3,69 \pm 0,26 \text{ mg/dm}^3$ ) w porównaniu z nietraktowaną ( $0,74 \pm 0,26 \text{ mg/dm}^3$ ) (\*\* $p < 0,006$ ). Ośmiokrotny wzrost zawartości jonów azotanowych V w pożywkach poddanych aktywacji, może odpowiadać za obserwowaną aktywność biologiczną. Pożywki poddane napromieniowaniu zimną plazmą bez uprzedniego dodatku FBS, prowadząc do wzrostu stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podczas gdy obecność FBS w pożywce przed jego napromieniowaniem, zauważalnie obniżyło zawartość nadtlenu wodoru w obydwu analizowanych grupach- dla DMEM uzyskano  $1,14 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $0,99 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$  (\* $p < 0,026$ ), dla DPBS uzyskano  $1,41 \pm 0,10 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $1,21 \pm 0,05 \text{ mg/dm}^3$ , dla Opti-MEM uzyskano  $3,31 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $2,66 \pm 0,04 \text{ mg/dm}^3$  (\*\* $p < 0,009$ ). Taka regularność uzyskiwanych wyników nie została odnotowana w przypadku pożywki o największej zawartości składników odżywczych, gdzie zawartość nadtlenu wodoru wyniosła  $1,41 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $3,31 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$ . Jednym z możliwych wytłumaczeń odnotowanej nieregularności może być związana z barwą tej pożywki, mogąca interferować w wartości maksimum absorbancji mierzonej przy długości fali 450 nm. Oznaczając zawartość  $\text{H}_2\text{O}_2$  w pożywce Opti-MEM, gdzie wprowadzenie FBS po napromieniowaniu zimnymi plazmami przyczyniło się do znaczącego wzrostu stężenia ( $2,66 \pm 0,04 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $3,31 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$ ; \*\* $p < 0,009$ ).



**Rycina 12.** Stężenia RFT i RFA wyznaczone w wyniku oddziaływania zimnej plazmy z poszczególnym rodzajem pożywki hodowlanej. Wyznaczono stężenia jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i NH<sub>4</sub><sup>+</sup> w pożywkach DMEM i Opti-MEM poddanych napromieniowaniu w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 180 s. Oznaczone zostały stężenie molekuł H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w poszczególnych pożywkach hodowlanych (napromieniowane w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> w czasie 180 s), gdzie FBS był wprowadzany przed napromieniowaniem (DMEM kompletne, Opti-MEM kompletne, DPBS kompletne) bądź FBS był wprowadzany po napromieniowaniu (DMEM + FBS, Opti-MEM + FBS, DPBS + FBS). Określone zostały również zmiany w wartościach pH pożywek DMEM i Opti-MEM poddanych ekspozycji zimnej plazmy. Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Tukeya post hoc (\* p < 0,026; \*\* p < 0,009; \*\*\* p < 0,006; \*\*\*\* p < 0,0001).

Porównywalne wyniki analiz stężenia reaktywnych form tlenu i azotu przeprowadzone zostały przez zespół Trizio, gdzie objętość 3 cm<sup>3</sup> DMEM została napromieniowana w czasie 5 min. (Trizio i wsp., 2016). Pomijając różnice w objętości i czasie napromieniowania pożywki DMEM, potwierdzono porównywalne wyniki z omawianymi w przedstawianej rozprawie. Rozpatrując wyniki prezentowane przez zespół Trizio, odnotowano zmiany pomiędzy grupami traktowanymi zimną plazmą a nietraktowanymi w stężeniu jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (0,40 mg/dm<sup>3</sup> kontra 0,04 mg/dm<sup>3</sup>) a także jonów NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1,20 mg/dm<sup>3</sup> kontra 0,01 mg/dm<sup>3</sup>). Przedstawione wyniki literaturowe dla jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wraz z tymi uzyskanymi eksperymentalnie pozostają w dobrej zgodności, podczas gdy dla stężenia jonów NO<sub>3</sub><sup>-</sup> wykazano większy przyrost w porównaniu do pożywki nietraktowanej zimnymi plazmami. Objętość 2,0 cm<sup>3</sup> pożywki DMEM poddanej działaniu zimnej plazmy w czasie 120 s, generując stężenia 0,52 mM sumy jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pozostaje w dobrej korelacji ze stężeniami jonów uzyskanych w trakcie prowadzonych prac eksperymentalnych. Tak przygotowana pożywka było wykorzystywana do dalszych testów biologicznych względem linii komórkowej MCF-7 (Subramanian i wsp., 2020). Zbliżone stężenia nadtlenu wodoru do prezentowanych w niniejszej rozprawie zostały oznaczone w pożywce RPMI 1640 poddanej działaniu zimnych plazm, gdzie FBS dodawano przed jej napromieniowaniem. Konkretniej, 1,0 cm<sup>3</sup> pożywki RPMI 1640 z dodatkiem FBS poddano napromieniowaniu w czasie 20 s, prowadząc do uzyskania stężenia 1,7 mg/dm<sup>3</sup> cząstek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nie i wsp., 2018). Prace zrealizowane przez zespół Rodder, gdzie 1,0 cm<sup>3</sup> pożywki RPMI 1640 i MEM wraz z dodatkiem FBS, napromieniowano w czasie 300 s doprowadzając do wytworzenia stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,43 i 1,56 mg/dm<sup>3</sup> odpowiednio. Wspomniane wyniki literaturowe pozostają również w dobrej zgodności z pomiarami eksperymentalnymi (Rodder i wsp., 2019). Początkowa interakcja zimnych plazm z ciekłą pożywką doprowadziła do wytwarzania licznych przedstawicieli reaktywnych form tlenu i azotu tj. NO, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, NH, O, OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, O, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> a także promieniowania UV. Zidentyfikowane wysoko energetyczne reaktywne formy o krótkim czasie życia, oddziałując z różnymi składnikami pożywki, prowadzą do wytwarzania związków reaktywnych o długim czasie istnienia (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i organicznych nadtlenków). Biorąc pod uwagę przeprowadzone badania opierające się o wykorzystanie pośrednie zimnej plazmy – pożywki aktywowane, które następnie były przenoszone do wybranych linii komórkowych, wpływ reaktywnych form o krótkim czasie życia na wybrane modele biologiczne jest zaniedbywalny. Generowane w efekcie RFT i RFA biorą udział w następujących reakcjach kaskadowych, doprowadzając do ich dalszego wzrostu stężenia. Z tych właśnie względów, w większości opublikowanych prac



naukowych skupiających się wokół przeciwnowotworowych właściwości zimnych plazm, główne reaktywne formy tlenu i azotu tj.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i tlenki organiczne zostały oznaczone (Terefinko i wsp., 2021) i przedstawione na grafice (Rycina 12).

Rozpatrując w dalszym ciągu różnice zawartości składników odżywczych w pożywkach poddanych działaniu zimnych plazm, uzyskana odpowiedź biologiczna jak i stężenia oznaczonych reaktywnych form mogą być dostosowywane. Zwiększając zawartość materii organicznej do odpowiedniej wartości, doprowadza to do zwiększonego wytworzenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  w różnych proporcjach (Terefinko i wsp., 2021). Jednakże przekroczenie pewnego poziomu domieszek organicznych przyczynia się do maskowania określonych RFT i RFA, jak również uzyskiwanej aktywności biologicznej względem wybranych linii komórkowych. Podobną zależność obserwowano przy pomiarach stężeń nadtlenu wodoru, gdzie w pożywce DMEM poddanej napromienianiu zimną plazmą uzyskano najniższe stężenie. Ponadto dla pożywki DPBS (najniższa zawartość składników odżywczych) oraz Opti-MEM (najwyższa zawartość składników odżywczych) napromieniowanych zimną plazmą, potwierdzono generację znacznie podwyższonego stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Stężenie nadtlenu wodoru może być dodatkowo zintensyfikowane poprzez dodatek FBS do pożywki po napromienianiu zimną plazmą. Szerokie spektrum reaktywnych składników i możliwych produktów pośrednich uzyskanych w wyniku oddziaływania zimnych plazm ze złożonym składem pożywki pozostają skomplikowane w pełnej analizie chemicznej. Zatem wpływ wytwarzanych reaktywnych form na modele biologiczne powinien być bezpośrednio badany w odniesieniu do indukowanej odpowiedzi biologicznej.

Zaprezentowane wyniki eksperymentalne wyraźnie wskazały, że pożywki DMEM i Opti-MEM poddane napromienianiu zimną plazmą nie doprowadziły do efektu cytotoksycznego względem komórek normalnych MCF-10A, podczas gdy przyczyniły się do zaburzenia procesów życiowych komórek nowotworowych. Obserwowana selektywność oddziaływania zimną plazmą może być powiązana z różną zawartością frakcji cholesterolowych w błonie komórkowej, pełniących istotną rolę w podtrzymywaniu integralności i płynności błony. Frakcje cholesterolowe pełnią również rolę pierwszej bariery na drodze RFT i RFA, które mogą je utlenić, wytwarzając w nich dziury ułatwiające dostęp do wnętrza komórek. Linia komórkowa MCF-10A, posiadając znacząco niższy poziom frakcji cholesterolowych w błonie komórkowej porównując do linii MCF-7 i MDA-MB-231, wykazują wyższą oporność na apoptozę indukowaną poprzez metylo- $\beta$ -cyklodekstryny, w odróżnieniu od komórek linii nowotworowych o znacznie wyższej

wrażliwości (Li i wsp., 2006). Ułatwiona przepuszczalność reaktywnych form wewnątrz komórek poprzez wytworzenie dziur w błonach komórkowych na drodze utlenienia, sprzyja akumulacji m.in.  $H_2O_2$  prowadząc do stresu oksydacyjnego, na który komórki linii MCF-7 i MDA-MB-231 są bardziej podatne od komórek linii MCF-10A (Warleta i wsp., 2010). Ponadto, komórki rozpatrywanych linii nowotworowych wykazują obfitą ekspresję białek akwaporyny w porównaniu do komórek linii MCF-10A tj. AQP1, AQP3, AQP5. Białka akwaporyny obecne w błonie komórkowej tworzą kanały ułatwiające transport m.in. wody i gliceryny odpowiadają również za zdolności przerzutowania komórek ludzkiego nowotworu piersi a także ich złośliwego charakteru (Shi i wsp., 2012). Białka te również mogą ułatwiać przenikanie molekuł  $H_2O_2$  (Rodrigues i wsp., 2019). Ostatecznie potwierdzono, że terapie celowane odnoszące się do mutacji genu p53 stanowią obiecującą alternatywę względem nowotworów piersi i może być powiązane z obserwowaną odpowiedzią biologiczną pożywek DMEM i Opti-MEM napromieniowanych zimną plazmą (Synnott i wsp., 2017).

## **8. Podsumowanie i wnioski po realizacji zadania I**

Przedstawiając przeprowadzone prace w prezentowanym rozdziale, podjęto próby odpowiedzi na pytanie, czy skład chemiczny pożywki hodowlanej poddanej działaniu zimną plazmą jest istotny pod względem indukowanej odpowiedzi biologicznej na linie komórek ludzkiego nowotworu piersi?. W oparciu o uzyskane wyniki eksperymentalne potwierdzono, że zarówno rodzaj jak i skład pożywek poddawanych aktywacji zimną plazmą w sposób znaczący wpływa na uzyskiwany efekt przeciwnowotworowy.

Doprecyzowując:

- I. Otrzymywane pożywki hodowlane napromieniowane zimną plazmą bez wcześniejszego dodatku FBS do pożywki, nie wykazują cytotoksyczności wobec komórek linii MCF-10A, odznaczają się wysoką selektywnością, stwarzając tym samym możliwość zaprojektowania terapii przeciw ludzkiemu nowotworowi piersi.
- II. Wytworzone pożywki hodowlane aktywowane nowatorskim układem reakcyjno-wyładowczym wykazały szkodliwe oddziaływania względem komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231.
- III. Dodatek surowicy FBS do pożywki hodowlanej przed jej napromieniowaniem, wpływa na obniżenie uzyskiwanej cytotoksyczności wobec komórek linii MCF-

- 7 i MDA-MB-231, przyczyniając się również do nieznacznego obniżenia ich żywotności jak również zaburzając procesy życiowe komórek linii MCF-10A.
- IV. Wybór odpowiedniego rodzaju pożywki hodowlanej poddawanej aktywacji zimną plazmą celem uzyskania największego wpływu na aktywność biologiczną pozostaje kluczowym etapem przygotowania efektywnej terapii. Pożywka o najniższej zawartości czynników bioaktywnych, DMEM, poddana działaniu zimnych plazm doprowadziła do znacznego spadku żywotności komórek nowotworowych MCF-7 i MDA-MB-23, jak również obniżenia ich mobilności.
  - V. Zaburzenia w procesach życiowych komórek linii ludzkiego nowotworu piersi związane są w głównej mierze z indukcją apoptozy w wyniku inkubacji w pożywkach hodowlanych poddanych działaniu zimnej plazmy. Największy spadek ruchliwości komórek, a także uzyskanie największej populacji komórek apoptotycznych potwierdzono w badaniach komórek linii MDA-MB-231 (rak silnie przerzutujący). Uzyskane wyniki w sposób jasny potwierdzają zwiększoną podatność komórek linii MDA-MB-231 na działanie pożywki hodowlanej poddanej działaniu zimnej plazmy. Otrzymane wyniki dają nadzieję, że przeprowadzone badania mogą stanowić punkt wyjściowy dla alternatywnych terapii dedykowanych dla ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania.
  - VI. Zaprezentowane wyniki badań eksperymentalnych zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej *International Journal of Molecular Sciences* (Terefinko i wsp., 2021).

Materiał zaprezentowany w tej części został opublikowany w artykule: Terefinko D., Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl, A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. “*The influence of cold atmospheric pressure plasma-treated media on cell viability, motility, and induction of apoptosis in human non-metastatic (MCF7) and metastatic (MDA-MB-231) breast cancer cell lines.*” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, s. 1-23. IF=5.924, MEiN =140

## **Zadanie II. Bezpośrednie i mieszane zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi**

**Drugim zadaniem badawczym** przedstawionej rozprawy było przygotowanie i scharakteryzowanie dwóch układów zimnych plazm atmosferycznych. Pierwszy układ stanowiło bezpośrednio traktowanie komórek źródłem zimnej plazmy, celem wywołania zmian w żywotności, zdolności do migracji i indukcji apoptozy wobec linii komórkowych ludzkiego raka piersi – MCF-7 i MDA-MB-231 i nienowotworowej linii MCF-10A. Drugim układem było wykorzystanie źródła zimnej plazmy w sposób mieszany, poprzez bezpośrednio napromieniowanie komórek źródłem zimnej plazmy, a następnie wystawienie ich na działanie pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą. Aktywność biologiczna układu mieszanego zimnej plazmy została zbadana pod względem wywołanych zmian w aktywności metabolicznej, ruchliwości i inicjacji zaprogramowanej śmierci komórkowej wobec linii ludzkiego nowotworu piersi – MCF-7 i MDA-MB-231, a także nienowotworowej linii MCF-10A.

**Hipoteza badawcza 1:** nowatorski układ wyładowczy, którego pośrednie zastosowanie do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi zostało omówione jako pierwsze zadanie badawcze, stanowiąc źródło reaktywnych form tlenu i azotu, na skutek bezpośredniego oddziaływania z komórkami wybranych modeli *in vitro* może wpłynąć na zaburzenie ich procesów życiowych, obniżając aktywność metaboliczną, zahamowując ruchliwość i wywołując apoptozę w komórkach ludzkiego raka piersi.

**Hipoteza badawcza 2:** bezpośrednio potraktowanie komórek raka piersi nowatorskim układem wyładowczym, wprowadzić może komórki nowotworowe w stan zwiększonej podatności na aktywność pożywki hodowlanej napromieniowanej tymże układem, prowadząc do wzmożonego zaburzenia ich żywotności, mobilności i indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej.

## **9. Cel i zakres prowadzonych prac - bezpośrednie i pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej**

Celem realizacji drugiego zadania badawczego, układ wyładowczy generujący zimną plazmę w atmosferze helu został wykorzystany do bezpośredniego napromieniowania komórek nowotworu piersi tj. MCF-7 i MDA-MB-231, a także komórek linii nienowotworowej MCF-10A, zawieszane w PBS. Przed realizacją doświadczeń bezpośredniego potraktowania zawiesiny komórkowej ustalonych modeli *in vitro*, nowatorski układ reakcyjno-wyładowczy został do tego celu dostosowany. Wybrane modele biologiczne *in vitro* po poddaniu ich bezpośredniej ekspozycji na zimną plazmę zostaną następnie inkubowane w kompletnej pożywce hodowlanej bądź pożywce hodowlanej poddanej aktywacji źródłem zimnej plazmy atmosferycznej. Mając świadomość aktywności biologicznej wybranych pożywek hodowlanych poddanych napromieniowaniu zimnej plazmy względem rozpatrywanych modeli biologicznych po zrealizowanym pierwszym zadaniu badawczym, dla realizacji drugiego zadania badawczego zostały wybrane pożywki hodowlane aktywowane zimną plazmą o najwyższych właściwościach cytotoksycznych. Aktywność biologiczna tak przygotowanych układów zimnych plazm atmosferycznych zostanie zbadana pod względem inicjowanych zaburzeń w żywotności, ruchliwości i indukcji apoptozy. Analizując doniesienia literatury z prac badawczych wykorzystujących układy mieszane zimnej plazmy, które zostały opisane w podrozdziale 4.6. **Podejście łączące bezpośrednio i pośrednie traktowanie komórek nowotworowych źródłami zimnych plazm atmosferycznych**, nie zostały obecnie opublikowane żadne doniesienia dotyczące wspomnianego podejścia względem komórek ludzkiego raka piersi. Jednakże, w świetle ustaleń względem innych linii nowotworowych, wystawienie ich na bezpośrednią ekspozycję stożka zimnej plazmy w sposób istotny uczyła je na aktywność innych związków o własnościach cytotoksycznych.

## **10. Materiały i metodyka badawcza dla realizacji zadania II**

### **10.1. Hodowle komórkowe**

Identyczne modele *in vitro* do tych wykorzystanych przy okazji realizacji pierwszego zadania badawczego, wybrano dla doświadczeń w ramach prac nad drugim zadaniem badawczym. Sposób prowadzenia hodowli komórkowych, jak i ich pochodzenie są spójne z opisanym w podrozdziale 6.1. **Hodowle komórkowe.**

## 10.2. Pożywki hodowlane

Przeprowadzając traktowanie mieszane wybranych linii komórkowych, przygotowano pożywki hodowlane poddane napromieniowaniu źródłem zimnej plazmy atmosferycznej. W tym celu, wybrano podobnie dwie pożywki hodowlane, różniące się zawartością składników odżywczych tj. pożywka DMEM i Opti-MEM. Rozpatrując wyniki eksperymentalne uzyskane w toku realizacji pierwszego zadania badawczego, objętość 1,5 cm<sup>3</sup> pożywek hodowlanych DMEM lub Opti-MEM wzbogaconą o GlutaMAX, uzupełnione o 100 U/cm<sup>3</sup> roztworu penicyliny i 100 µg/ cm<sup>3</sup> streptomycyny, zostały przeniesione do oddzielnych dołków testowej płytki 24 dołkowej i poddane bezpośredniemu napromieniowaniu źródłem zimnej plazmy. Po zrealizowanym etapie aktywacji zimną plazmą, pożywki hodowlane zostały na koniec przeniesione do sterylnych, oddzielnych probówek z tworzywa sztucznego i uzupełnione o dodatek 3% FBS. Tak uzyskane kompletne pożywki hodowlane aktywowane zimną plazmą zostały następnie wykorzystane do przeprowadzenia traktowania mieszanego komórek nowotworu piersi. Dla lepszego zobrazowania grup eksperymentalnych wykorzystanych w trakcie prac, a także wskazania sposobu oznaczania grup badawczych w zaprezentowanych wynikach eksperymentalnych, została przygotowana Tabela 8.

**Tabela 8.** Charakterystyka grup badawczych, zawiesina komórkowa poddana bezpośredniej ekspozycji zimnej plazmy a także inkubowane następnie w pożywce hodowlanej nietraktowanej bądź aktywowanej źródłem zimnej plazmy.

<b>Grupa</b>	<b>Pożywki hodowlane aktywowane zimną plazmą, sposób przygotowania</b>
Kontrola I	Komórki inkubowane w nietraktowanej, kompletnej pożywce DMEM
Kontrola II	Komórki inkubowane w nietraktowanej, kompletnej pożywce Opti-MEM
Grupa I	Komórki inkubowane w nietraktowanym DMEM, poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą
Grupa II	Komórki inkubowane w DMEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3 % FBS, poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą
Grupa III	Komórki inkubowane w nietraktowanym Opti-MEM, poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą
Grupa IV	Komórki inkubowane w Opti-MEM napromieniowanym w objętości 1,5 cm <sup>3</sup> , bez dodatku 3 % FBS, poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą

## 10.3. Aktywacja pożywki hodowlanej

Wytworzenie pożywki hodowlanej napromieniowanej zimną plazmą zostało przeprowadzone z wykorzystaniem nowatorskiego układu wyładowczego, który został szczegółowo opisany i zaprezentowany w podrozdziale **6.3. Aktywacja pożywki hodowlanej**. Parametry operacyjne i prądowo-napięciowe były identyczne z tymi w

przytoczonym podrozdziale 6.3. Objętość kompletnej pożywki hodowlanej 1,5 cm<sup>3</sup> (DMEM lub Opti-MEM ) przeniesiona do oddzielnych dołków płytki testowej, 24-dołkowej została poddana bezpośredniej ekspozycji stożkiem zimnej plazmy w czasie 180 s (wyznaczone uprzednio jako minimalna dawka toksyczna), zachowując odległość pomiędzy powierzchnią pożywki w dołku płytki testowej a końcem pióra plazmowego 25,00 mm. Proces napromieniowania objętości pożywki hodowlanej był wielokrotnie przeprowadzany, zależnie od objętości końcowej niezbędnej do przeprowadzenia dalszych badań biologicznych.

#### 10.4. Bezpośrednie napromieniowanie komórek raka piersi

Traktowanie bezpośrednie modeli komórkowych, przeprowadzono poprzez eksperymentalne dobranie aparatury i ustawienia układu reakcyjno-wyładowczego. Wybrano w tym celu probówki szklane o średnicy zewnętrznej 16 mm i wysokości 160 mm, które zostały przycięte do wysokości 35 mm. Tak przygotowane probówki szklane zostały poddane procesowi sterylizacji, a następnie wykorzystane do eksperymentów bezpośredniego napromieniowania zawiesiny komórkowej zimną plazmą. Do przyciętych probówek wprowadzono objętość 2,00 cm<sup>3</sup> roztworu PBS z zawiesiną komórkową wybranego modelu *in vitro* ustalając ich gęstość na  $5 \times 10^5$  komórek/cm<sup>3</sup> pożywki. Komórki wraz z roztworem PBS przed doświadczeniem były przechowywane w lodówce, a ich temperatura wynosiła  $8,4 \pm 1,2$  °C. Odległość pomiędzy traktowaną zawiesiną komórkową a końcem pióra plazmowego została ustalona na 6,44 mm z wykorzystaniem wysokościomierza. Czas bezpośredniej ekspozycji zawiesiny komórkowej na źródło zimnych plazm został ustalony na 30, 45 i 60 s. Jako źródło zimnej plazmy wykorzystano układ wyładowczy, z parametrami operacyjnymi opisanymi w podrozdziale 6.3. Zawiesina komórkowa w PBS poddana działaniu zimnej plazmy została następnie przeniesiona do oddzielnych plastikowych probówek w objętościach niezbędnych do przeprowadzenia dalszych badań. Tak przygotowane probówki, zostały poddane odwirowaniu z prędkością 1300 rpm w czasie 5 min, celem zebrania pelletu komórkowego i pozbycia się roztworu PBS. Przygotowany w ten sposób pellet komórkowy został wykorzystany następnie do dalszych pomiarów. Zależnie od grup badawczych, komórki bezpośrednio potraktowane źródłem zimnej plazmy zostały inkubowane w kompletnej pożywce hodowlanej DMEM lub Opti-MEM, bądź dla eksperymentów traktowania mieszanego zimną plazmą, komórki zostały zawieszony w pożywkach hodowlanych DMEM lub Opti-MEM poddanych działaniu zimnej plazmy.

### **10.5. Badanie aktywności metabolicznej komórek – test MTT**

Zaburzenia żywotności komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231 poddanych bezpośredniej ekspozycji zimnej plazmy, a także poddanych traktowaniu mieszanemu poprzez ich inkubację w pożywce hodowlanej poddanej działaniom zimnej plazmy zostały zbadane przy użyciu testu MTT. Jako kontrolę negatywną do tych analiz wykorzystano komórki linii MCF-10A. Komórki wybranych modeli biologicznych, po uprzednim napromieniowaniu zimną plazmą (Tabela 8, Grupy I i III) przez 30, 45 i 60 s, zostały odwirowane w czasie 5 minut przy 1300 rpm, usuwając na koniec uzyskany supernatant z PBS. Uzyskany pellet komórkowy został zawieszony w określonej objętości kompletnej pożywki. Komórki w liczbie  $5 \times 10^3$  zawarte w objętości  $0,1 \text{ cm}^3$  pożywki hodowlanej Opti-MEM lub DMEM, zostały przeniesione na oddzielne dołki płytki testowej, 96 dołkowej. Przygotowane płytki testowe zostały umieszczone w inkubatorze, zachowując warunki standardowe inkubacji w czasie 48, 96 i 168 godzin. Dla eksperymentów prowadzonych z grupami traktowania mieszanego (Tabela 8, Grupy II i IV), bezpośrednio napromieniowane komórki zostały zawieszane w odpowiednich objętościach pożywki DMEM lub Opti-MEM poddanych ekspozycji zimnych plazm. Dalszy sposób postępowania celem przeprowadzenia testu MTT i odczytania uzyskanych wyników był analogiczny z tym opisanym w podrozdziale **6.4. Badanie aktywności metabolicznej komórek – test MTT**, do którego odsyłam.

### **10.6. Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania**

Badania dotyczące wpływu bezpośredniego oddziaływania zimnych plazm a także podejścia mieszanego wykorzystania zimnej plazmy na zdolności do migracji rozpatrywanych modeli *in vitro* przeprowadzono z użyciem testu zarysowania. Szczegółowo, wybrane linie komórkowe tj. MDA-MB-231, MCF-7, MCF-10A poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą w czasie 30 s, zostały przygotowane do testu i osadzone w liczbie  $1,5 \times 10^5$  komórek do oddzielnych dołków płytki testowej, 24 dołkowej i zawieszano je w objętości  $0,35 \text{ cm}^3$  kompletnej pożywki Opti-MEM. Wypełnione płytki testowe zostały poddane inkubacji w czasie 24 godzinach w inkubatorze, zachowując warunki normalne. Po czasie inkubacji, uzyskiwano jednorodnie pokrytą komórkami powierzchnię dołka płytki testowej, zarysowując ją następnie sterylną końcówką  $0,2 \text{ cm}^3$  mikropipety automatycznej, uzyskując w ten sposób pojedynczą rysę przechodzącą przez środek każdego z dołków. Oderwane w wyniku zarysowania komórki



zostały ostrożnie usunięte z dołka, wraz z objętością starej pożywki hodowlanej. Pozostałe komórki na dnie dołków płytki testowej uzupełniono objętością 0,35 cm<sup>3</sup> świeżej, nietraktowanej i kompletnej pożywki DMEM lub Opti-MEM. Dla grupy eksperymentalnej z traktowania mieszanego (Tabela 8, Grupy II i IV), przyklejone komórki zostały zwilżone objętością 0,35 cm<sup>3</sup> pożywki poddanej działaniu zimnych plazm z czasem ekspozycji 180 s. Przygotowane w ten sposób 24-dołkowe płytki testowe były przechowane przez 24 godziny w inkubatorze w warunkach normalnych. Sposób rejestracji wyników i ich interpretacji był identyczny z tym przedstawionym w podrozdziale **6.5. Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania**, do którego odsyłam.

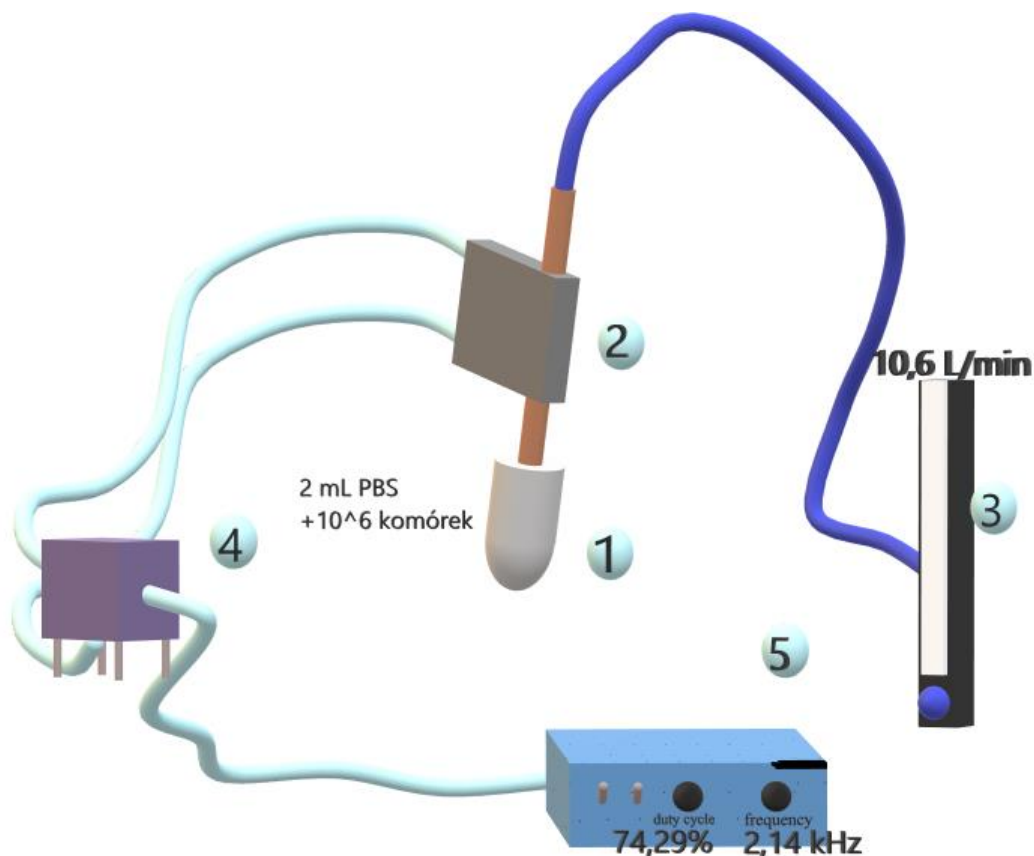
#### **10.7. Badanie apoptozy komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny**

Określenie wpływu bezpośredniego oddziaływania stożka zimnych plazm na indukcję śmierci apoptotycznej lub nekrotycznej w modelach *in vitro* tj. MDA-MB-231, MCF-7 i MCF-10A przeprowadzono z pomocą barwienia komórkowego Aneksyną V i Jodkiem Propidyny (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection kit APC, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, USA). Komórki wybranych linii komórkowych poddane bezpośredniemu oddziaływaniu z stożkiem zimnej plazmy w czasie 30 s, zostały następnie przygotowane do dalszych prac i osadzone na oddzielnych dołkach płytek testowych, 24-dołkowych utrzymując licznosc komórek  $1,5 \times 10^5$  zawieszonych w objętości 0,35 cm<sup>3</sup> kompletnej pożywki DMEM lub Opti-MEM. Dla eksperymentów podejścia mieszanego traktowania zimną plazmą (Tabela 8, Grupy II i IV), komórki poddane bezpośredniemu napromieniowaniu w liczbie  $1,5 \times 10^5$  zawieszono w objętości 0,35 cm<sup>3</sup> pożywki aktywowanej zimną plazmą tj. DMEM lub Opti-MEM z czasem traktowania 180 s. Sporządzone w ten sposób płytki testowe z komórkami były przechowywane w inkubatorze (warunki standardowe) w czasie 24 i 48 godzin. Po zakończonej inkubacji, pożywki zostały zebrane z określonych dołków płytki testowej a komórki przygotowane do barwienia w sposób opisany szczegółowo w podrozdziale **6.6. Badanie apoptozy komórek – barwienie Aneksyną V i Jodkiem Propidyny**. Sposób analizy i interpretacji tak uzyskanych wyników był zgodny z tym opisanym w podrozdziale **6.6**.

## 11. Wyniki i dyskusja dla bezpośredniego i mieszanego zastosowania układu zimnej plazmy

### 11.1. Bezpośrednie i mieszane traktowanie komórek raka piersi zimną plazmą

Zdefiniowane modele *in vitro* tj. komórki linii MDA-MB-231, MCF-7 i MCF-10A poddano bezpośredniemu napromieniowaniu źródłem zimnej plazmy zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 10.4. **Bezpośrednie napromieniowanie komórek raka piersi.** Schematyczne przedstawienie przygotowanego układu eksperymentalnego zostało zaprezentowane poniżej (Rycina 13).



**Rycina 13.** Schematyczne przedstawienie układu wyładowczego przygotowanego dla bezpośredniego napromieniowania zawiesiny komórkowej wybranych modeli biologicznych tj. komórek linii MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231. 1- przycięta probówka szklana do wysokości 35,0 mm, zawierająca  $1 \times 10^6$  komórek zawieszonych w objętości  $2,0 \text{ cm}^3$  PBS. 2- pióro plazmowe generujące zimną plazmę atmosferyczną w wyniku wyładowań barierowych, zachowując odległość od powierzchni zawiesiny komórkowej 6,44 mm. 3- przepływomierz gazu wyładowczego, umożliwiający ustalenie prędkości przepływu helu  $10,6 \text{ dm}^3/\text{min}$ . 4- transformator prądu elektrycznego wytworzonego z generatora wysokich napięć, dostarczający ładunek do pióra plazmowego. 5- generator wysokich napięć, o możliwości dostrajania wypełnienia i częstotliwości modulacji charakterystyki prądowo-napięciowej, wykorzystywanej do inicjacji wyładowań barierowych zimnej plazmy. Ustalono parametry wzbudzenia plazmy na wypełnienie 74,29 % i częstotliwości 2,14 kHz, wzbudzając zimną plazmę do zastosowań biomedycznych.

Zawiesina komórkowa wystawiona na działanie stożka zimnych plazm, generowanych w warunkach optymalnych tj. przepływ helu  $10,6 \text{ dm}^3/\text{min}$ , częstotliwość modulacji 2,14

kHz i wypełnienie 74,29 %, w dobranych czasach traktowania tj. 30, 45 i 60 s była każdorazowo poddawana ocenie wizualnej. Nie odnotowano znaczących zmian objętości zawiesiny komórkowej poddanej działaniu zimnych plazm, jak również wystąpienia aglomeratów komórkowych czy zmian koloru roztworu. Pomiarów temperatury traktowanego roztworu nie uległy znacznemu wzrostowi, uzyskując zmianie z  $8,4 \pm 1,2$  °C do  $14,8 \pm 0,9$  °C. Niewielkie przyrosty temperatury traktowanej zawiesiny komórkowej zapewniają wykluczenie czynnika termicznego z wywoływanych efektów względem traktowanych bezpośrednio linii komórkowych czy też energii oddziaływania z wytwarzanymi w trakcie inicjacji plazmy rozprzeczonymi elektronami bądź czynnikami o wysokiej energii. Z wyników pomiarów przestrzennego rozchodzenia się generowanych RFT w trakcie oddziaływania z stożkiem zimnych plazm, które zostały opisane w podrozdziale **6.9. Badanie przestrzennej dystrybucji reaktywnych form tlenu – pomiary jodku potasu ze skrobią**, główny efekt wywołany na badanych modelach biologicznych należy upatrywać w aktywności generowanych RFT i RFA i ich oddziaływaniu z kolejnymi składnikami komórkowymi. Utrzymując mniejszą odległość pomiędzy końcem pióra plazmowego i powierzchnią traktowanej zawiesiny komórkowej, zwiększona została efektywność penetracji generowanych RFT i RFA, tym samym zwiększając efektywność takiego traktowania.

Po przeprowadzonych doświadczeniach bezpośredniego traktowania, komórki linii MDA-MB-231, MCF-7 i MCF-10A były następnie przenoszone wraz z PBS do oddzielnych plastikowych probówek, w liczbie komórek niezbędnych do przeprowadzenia kolejnych badań biologicznych, poddając je następnym etapem odwirowaniu w czasie 5 min przy 1200 rpm. Po zakończonym odwirowaniu otrzymany pellet komórkowy zostaje oddzielony od supernatantu PBS, by następnie zastąpić go określoną objętością (zależną od przeprowadzanego badania) kompletnej pożywki hodowlanej DMEM lub Opti-MEM bądź przygotowane bezpośrednio przed testami pożywki aktywowanej zimną plazmą (Tabela 8, Grupy II i IV) DMEM lub Opti-MEM.

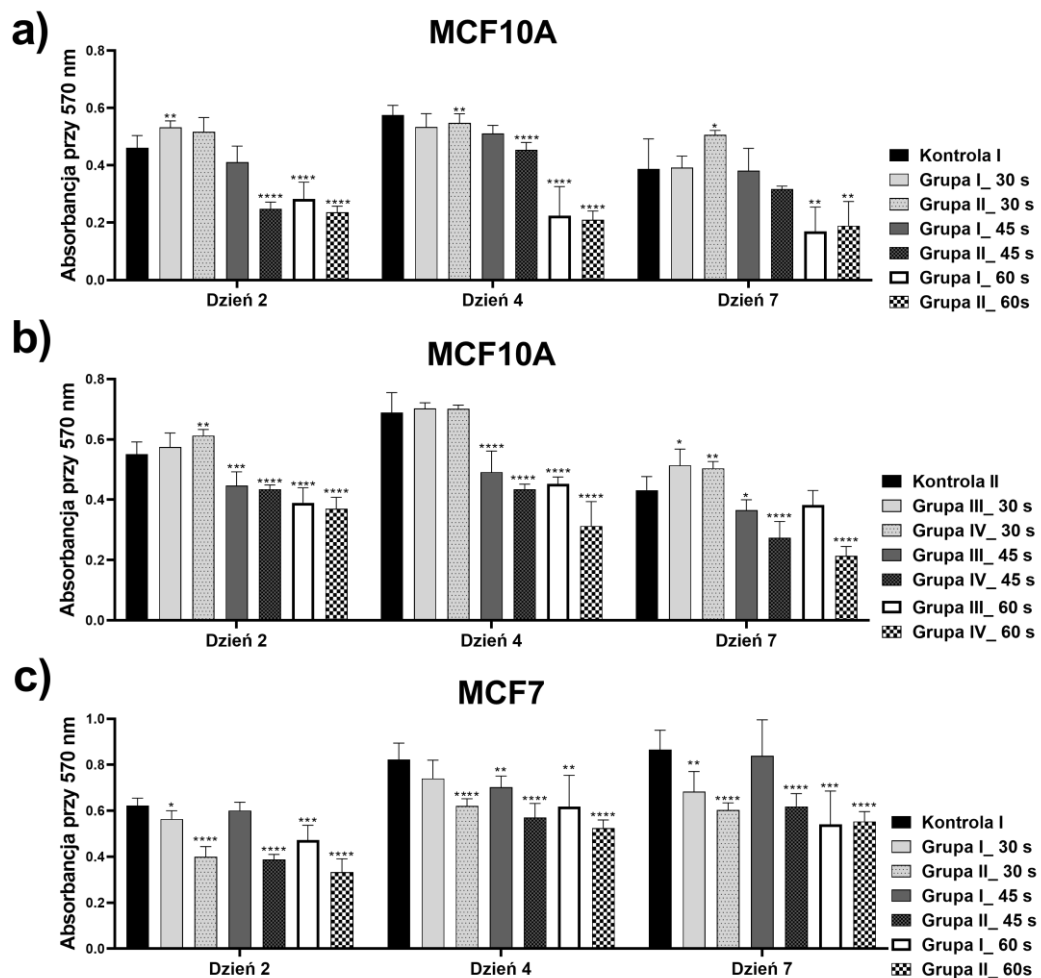
## **11.2. Wpływ bezpośredniego i mieszanego traktowania zimną plazmą na żywotność komórkową**

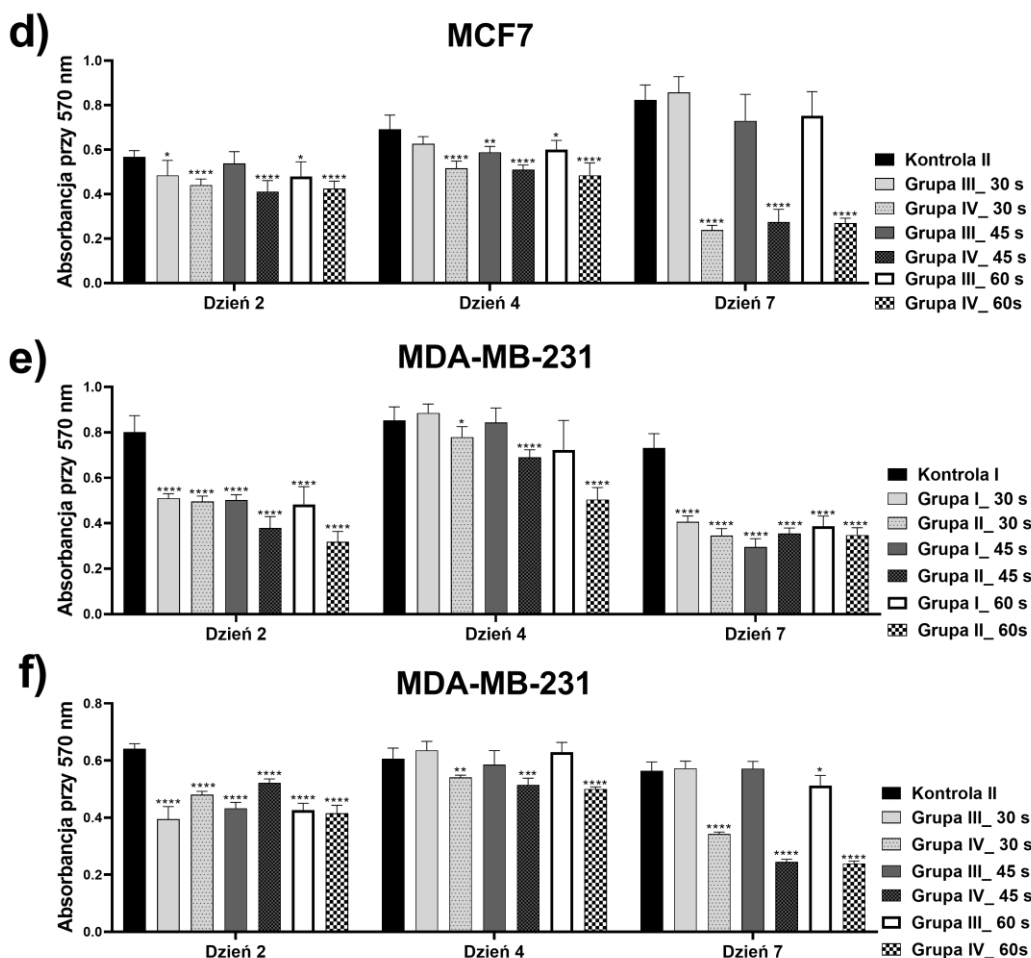
Wystąpienie zaburzeń aktywności mitochondrialnej komórek poddanych bezpośredniej ekspozycji, jak również inkubowanych w pożywce aktywowanej z użyciem zimnej plazmy zostało zbadane za pomocą testu MTT. Celem określenia minimalnej dawki toksycznej dla

pomiarów realizowanych wobec kontroli negatywnej (MCF-10A), wybrano czas bezpośredniego napromieniowania zimną plazmą, w którym nie zaobserwowano statystycznie istotnego obniżenia żywotności komórkowej. Dla grup badawczych inkubowanych w pożywce DMEM (Grupy I i II), statystycznie istotne obniżenie zdolności do proliferacji komórek linii MCF-10A zaobserwowano przy czasie bezpośredniego napromieniowania 45 i 60 s, w szczególności grup inkubowanych w pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą (Rycina 14, a)(Grupa II). Komórki poddane bezpośredniemu napromieniowaniu zimną plazmą w czasie 45 s - Grupa II, doprowadzając do znacznej redukcji ich aktywności mitochondrialnej po 48 i 96 godzinach prowadzonej analizy (Grupa II, \*\*\*\*p < 0,0001). Jednakże podobną redukcję aktywności mitochondrialnej komórek napromieniowanych w czasie 45 s nie stwierdzono po 7 dniach prowadzonego badania. Komórki linii MCF-10A napromieniowane zimną plazmą przez 60 s wykazały największą redukcję żywotności dla grupy inkubowanej w pożywce DMEM nietraktowanej (Grupa I, \*\*\*\*p < 0,0001) a także inkubowanych w pożywce napromieniowanej zimną plazmą (Grupa II, \*\*\*\*p < 0,0001) dla pomiarów prowadzonych przez 2 i 4 dni, a także redukcję ich żywotności po 7 dniach prowadzonych analiz (Grupa I i II, \*\*p < 0,0011). Rozpatrywany model *in vitro* poddany bezpośredniemu działaniu zimnej plazmy w czasie 30 s wykazał zwiększenie zdolności do proliferacji na poziomie statystycznym istotnie w 2 dniu (Grupa I, \*\*p < 0,0011), 4 dniu (Grupa II, \*\*p < 0,0011) i 7 dniu (Grupa I, \*p < 0,011) prowadzonych pomiarów. Dla analiz prowadzonych z wykorzystaniem pożywki Opti-MEM, znaczne zaburzenie żywotności komórek linii MCF-10A stwierdzono dla czasu bezpośredniego napromieniowania 45 s i 60 s. Wyniki zebrane po dwóch i czterech dniach przeprowadzonych badań wykazały porównywalne obniżenie żywotności komórek dla dwóch grup badawczych (Rycina 14, b)(Grupa III, \*\*\*p < 0,0002 i \*\*\*\*p < 0,0001; Grupa IV, \*\*\*\*p < 0,0001 i \*\*\*\*p < 0,0001 odpowiednio dla 2 i 4 dnia pomiarów). Przy najdłuższym okresie prowadzonych obserwacji, redukcja żywotności komórek linii MCF-10A dla Grupy III (\*p < 0,011) była zdecydowanie mniejsza w porównaniu z wynikami dla Grupy IV (\*\*\*\*p < 0,0001). Identyczny trend został odnotowany dla komórek poddanych bezpośredniemu działaniu zimnej plazmy w czasie 60 s. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost żywotności komórek MCF-10A poddanych ekspozycji na zimną plazmę w czasie 30 s w przypadku Grupy IV, drugiego dnia eksperymentu (\*\*p < 0,0011) a także siódmego dnia dla Grupy III i IV (\*p < 0,011 i \*\*p < 0,0011 odpowiednio).

Podsumowując uzyskane wyniki pomiaru żywotności komórek linii MCF-10A wystawionych na bezpośrednie działanie zimnej plazmy wskazują że, najmniejsza dawka toksyczna wywołująca zaburzenia aktywności mitochondrialnej została określona na 45 s. Jednakże biorąc pod uwagę wysoką toksyczność tak dobranego czasu napromieniowania na negatywną kontrolę, do dalszych badań dobrano czas ekspozycji 30 s, postrzegany jako minimalną dawkę toksyczną. Rozpatrując pomiary przeprowadzone dla linii komórkowej MCF-7 zaobserwowano znaczne zaburzenie żywotności komórek poddanych bezpośredniemu działaniu zimnej plazmy we wszystkich dobranych czasach napromieniowania. Dla drugiego i czwartego dnia prowadzenia pomiarów stwierdzono porównywalną redukcję żywotności komórek przy wszystkich rozpatrywanych grupach badawczych (Rycina 14, c i d)(Grupy I-IV), a największe różnice istotności statystycznej zaistniały dla Grupy II i IV ( $****p < 0,0001$ ) przy rozpatrywanych czasach ekspozycji tj. 30, 45 i 60 s. Największe różnice w uzyskanej odpowiedzi biologicznej dla komórek linii MCF-7 zostały odnotowane podczas siódmego dnia prowadzonych pomiarów. Dla grup badawczych angażujących traktowanie mieszane tj. Grupy II i IV uzyskano podobne obniżenie żywotności komórek we wszystkich czasach napromieniowania tj. 30, 45 i 60 s ( $****p < 0,0001$ ). W przypadku komórek poddanych wyłącznie bezpośredniemu działaniu zimnej plazmy, tylko w przypadku Grupy I uzyskano statystycznie istotne zmniejszenie aktywności mitochondrialnej dla czasu traktowania 30 s ( $**p < 0,0011$ ) i 60 s ( $***p < 0,0002$ ). Analizy prowadzone względem ostatniego modelu *in vitro*, komórki linii MDA-MB-231 również wykazały znaczną odpowiedź biologiczną na traktowanie zimnymi plazmami (Rycina 14, e i f). Wyniki uzyskane dla drugiego dnia prowadzonych prac wskazały porównywalnie wysokie obniżenie zdolności do proliferacji w przypadku Grup I-IV, rozpatrując czas bezpośredniego napromieniowania zimną plazmą na 30, 45 i 60 s ( $****p < 0,0001$ ). Statystycznie istotną redukcję żywotności komórek linii MDA-MB-231 w czwartym dniu eksperymentu stwierdzono wyłącznie dla Grupy II i IV, przy każdym z rozpatrywanych czasów bezpośredniego napromieniowania tj. 30 s (Rycina 14 e i f odpowiednio)(\* $p < 0,011$  i  $**p < 0,0011$ ), 45 s ( $****p < 0,0001$  i  $***p < 0,0002$ ), 60 s ( $****p < 0,0001$  i  $****p < 0,0001$ ) odpowiednio. W przypadku ostatniego dnia prowadzenia pomiarów, odnotowano porównywalnie znaczną redukcję żywotności komórek dla Grupy II i IV, każdego z rozpatrywanych czasów ekspozycji ( $****p < 0,0001$ ). Jednakże w odróżnieniu od wyników dla Grupy III, bezpośrednie napromieniowanie komórek linii MDA-MB-231 w Grupie I doprowadziło do równie dużego spadku żywotności komórek ( $****p < 0,0001$ ) dla czasów napromieniowania 30, 45 i 60 s.

Analizując omówione wyniki pomiarów wpływu traktowania zimną plazmą na żywotność dwóch linii nowotworu piersi, ustalona powyżej minimalna dawka toksyczna dla linii nienowotworowej MCF-10A, wywiera znaczący efekt cytotoksyczny na linie nowotworowe. Poddanie bezpośrednio napromieniowaniu komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231 w czasie 30 s i dłuższym (Grupa I i III) prowadzi do statystycznie istotnych zahamowań zdolności do proliferacji, obserwowanych w szczególności podczas drugiego i czwartego dnia prowadzonych badań. Komórki poddane bezpośrednio napromieniowaniu zimną plazmą, a następnie inkubowane w pożywce hodowlanej aktywowanej zimną plazmą (Grupy II i IV) wykazały zwiększoną tendencję do zahamowania aktywności mitochondrialnej. Bezpośrednia ekspozycja komórek raka piersi na źródło zimnej plazmy zdaje się wprowadzać je w stan wyjątkowej wrażliwości na aktywność pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą. Efekt ten wydaje się być najbardziej dostrzegalny dla komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231 poddanych traktowaniu w Grupie IV, podczas siódmego dnia prowadzonych pomiarów.





**Rycina 14.** Pomiary żywotności komórek ludzkiej linii nienowotworowej MCF-10A, ludzkiej linii nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231, ludzkiej linii nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 z wykorzystaniem testu MTT, poddanych obserwacji w czasie 2, 4 i 7 dni. Wykresy a, c, e uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231 poddane bezpośredniej ekspozycji w czasie 30 s na zimną plazmę, inkubowane w pożywce DMEM nietraktowanej (Grupa I) lub pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> i czasie 180 s (Grupa II). Wykresy b, d, f uwzględniające linie komórkowe MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231 poddane bezpośredniej ekspozycji w czasie 30 s na zimną plazmę, inkubowane w pożywce Opti-MEM nietraktowanej (Grupa I) lub pożywce Opti-MEM aktywowanej zimną plazmą w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> i czasie 180 s (Grupa II). Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednio ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe dla trzech oddzielnych eksperymentów uzyskanych w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,011; \*\* p < 0,0011; \*\*\* p < 0,0002; \*\*\*\* p < 0,0001).

Badania nad wpływem bezpośredniego traktowania zimną plazmą wybranych modeli *in vitro* na zdolność proliferacji prowadzone były również przez inne zespoły badaczy. W pracy zrealizowanej przez zespół Mirpour (Mirpour i wsp., 2014) wykorzystano układ wyładowczy generujący zimną plazmę typu plazmowy dżet w atmosferze helu do bezpośredniego napromieniowania komórek linii MCF-7 i MCF-10A. Komórki w liczbie 2

x 10<sup>4</sup> komórek/dołek zawieszono w objętości 0,1 cm<sup>3</sup> PBS zostały poddane działaniu stożka zimnej plazmy w czasie 30, 60, 120 i 300 s. Najdłuższy z wybranych czasów napromieniowania doprowadził do redukcji żywotności komórek normalnych na poziomie 32 %, podczas gdy dla komórek linii MCF-7 odnotowano 60 % spadek żywotności. Ponadto należy nadmienić, że 30-sekundowy czas ekspozycji na zimną plazmę komórek normalnych nie doprowadził do widocznych zmian w aktywności mitochondrialnej.

Badania przeprowadzone przez zespół Kalghatgi (Kalghatgi i wp., 2011) skupiały się wokół bezpośredniego napromieniowania komórek linii MCF-10A (w liczbie 1 x 10<sup>4</sup>) zimną plazmą generowaną w układzie wyładowań barierowych w atmosferze otaczającego powietrza. Czas bezpośredniego traktowania zimną plazmą został ustalony na 15, 30, 45, 60, 75, 90 i 115 s. Znaczące spadki żywotności komórek linii MCF-10A zostały zaobserwowane dla czasów ekspozycji 45 s i dłuższych. W świetle pracy zrealizowanej przez zespół Kim (Kim i wsp., 2020), podjęto starania określenia wpływu bezpośredniego traktowania zimną plazmą na regulację ekspresji ZNRD1 w komórkach linii MCF-7. Komórki zawieszono w kompletnej pożywce hodowlanej RPMI 1640 były poddawane bezpośredniemu działaniu zimnych plazm generowanych w atmosferze argonu za pomocą wyładowań barierowych, dobierając czas traktowania na 30 s, który powtarzany był 10-cio krotnie z godzinnymi przerwami bądź jednokrotnie traktując przez okres 600 s. Odnotowano największy spadek żywotności komórek linii MCF-7 podczas 600-sekundowej ekspozycji na zimną plazmę, natomiast wielokrotne napromieniowanie komórek przez okres 30 s również doprowadziło do statystycznie istotnego spadku zdolności proliferacji.

Odnosząc uzyskane wyniki do kolejnej pracy, w badaniach przeprowadzonych przez zespół Zhang (Zhang i wsp., 2020) komórki linii MCF-7 i HeLa zawieszono w objętości 2 cm<sup>3</sup> kompletnej pożywki DMEM poddano traktowaniu zimnej plazmy generowanej w układzie wyładowań barierowych w czasie 20 i 40 s. Obydwa rozpatrywane modele *in vitro* wykazały wysoką podatność na zimną plazmę, prowadząc do dużej redukcji ich żywotności z czasem ekspozycji 20 i 40 sekund, w szczególności podczas 24 godzin prowadzonych pomiarów. Ciekawe podejście do realizowanych prac zostało zaprezentowane przez zespół Lin (Lin i wsp., 2020), gdzie zaprezentowano bezpośrednio potraktowanie komórek linii MDA-MB-231 z wykorzystaniem autorskiego układu wyładowczego, opartego na wyładowaniach barierowych. Komórki w liczbie 2 x 10<sup>5</sup> zawieszono w 0,1 cm<sup>3</sup> PBS, zostały wystawione na działanie zimnej plazmy w czasie 60 i 120 s. Z tak przeprowadzonych



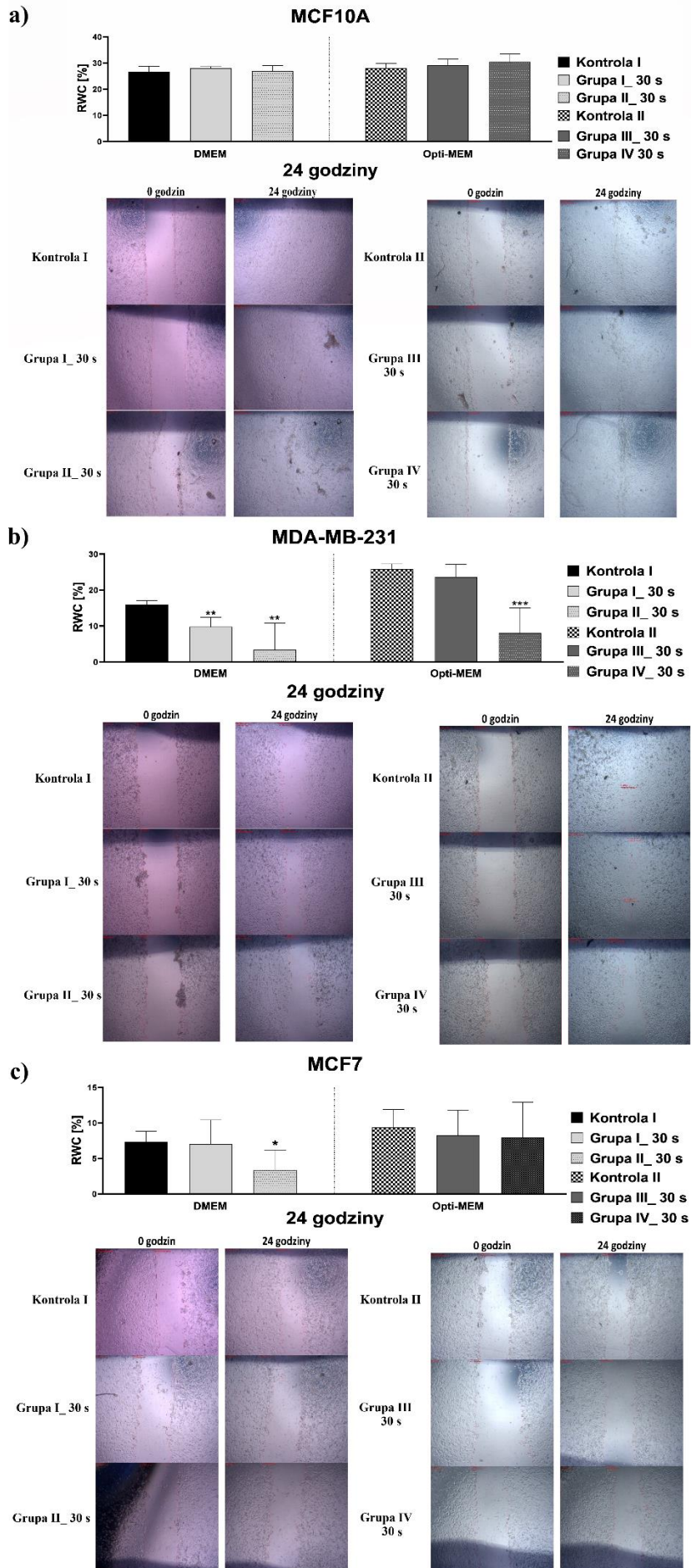
pomiarów uzyskano porównywalne wyniki dla obydwu czasów napromieniowania, doprowadzając do odpowiednio 70,5 % i 72,1 % obniżenia żywotności komórek linii MDA-MB-231.

Opierając się na przytoczonych pracach badawczych, dostrzec można wyraźną korelację z wynikami przedstawionymi na łamach niniejszej rozprawy. Komórki nienowotworowe wystawione na bezpośredni kontakt z stożkiem zimnej plazmy wykazują wysoki poziom odporności na tego typu traktowania. Jednakże wydłużenie czasu oddziaływania z zimną plazmą doprowadza do zauważalnej cytotoksyczności, a w większości przypadków minimalna dawka toksyczna jest określana na okres 30 s w przypadku komórek linii MCF-10A. Wspomniany czas bezpośredniego napromieniowania zimnymi plazmami prowadził do znacznego zmniejszenia żywotności komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231. Ponadto w większości przytoczonych prac, uzyskiwany efekt cytotoksyczności ulegał zwiększeniu wraz z wydłużonym czasem ekspozycji na źródło zimnej plazmy. W pracach porównujących wrażliwość na bezpośrednie napromieniowanie zimną plazmą pomiędzy komórkami linii MCF-7 i MDA-MB-231, linia nowotworowa o wysokiej zdolności przerzutowania odznacza się wyższą podatnością (Park i wsp., 2015). Należy jednak nadmienić, że nie znaleziono prac podejmujących tematyki przeprowadzenia badań nad poddaniem komórek raka piersi bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnych plazm a następnie ich inkubacji w pożywce aktywowanej zimną plazmą.

### **11.3. Wpływ bezpośredniego i mieszanego traktowania zimną plazmą na zdolności migracji komórek nowotworowych**

Ruchliwość komórek wybranych modeli *in vitro* poddanych bezpośredniemu działaniu zimnej plazmy, a także ich inkubacji w pożywce aktywowanej zimną plazmą została zbadana za pomocą testu zarysowania. W tym celu, komórki zawieszono w objętości 2 cm<sup>3</sup> PBS (0,5 x 10<sup>6</sup> komórek/cm<sup>3</sup> pożywki) zostały poddane bezpośredniemu działaniu stożka zimnych plazm przez 30 s (ustalone jako minimalna dawka toksyczna). Zawiesina komórkowa bezpośrednio potraktowana zimną plazmą została następnie przygotowana do testu zarysowania zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale **10.6. Badanie zdolności migracji komórek – test zarysowania**. Dołki wraz z komórkami osadzonymi na płytkach testowych z naniesionymi zarysowaniami zostały uzupełnione o kompletną pożywkę DMEM bądź Opti-MEM (Grupa I i III) lub pożywkę aktywowaną zimną plazmą (Rycina 15, a, b, c)(Grupa II i IV), które zostały poddane traktowaniu w objętości 1,5 cm<sup>3</sup> przez czas

180 s, a 3 % dodatek FBS był wprowadzany po traktowaniu zimną plazmą. Zdjęcia płytek testowych ze sporządzonymi zarysowaniami były rejestrowane w ciągu 24 godzin. Zaprezentowane wyniki przeprowadzonych pomiarów zostały opracowane z wykorzystaniem metodologii obliczeniowej RWC (Rycina 15). Wyniki przeprowadzonego testu zarysowania dla komórek linii MCF-10A wykazały brak negatywnego wpływu na zaburzenie zdolności do migracji dla wszystkich grup badawczych (Rycina 15, a)(Grupy I-IV). Zauważyć można ponadto nieznaczny wzrost ruchliwości komórek nienowotworowej linii MCF-10A inkubowanych w pożywce Opti-MEM poddanych działaniu zimnej plazmy (Grupa IV kontra Kontrola II,  $30,42 \pm 3,09$  % kontra  $28,02 \pm 1,76$ )(Rycina 15, a). Zauważalne zahamowanie zdolności do migracji zaobserwowano w przypadku wyników dla komórek linii MDA-MB-231. W przypadku grup badawczych inkubowanych w pożywce DMEM (Grupa I i II) uzyskano statystycznie istotne zmniejszenie zdolności do zarastania naniesionego zarysowania w porównaniu z Kontrolą I (Rycina 15, b)( $15,90 \pm 1,14$  %;  $9,82 \pm 2,45$  % i  $3,43 \pm 7,42$  % odpowiednio) (\*\*p < 0,002), wskazując na porównywalną efektywność traktowania bezpośredniego, jak i mieszanego. Pomiar przeprowadzone dla komórek MDA-MB-231 inkubowanych w pożywce Opti-MEM, wyłącznie dla traktowania mieszanego (Grupa IV), wykazały znaczne zahamowanie zdolności migracji w porównaniu z Kontrolą II (Rycina 15, b)( $25,81 \pm 1,47$  % kontra  $8,05 \pm 7,02$ )(\*\*\*p < 0,0003). Opierając się na wynikach uzyskanych dla linii komórkowej MCF-7, statystycznie istotne zmiany w tempie migracji zarejestrowano wyłącznie dla komórek poddanych bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy, a następnie inkubowanych w pożywce DMEM aktywowanej zimną plazmą (Rycina 15, c)(Grupa II kontra Kontrola I,  $7,31 \pm 1,50$  % kontra  $3,38 \pm 2,76$  %) (\*p < 0,02).



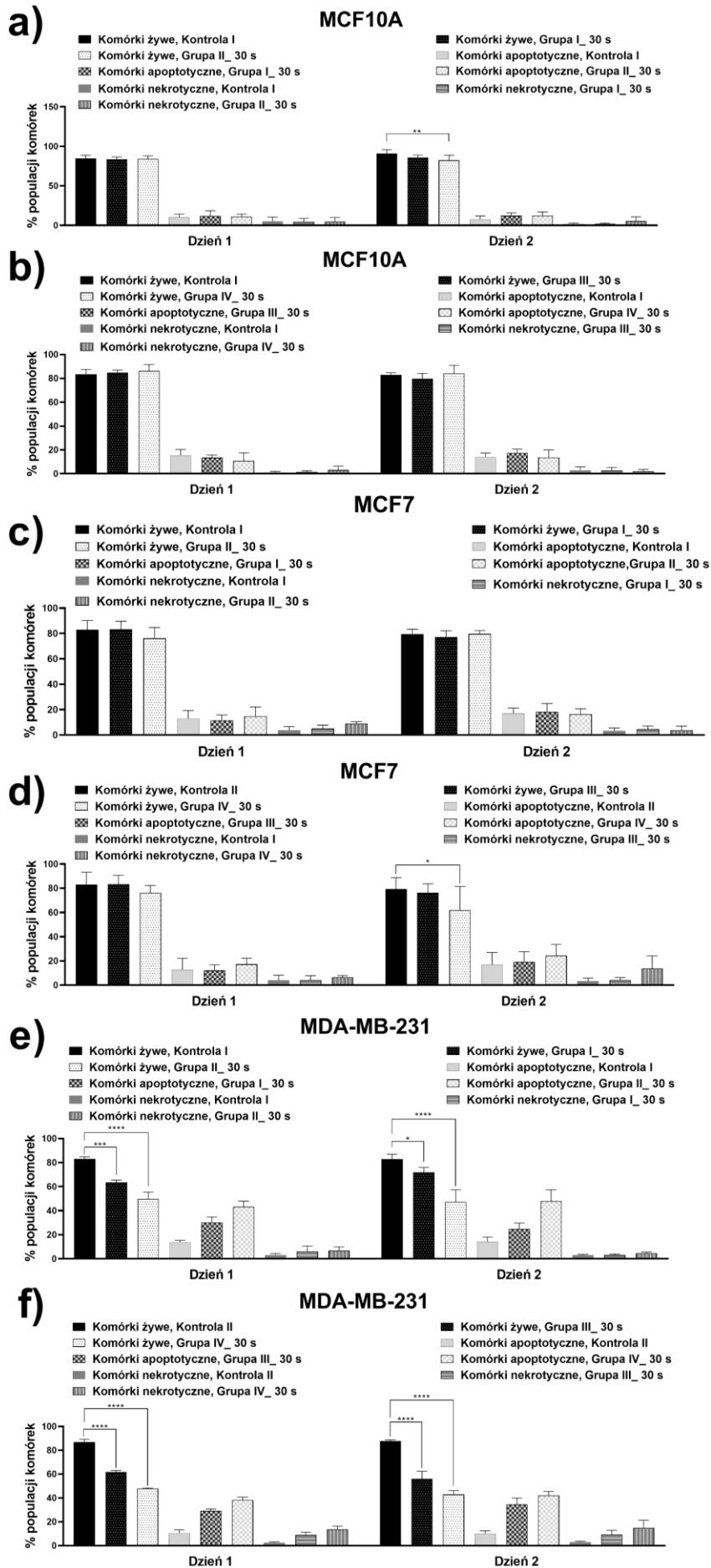
**Rycina 15.** Wyniki testu zarysowania wykorzystanego do oceny zdolności migracji ludzkiej linii komórek nienowotworowych MCF-10A (Wykres a), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Wykres b) i ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania MCF-7 (Wykres c) poddanych bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy. Wytworzona warstwa komórkowa pokrywająca powierzchnię dołka płytki testowej została zarysowana, a oderwane komórki wraz ze starą pożywką zostały zastąpione przez 1,5 cm<sup>3</sup> pożywki DMEM (Grupa II) lub Opti-MEM (Grupa IV) aktywowanej zimną plazmą w czasie 180 s. Obszar względnego zamknięcia rany (RWC) został obliczony w oparciu o 24 godzinną obserwację. Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednią ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Wyznaczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie ± odchylenie standardowe pochodzące od trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\* p < 0,02; \*\* p < 0,002; \*\*\* p < 0,0003; \*\*\*\* p < 0,0001).

Uzyskane różnice w zdolności do migracji komórek poddanych działaniu bezpośredniemu i mieszanemu na źródło zimnych plazm, porównano z badaniami przeprowadzonym przez zespół Xiang (Xiang i wsp., 2018). W przytaczanej pracy przeprowadzono dwa oddzielne eksperymenty z wykorzystaniem zimnej plazmy. Przy pierwszym doświadczeniu, źródło zimnej plazmy tj. plazmowy dżet operowany w atmosferze helu został wykorzystany do bezpośredniego napromieniowania komórek linii MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 i MCF-10A w czasie 10, 20, 30, 40 i 50 s. Drugi eksperyment polegał na inkubacji wspomnianych modeli *in vitro* w nieokreślonej pożywce hodowlanej, napromieniowanej źródłem zimnej plazmy przez czas 1, 2, 3, 4 i 5 min w objętości 2 cm<sup>3</sup>. Pomimo przeprowadzonych pomiarów bezpośredniego traktowania wybranych linii komórkowych, pomiary zdolności do migracji komórek przeprowadzono jedynie dla grup poddanych na działanie pożywki aktywowanej zimną plazmą w czasie 5 min. Komórki nienowotworowe MCF-10A inkubowane w pożywce aktywowanej plazmą wykazały obniżenie zdolności do migracji na poziomie 67 % i 90 % w trakcie 8 i 16 godzin prowadzonych pomiarów. Porównywalnie niewielkie obniżenie zdolności do migracji stwierdzono dla komórek linii MCF-7, wynoszącym odpowiednio 91 %, 94 % i 89 % dla czasu prowadzenia pomiarów 8, 16 i 24 godziny. Największe obniżenie zdolności migracji stwierdzono dla komórek linii MDA-MB-231, prowadząc do 63 %, 70 % i 79 % redukcji przez czas prowadzenia obserwacji. Pomimo znacznego zahamowania mobilności komórek nienowotworowych w początkowym okresie prowadzonych badań, rozpatrywany model *in vitro* odznaczał się największą odpornością na działanie zimnych plazm. Komórki linii MDA-MB-231 wykazują największą wrażliwość na inkubację w pożywce aktywowanej plazmą. Wyniki zdają się dobrze korelować z tymi, zaprezentowanymi w niniejszej rozprawie, pomimo wykorzystania mniejszej dawki zimnej plazmy.

#### 11.4. Śmierć komórkowa inicjowana bezpośrednim i mieszanym działaniem zimnej plazmy

Pełniejsze określenie efektu cytotoksycznego wywoływanego przez zimną plazmę na komórki linii MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231 przeprowadzono z wykorzystaniem barwienia komórkowego Aneksyną V i Jodkiem Propidyny (PI). Analizując oznaczoną populację komórek żywych linii MCF-10A inkubowanych w DMEM (Grupy I i II), podczas pierwszego dnia prowadzonych badań nie stwierdzono statystycznie istotnych odchyżeń w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej (Kontrola I)(Rycina 16, a). Sytuacja ta uległa zmianie w przypadku drugiego dnia eksperymentu, gdzie stwierdzono znaczący spadek populacji komórek żywych, poddanych traktowaniu mieszanemu (Grupa II) zimną plazmą (Dzień 2, od  $90,80 \pm 5,06$  % do  $82,27 \pm 6,37$  %;  $**p < 0,003$ ). Spadkowi populacji komórek żywych towarzyszył zauważalny przyrost populacji komórek apoptotycznych (z  $7,63 \pm 4,33$  % do  $12,36 \pm 4,54$  %) oraz komórek w fazie nekrozy (z  $1,58 \pm 1,27$  % do  $5,38 \pm 5,38$  %). Komórki poddane wyłącznie bezpośredniemu działaniu stożka zimnej plazmy nie wskazały istotnej indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej (Grupa I). Biorąc pod uwagę brak negatywnego wpływu bezpośredniego traktowania zimną plazmą względem komórek linii MCF-10A, w grupie traktowania mieszanego znaczący spadek liczności komórek żywych może być efektem wprowadzenia komórek w stan wrażliwości na działanie pożywki aktywowanej zimną plazmą. Efektu wrażliwości na działanie pożywki aktywowanej zimną plazmą nie stwierdzono w przypadku grup inkubowanych w Opti-MEM (Rycina 16, b)(Grupa III i IV). W tym przypadku nie stwierdzono znaczącego obniżenia liczności komórek żywych poddanych bezpośredniej ekspozycji stożek zimnej plazmy (Grupa III) jak i poddanych traktowaniu mieszanemu (Grupa IV). Wyniki uzyskane dla linii nowotworu piersi o niewielkiej zdolności przerzutowania MCF-7, wykazały statystycznie nieistotne zmiany w populacji komórek żywych, które zostały poddane bezpośredniemu działaniu zimnych plazm (Grupa I) jak i traktowaniu mieszanemu (Grupa II), inkubowanych w pożywce DMEM (Rycina 16, c). Dla komórek linii MCF-7 inkubowanych w pożywce Opti-MEM, znaczące zmniejszenie populacji komórek żywych stwierdzono dla grupy traktowania mieszanego (Grupa IV), podczas drugiego dnia prowadzonych doświadczeń (Rycina 16, d)(Dzień 2, od  $79,40 \pm 9,45$  % do  $61,85 \pm 19,61$  %;  $*p < 0,02$ ). Największy wzrost populacji komórkowej dla tej grupy badawczej został stwierdzony wśród komórek nekrotycznych (Dzień 2, od  $3,49 \pm 2,48$  % do  $13,71 \pm 10,54$  %,  $**p < 0,003$ ), wskazując że inkubacja komórek napromieniowanych w Opti-MEM aktywowanym

zimną plazmą przyczynia się do indukcji śmierci komórek głównie w procesie nekrozy. Badania przeprowadzone dla komórek linii MDA-MB-231 inkubowanych w pożywce DMEM wykazały znaczny efekt cytotoksyczny. Dla komórek poddanych bezpośrednio działaniu zimnej plazmy, obserwowano statystycznie istotny spadek liczebności populacji komórek żywych (Rycina 16, e)(Dzień 1, od  $82,98 \pm 1,82$  % do  $63,57 \pm 1,94$  %;  $***p < 0,0002$ , Dzień 2, od  $82,80 \pm 4,20$  % do  $71,96 \pm 4,03$  %;  $*p < 0,02$ ). Największy wzrost liczebności wystąpił dla populacji komórek apoptotycznych, będąc główną ścieżką śmierci komórkowej. Komórki traktowane w sposób mieszany źródłem zimnej plazmy (Grupa II), wykazały największe obniżenie liczebności komórek żywych zarówno dla pierwszego jak i drugiego dnia prowadzonego badania (Dzień 1, od  $82,98 \pm 1,82$  % do  $49,78 \pm 5,59$  %;  $****p < 0,0001$ , Dzień 2, od  $82,80 \pm 4,20$  % do  $47,28 \pm 10,28$  %;  $****p < 0,0001$ ). Komórki linii MDA-MB-231 poddane traktowaniu mieszanemu (Grupa II) ulegały w największym stopniu śmierci apoptotycznej. Dla pomiarów prowadzonych z komórkami linii MDA-MB-231 inkubowanych w pożywce Opti-MEM, traktowanej zimną plazmą prowadziło do znacznego efektu cytotoksycznego (Rycina 16, f). Bezpośrednie oddziaływanie stożka zimnej plazmy z komórkami (Grupa III) doprowadziło do statystycznie istotnego zmniejszenia populacji komórek żywych (Dzień 1, od  $86,87 \pm 2,34$  % do  $61,76 \pm$  %;  $****p < 0,0001$ , Dzień 2, od  $87,76 \pm 1,01$  % do  $55,98 \pm$  %;  $****p < 0,0001$ ). Pomiar efektywności traktowania mieszanego komórek linii MDA-MB-231 doprowadziły do największej redukcji populacji komórek żywych z pośród wszystkich grup badawczych (Grupa IV). Dla pierwszego dnia pomiarów populacja komórek żywych zmalała z  $86,87 \pm 2,34$  % do  $47,98 \pm 0,59$  % ( $****p < 0,0001$ ), a dla drugiego dnia zmalała z  $87,76 \pm 1,01$  % do  $42,87 \pm 3,45$  % ( $****p < 0,0001$ ). W tym przypadku podobnie oddziaływanie z zimną plazmą prowadziło w głównej mierze do indukcji śmierci apoptotycznej. Dostrzegalny efekt cytotoksyczny wywołany przez traktowanie mieszane komórek linii MDA-MB-231, występował w porównywalnym stopniu podczas dwóch dni prowadzonych pomiarów. Wysoki stopień indukcji śmierci apoptotycznej może być związany z wprowadzaniem komórek w stan wrażliwości w wyniku bezpośredniej ekspozycji na stożek zimnej plazmy. Komórki w formie wrażliwej, wykazały zwiększoną podatność na działanie pożywki hodowlanej napromieniowanej zimną plazmą. Ponadto zauważyć można, że komórki linii MDA-MB-231 odznaczają się najwyższą wrażliwością na traktowanie źródłem zimnej plazmy, prowadząc do znacznej indukcji apoptozy.



**Rycina 16.** Wyniki przedstawiające procentowy udział populacji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii MCF-10A (Wykresy a i b), ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania MDA-MB-231 (Wykresy c i d), ludzkiego nowotworu piersi o niskiej zdolności przerzutowania (Wykresy e i f). Linie komórkowe MCF-10A (Wykres a), MDA-MB-231 (Wykres c) i MCF-7 (Wykres e), poddane bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy w czasie 30 s, były inkubowane w pożywce DMEM nietraktowanej (Grupa I) lub aktywowanej zimną plazmą (Grupa II). Linie komórkowe MCF-10A (Wykres b), MDA-MB-231 (Wykres d) i MCF-7 (Wykres f), poddane bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy w czasie 30 s, były inkubowane w pożywce Opti-MEM nietraktowanej (Grupa III) lub aktywowanej zimną plazmą (Grupa IV). Jako kontrolę, komórki nietraktowane bezpośrednią ekspozycją zimnej plazmy, inkubowane były w nietraktowanych pożywkach hodowlanych (Kontrola I – nietraktowana pożywka DMEM, Kontrola II – nietraktowana pożywka Opti-MEM). Obliczone wyniki zostały zaprezentowane jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe wyznaczone z trzech niezależnych doświadczeń przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprzez porównanie wszystkich grup badawczych kontra kontrola wykorzystując test jednoczynnikowej analizy ANOVA z wielokrotnym porównywaniem testu Dunnetta post hoc (\*  $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,003$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Przytaczając pracę zrealizowaną przez zespół Kalghatgi (Kalghatgi i wsp., 2011), komórki linii MCF-10A wystawiono na bezpośrednią ekspozycję źródła zimnej plazmy generowanej w wyniku wyładowań barierowych w czasie 15, 30 i 60 i 115 s. Analizując zaprezentowane wyniki badań, populacja komórek apoptotycznych napromieniowanych przez 45 s wynosiła 28 %, a wraz z wydłużeniem czasu traktowania do 115 s, populacja wyniosła ponad 45 %. Należy nadmienić, że bezpośrednio napromieniowanie w czasie 30 s doprowadziło do ponad 20 % populacji komórek apoptotycznych. W tym przypadku, pomimo stosunkowo niewielkiej dawki zimnej plazmy, komórki linii MCF-10A nie pozostają w pełni niewrażliwe na ten czynnik. Analizę wpływu pożywki aktywowanej zimną plazmą na indukcję śmierci apoptotycznej w komórkach linii MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 przedstawiono w pracy zespołu Xiang (Xiang i wsp., 2018). Dla wyników uzyskanych względem linii MCF-10A, odnotowano nieznaczny wzrost populacji komórek apoptotycznych z 5,85 % do 8,17 %. W przypadku komórek linii MCF-7, populacja komórek apoptotycznych również nieznacznie wzrosła z 12,26 % do 12,92 %, natomiast w przypadku komórek linii MDA-MB-231 wzrost ten był bardziej zauważalny – z poziomu 5,62 % do 9,39 %. W tym przypadku również należy podkreślić, że komórki nienowotworowe MCF-10A wystawione na działanie pożywki aktywowanej plazmą nie wykazują braku wrażliwości. Z drugiej strony, efektywność oddziaływania pożywki aktywowanej na komórki linii MDA-MB-231 pozostaje większa w porównaniu do linii MCF-7, jednakże indukcja śmierci apoptotycznej nie jest znacząca. Porównując efektywność bezpośredniego napromieniowania komórek linii MCF-10A i MCF-7 helową zimną plazmą przytoczone zostaną wyniki prac zespołu Mirpour (Mirpour i wsp., 2014). Statystycznie istotne różnice w populacji komórek apoptotycznych linii MCF-7 zostały potwierdzone dla czasu bezpośredniej ekspozycji źródłem zimnej plazmy wynoszącym 120 s i dłuższym. Odwrotną sytuację odnotowano dla komórek linii MCF-10A, gdzie znaczące



wzrosty liczności komórek apoptotycznych stwierdzono dla czasu traktowania 30 i 60 s. Ponadto zimna plazma wzbudzana z mieszanki helu wraz z tlenem, znacząco zmieniała uzyskiwane wyniki. W tym przypadku, czas traktowania 30 s przyczynił się do 2,2-krotnego wzrostu liczności komórek apoptotycznych linii MCF-7, a ich liczba wzrastała wraz z wydłużonym czasem traktowania. Komórki linii MCF-10A pozostawały niewrażliwe na działanie zimnej plazmy generowanej z mieszaniny gazu helu z tlenem, dla czasów napromieniowania do 120 s.

W świetle przedstawionych wyników badań prezentowanych przez środowisko naukowe, dostrzec można kilka znaczących zależności. Podejmując się bezpośredniego traktowania źródłem zimnej plazmy atmosferycznej komórek linii nienowotworowej tj. MCF-10A, uzyskujemy niski efekt cytotoksyczny dla określonego, krótkiego czasu napromieniowania. Dla tak ustalonych dawek dostarczanej zimnej plazmy, obserwowano niewielkie wzrosty liczności komórek apoptotycznych. W tak dobranych czasach traktowania zimną plazmą względem komórek nowotworowych, komórki linii MCF-7 a także MDA-MB-231 wykazują zwiększoną podatność na źródło zimnej plazmy. Szczególnie wrażliwą na tego typu czynnik wydaje się być linia komórkowa o wysokiej zdolności do przerzutowania. W ramach prowadzonych prac, kluczowym zdaje się zatem rozpatrywanie inicjowanych efektów cytotoksycznych zarówno względem komórek linii nowotworowych piersi a także kontroli negatywnej, w tym przypadku linii MCF-10A.

## **12. Podsumowanie i wnioski po realizacji zadania II**

- I. Poddanie komórek nienowotworowej linii MCF-10A bezpośredniemu traktowaniu źródłem zimnej plazmy atmosferycznej w czasie 30 s nie doprowadziło do znaczących zaburzeń ich żywotności.
- II. Komórki linii MCF-10A poddane bezpośredniemu traktowaniu zimnej plazmy zostały wprowadzone w stan zwiększonej wrażliwości na działanie pożywki DMEM aktywowanej zimną plazmą. W tym przypadku, zaburzenie aktywności mitochondrialnej zostało odnotowane jedynie podczas 4 dnia prowadzonego doświadczenia
- III. Bezpośrednia ekspozycja komórek na źródło zimnej plazmy wykazuje widoczny efekt cytotoksyczny jedynie względem komórek linii MDA-MB-231. Obserwowano dla tej grupy badawczej istotne zahamowanie zdolności do migracji a także indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej.

- IV. Komórki wprowadzone w stan wrażliwości wskutek poddania bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy, wystawione na działanie pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą wykazują spotęgowanie efektów cytotoksycznych. Dla tej grupy eksperymentalnej stwierdzono znaczące zahamowanie zdolności do migracji a także wzrost indukcji śmierci apoptotycznej w komórkach linii MCF-7 i linii MDA-MB-231.
- V. Wzmoczona indukcja śmierci apoptotycznej u komórek linii MDA-MB-231 poddanych równoczesnemu działaniu bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy a następnie kontaktowi z pożywkami aktywowanymi zimną plazmą stanowi o istotności dobrania sposobu wykorzystania źródła zimnej plazmy na indukcję określonego efektu cytotoksycznego.
- VI. Ponad wszelką wątpliwość potwierdzono zwiększoną podatność komórek linii MDA-MB-231 na działanie bezpośrednie, pośrednie i mieszane źródłem zimnej plazmy atmosferycznej inicjowanej w autorskim układzie reakcyjno-wyładowczym. Uzyskane wyniki mogą stanowić znaczący wkład do rozwoju stanu wiedzy prowadzącego do stworzenia alternatywnej terapii dedykowanej dla ludzkiego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania.

### **Zadanie III. Bezpośrednie zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków**

**Trzecie zadanie badawcze** w zaprezentowanej rozprawie skupiało się wokół bezpośredniego wykorzystania dwóch układów generujących zimne plazmy atmosferyczne celem obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków, obniżając ich stężenie. Nowatorski układ wyładowczy, który został wykorzystany do realizacji pierwszego i drugiego zadania badawczego, dzięki przeprowadzeniu wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operacyjnych a także modyfikacji konstrukcyjnych, zostanie zbadany pod względem efektywności degradacji antybiotyków tj. ofloksacyny (OFX), doksycykliny (DXC), ampicyliny (AMP), chloroamfenikolu (ChRP) wraz z mieszaninami tych czterech farmaceutyków z roztworów wodnych. Otrzymane tym sposobem roztwory wodne antybiotyków zostały zbadane pod względem indukowanej odpowiedzi biologicznej względem bakterii z grupy Gram (-) i Gram(+) tj., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* i *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae*.

**Hipoteza badawcza 1:** zoptymalizowany i zmodyfikowany konstrukcyjnie układ wyładowczy, generujący zimne plazmy w atmosferze helu z azotem, w wyniku wyładowań barierowych generuje różne reaktywne formy tlenu i azotu, mogące przyczynić się do degradacji molekuł rozpatrywanych farmaceutyków, skutecznie zmniejszając ich stężenie.

**Hipoteza badawcza 2:** roztwory wodne farmaceutyków poddane działaniu zimnej plazmy, pomimo wytworzenia dużych ilości reaktywnych form tlenu i azotu, przyczynią się do obniżenia zawartości antybiotyków, jednakże nie będą wykazywały właściwości biobójczych, skutecznie obniżając zjawisko wielolekowej oporności.

Podjęte zostały starania nad stworzeniem i przeprowadzeniem wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operowania pióra plazmowego a także szczotki plazmowej, dedykowanych do procesów degradacji antybiotyków z roztworów wodnych. Główną motywacją podejmowanych prac była chęć zaproponowania ekologicznej metody umożliwiającej przeprowadzenie oczyszczania wody z Ofloksacyny (OFX), Doksycykliny (DXC), Ampicyliny (AMP), Chloroamfenikolu (ChRP) oraz mieszanin tych antybiotyków o wybranych stężeniach. Mając również na uwadze możliwość rozwoju wielolekowej oporności patogenów wystawionych na działanie dawek subletalnych wymienionych farmaceutyków, roztwory po traktowaniu zimną plazmą były wykorzystane do badań względem bakterii z grupy Gram(-) i Gram(+).

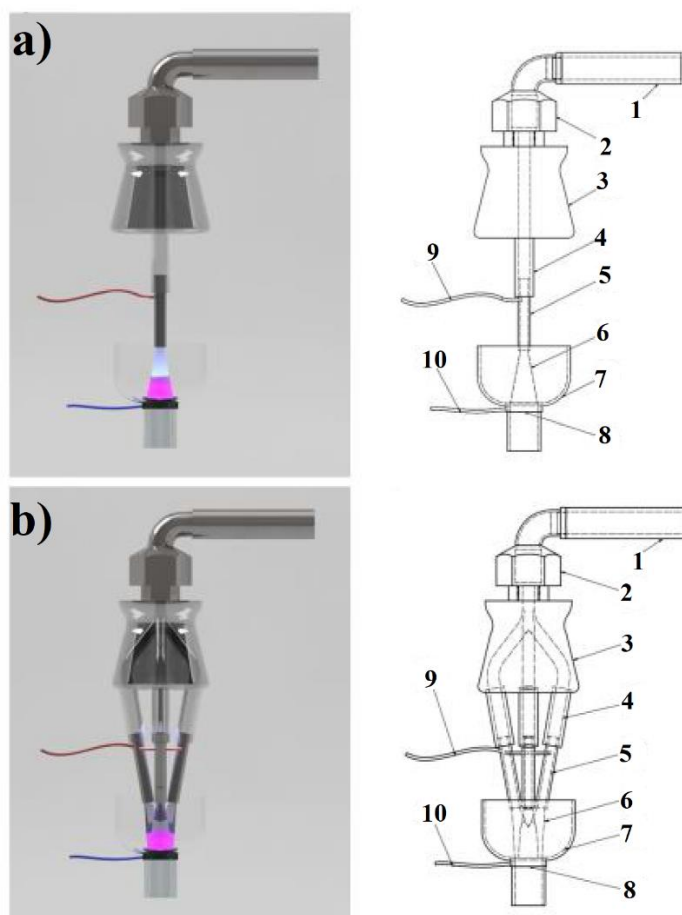
### **13. Materiały i metodyka badawcza dla realizacji zadania III**

#### **13.1. Antybiotyki**

Do zbadania efektywności rozkładu farmaceutyków z pomocą układów pióra plazmowego i szczotki plazmowej, wykorzystano antybiotyki tj. OFX (CAS 82419-36-1), DXC (hyklan doksycykliny, CAS 24390-14-15), AMP (sól sodowa, CAS 69-52-3), ChRP (CAS 56-75-7) przygotowując roztwory z wodą dejonizowaną o stężeniu pojedynczego składnika  $35 \text{ mg/dm}^3$  a także mieszaniny tych czterech antybiotyków o stężeniu każdego z nich wynoszącym  $35 \text{ mg/dm}^3$  ( $M_{35}$ ) bądź  $10 \text{ mg/dm}^3$  ( $M_{10}$ )

#### **13.2. Układy wyładowcze zimnych plazm – pióro plazmowe i szczotka plazmowa**

Procesy rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych zostały przeprowadzone z wykorzystaniem autorskiego układu reakcyjno-wyładowczego, gdzie końcowym jego elementem generującym zjonizowany gaz wyładowczy w postaci stożka zimnej plazmy pozostaje pióro plazmowe lub szczotka plazmowa. Głównym elementem konstrukcyjnym pióra plazmowego pozostaje miedziana rurka pełniąca rolę elektrody (Rycina 17, a, element 5), opleciona przewodem miedzianym (Rycina 17 a, element 9), doprowadzona do przyłącza z gazem wyładowczym w postaci nasadki z tworzywa sztucznego (Rycina 17 a, element 3). Mieszanina 95 % helu ( $\text{He}$ , 99,999 %, SIAD, Wrocław, Polska) z 5 % domieszką azotu ( $\text{N}_2$ , 99,999%, SIAD, Ruda Śląska, Polska) ( $\text{He}+\text{N}_2$ ) dostarczana jest do elektrody mosiężnej poprzez nasadkę (Rycina 17 a, element 3) z zaworem (Rycina 17 a, element 2) połączoną za pomocą wężyka (Rycina 17 a, element 1) z przepływomierzami umożliwiającymi regulację przepływu  $\text{He}$  i  $\text{N}_2$ . Roztwór wodny antybiotyku tłoczony za pomocą pompy perystaltycznej, dwukanałowej (Masterflex L/S, Core Palmer, Vernon Hill, USA) dostarczany jest do komory reakcyjnej (Rycina 17a, element 7) owiniętej przewodem miedzianym, (Rycina 17 a, element 10) generując ciekłą elektrodę. Poprzez zamknięcie obwodu elektrycznego, wytwarzanego z wykorzystaniem przenośnego generatora wysokich napięć o możliwości modulacji częstotliwości napięć oraz wypełnienia, mieszanina  $\text{He}+\text{N}_2$  zostaje zjonizowana, tworząc stożek zimnej plazmy (Rycina 17 a, element 6). Przepływający roztwór antybiotyku z natężeniem przepływu  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$  po kontakcie z zimną plazmą, był w ciągły sposób zbierany z odbiornika zamontowanego w komorze reakcyjnej (Rycina 17 a, element 7), umożliwiając tym samym prowadzenie procesu w trybie ciągłego przepływu.



**Rycina 17.** Graficzne przedstawienie pióra plazmowego (wykres a) i szczotki plazmowej (wykres b). **Element 1** – przyłączy gazu He+N<sub>2</sub>, **element 2** – zawór przyłącza gazu, **element 3** – nasadka łącząca elektrodę z przyłączem gazu, **element 4** – łączenie elektrody mosiężnej, **element 5** – elektroda mosiężna, **element 6** – stożek zimnej plazmy, **element 7** – komora reakcyjna wraz odbiornikiem, **element 8** – przepływający roztwór antybiotyków, **element 9**- obejma z drutu miedzianego, **element 10**- obejma z drutu miedzianego.

### 13.3. Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra plazmowego

Dla uzyskania maksymalnej efektywności usuwania antybiotyku z roztworów wodnych, parametry operacyjne prowadzonego procesu zostały wyznaczone z wykorzystaniem metodologii powierzchni odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology*, RSM+), projektując przeprowadzane planownia doświadczenia z pomocą metody Box-Behnken. Głównym zamiarem tak dobranej metodologii realizacji prac było wyznaczenie parametrów prowadzących do wytworzenia stożka zimnej plazmy o najwyższej temperaturze i największej długości, zapewniając największą efektywność oddziaływania z traktowanymi roztworami antybiotyków, a także najwyższe stężenie generowanych RFT i RFA o długim czasie życia (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), a także krótkim czasie życia (OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, O). Temperatura stożka plazmy była określana (t<sub>pp</sub> w °C) jako końcowe, stabilne wartości odczytane z termometru pozostającego w kontakcie z stożkiem

plazmy. Długość ( $d_{pp}$  w cm) była wyznaczana jako odległość pomiędzy piórem plazmowym a widocznym końcem stożka zimnej plazmy. Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operowania pióra plazmowego z pomocą projektowania eksperymentu Box-Behnken została przygotowana w oparciu o kolejne zmienne tj. prędkość przepływu helu, w zakresie od 7 do 11 dm<sup>3</sup>/min (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia, w zakresie od 25 do 75 % (parametr B) i wypełnienie w zakresie 25-75 % (parametr C). Tak dobrane parametry zmiennych (A, B, C) pozwoliły na wygenerowanie 15 losowych doświadczeń, podsumowanych w Tabela 9.

**Tabela 9.** Matryca metodologii powierzchni odpowiedzi z projektowaniem doświadczeń metody Box-Behnken przygotowana do wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operacyjnych pióra plazmowego, przeznaczonego do degradacji roztworów antybiotyków. Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C), podczas gdy odpowiedzią układu pióra plazmowego było: temperatura stożka plazmy ( $t_{pp}$ ) i długość stożka plazmy ( $d_{pp}$ ).

Zestawienie poziomów	Kolejność poziomów	A, dm <sup>3</sup> /min	B, %	C, %	$t_{pp}$ , °C	$d_{pp}$ , cm
6	1	11 (+1)	50 (0)	25 (-1)	27.8	1.6
9	2	9 (0)	25 (-1)	25 (-1)	28.6	2.6
14	3 <sup>a</sup>	9 (0)	50 (0)	50 (0)	33.3	2.1
1	4	7 (-1)	25 (-1)	50 (0)	36.3	2.2
7	5	7 (-1)	50 (0)	75 (+1)	39.2	1.8
3	6	7 (-1)	75 (+1)	50 (0)	36.7	2.2
2	7	11 (+1)	25 (-1)	50 (0)	31.2	1.9
10	8	9 (0)	75 (+1)	25 (-1)	30.0	2.2
5	9	7 (-1)	50 (0)	25 (-1)	31.2	2.3
4	10	11 (+1)	75 (+1)	50 (0)	31.6	1.6
8	11	11 (+1)	50 (0)	75 (+1)	33.8	2.0
12	12	9 (0)	75 (+1)	75 (+1)	36.0	1.9
13	13 <sup>a</sup>	9 (0)	50 (0)	50 (0)	33.4	2.0
11	14	9 (0)	25 (-1)	75 (+1)	36.6	2.2
15	15 <sup>a</sup>	9 (0)	50 (0)	50 (0)	33.6	2.0

<sup>a</sup> Punkty centralne.

Każde z przeprowadzonych doświadczeń załączało zmienne parametry operacyjne A, B i C na trzech różnych poziomach tj. najwyższym (+1), najniższym (-1) i centralnym (0). Zawarcie w przeprowadzonych pomiarach trzech punktów centralnych zapewniło ocenę precyzji. Precyzja okazała się być wysoka, wynosząc 0,5 % dla pomiarów  $t_{pp}$  (ze średnią wartością 33,4 °C) i 2,8 % dla  $d_{pp}$  (ze średnią wartością 2,03 cm). Zebrane i przedstawione wyniki uzyskanej matrycy eksperymentu Box-Behnken zostały dopasowane do pełnych funkcji kwadratowych, w tym funkcji liniowej (A, B, C), funkcji kwadratowej ( $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ )

a także interakcji dwukierunkowej (A x B, A x C, B x C). Ogólne równanie dopasowania funkcji modelu dla odpowiedzi parametrów  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$  było następujące:

$$d_0 + a_1A + b_1B + c_1C + a_2A^2 + b_2B^2 + c_2C^2 + a_3A \times B + b_3A \times C + c_3B \times C,$$

gdzie  $d_0$ ,  $a_1$ - $a_3$ ,  $b_1$ - $b_3$  i  $c_1$ - $c_3$  są współczynnikami regresji.

Celem uproszczenia uzyskanego modelu regresji odpowiedzi powierzchni dla wyznaczenia  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ , a także zachowania warunków o statystycznej istotności, zastosowano algorytm wstecznej eliminacji parametrów na poziomie istotności wynoszącym 90 % ( $\alpha$  wynosząca 0,1- do usunięcia). Analiza wariancji ANOVA została następnie przeprowadzona do oceny dopasowania uproszczonego modelu regresji powierzchni odpowiedzi. Kierując się wartościami uzyskanego współczynnika  $R^2$ , a także skorygowanych wartości współczynnika  $R^2$ , oszacowano poziom dopasowania uzyskanych modeli. Oznaczona wartość parametru  $p$  dla rozpatrywanych modeli i warunków w nich zawarta wykazała statystyczną istotność (Tabela 10 i 11). Graficzny test normalności dla składników reszkowych został wykorzystany aby zweryfikować czy czynniki te zachowały rozkład normalny, natomiast wykres punktowy dla standaryzowanych składników reszkowych w zależności od kolejności poziomów umożliwił ocenienie, czy składniki reszkowe są od siebie zależne.

**Tabela 10.** Analiza ANOVA podsumowana w tabeli dla modelu regresji powierzchni odpowiedzi uzyskanej dla temperatury stożka plazmy ( $t_{pp}$ , °C). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C).

Źródło	LSS	Skorygowane SS	Skorygowane MS	F-wartość	$p$ -wartość
Model	7	148.453	21.208	386.4	0.000 < 0.1
Liniiowość	3	143.125	47.815	871.1	0.000 < 0.1
A	1	45.125	45.125	822.1	0.000 < 0.1
B	1	0.320	0.320	5.8	0.046 < 0.1
C	1	98.000	98.000	1785.4	0.000 < 0.1
Kwadrat	2	3.008	1.504	27.4	0.000 < 0.1

A <sup>2</sup>	1	0.445	0.445	8.1	0.025 < 0.1
C <sup>2</sup>	1	2.400	2.400	43.7	0.000 < 0.1
Interakcja 2-kierun.	2	2.000	1.000	18.2	0.002 < 0.1
AC	1	1.000	1.000	18.2	0.004 < 0.1
BC	1	1.000	1.000	18.1	0.004 < 0.1
Błąd	7	0.384	0.055		
Brak dopasowania	5	0.338	0.068	2.9	0.277 > 0.1
Czysty błąd	2	0.047	0.023		
Całkowicie	14	148.837			

Równanie regresji i podsumowanie modelu

$$t_{pp} (^{\circ}\text{C}) = 34,11 - 2,24 \times A + 4.80 \times 10^{-2} \times B + 3.99 \times 10^{-1} \times C + 8.65 \times 10^{-2} \times A^2 - 1.29 \times 10^{-3} \times C^2 - 1.00 \times 10^{-2} \times AC - 8.00 \times 10^{-4} \times BC$$

$$S = 0.23, R^2 = 99.7 \%, R^2\text{-skorygowane} = 99.5.0\%, R^2\text{-przewidywane} = 98.4\%$$

LSS: Liczba stopni swobody, SS: suma kwadratów, MS: średnia kwadratowa, F-wartość: wartości testu Fisher-Snedecor,  $p$ -wartość: wartość prawdopodobieństwa.

**Tabela 11.** Analiza ANOVA podsumowana w tabeli dla modelu regresji powierzchni odpowiedzi uzyskanej dla długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B), wypełnienie (parametr C)

Źródło	LSS	Skorygowane SS	Skorygowane MS	F-wartość	$p$ -wartość
Model	5	79.136	15.827	7.7	0.004 < 0.1
Liniowość	3	45.500	24.500	11.9	0.009 < 0.1
A	1	24.500	24.500	11.9	0.007 < 0.1
B	1	12.500	12.500	6.1	0.036 < 0.1
C	1	8.000	8.000	3.9	0.080 < 0.1
Kwadrat	1	13.886	13.886	6.8	0.029 < 0.1



A <sup>2</sup>	1	13.886	13.886	6.8	0.029 < 0.1
Interakcja 2-kierun.	1	20.250	20.250	9.9	0.012 < 0.1
AC	1	20.250	20.250	9.9	0.012 < 0.1
Błąd	9	18.464	2.052		
Brak dopasowania	7	17.798	2.542	7.6	0.121 > 0.1
Czysty błąd	2	0.667	0.333		
Całkowicie	14	97.600			

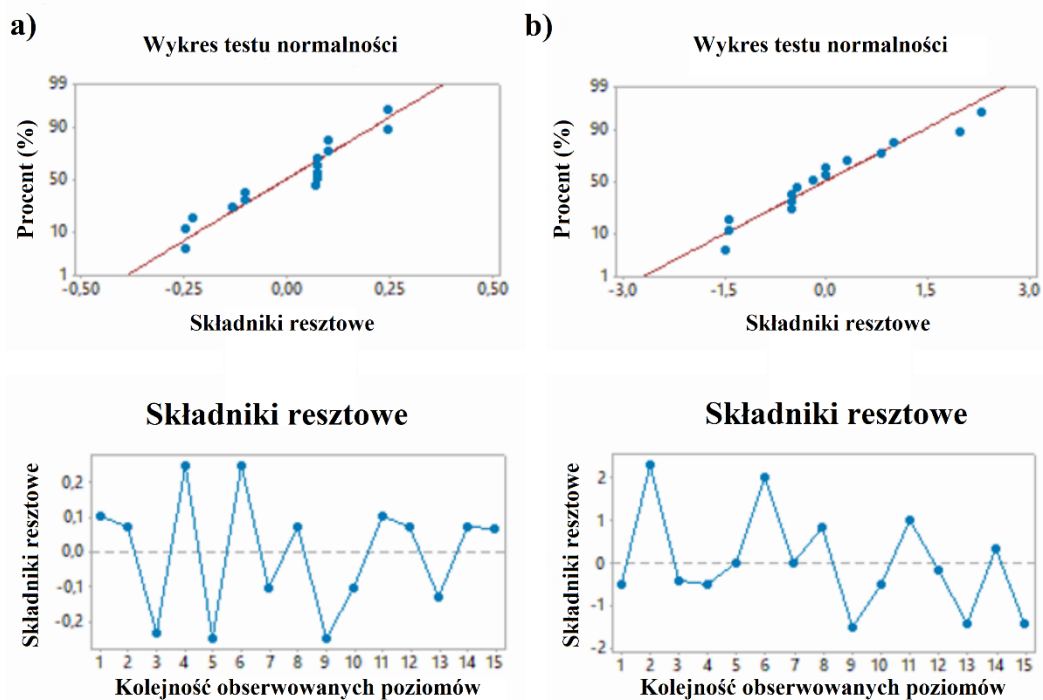
Równanie regresji i podsumowanie modelu

$$d_{pp} \text{ (cm)} = 1.50 + 0,56 \times A - 5,00 \times 10^{-3} \times B - 4,45 \times 10^{-2} \times C + 4,82 \times 10^{-2} \times A^2 + 4,50 \times 10^{-3} \times AC$$

$$S = 0.14, R^2 = 81.1\%, R^2\text{-skorygowane} = 70.6\%, R^2\text{-przewidywane} = 39.5\%$$

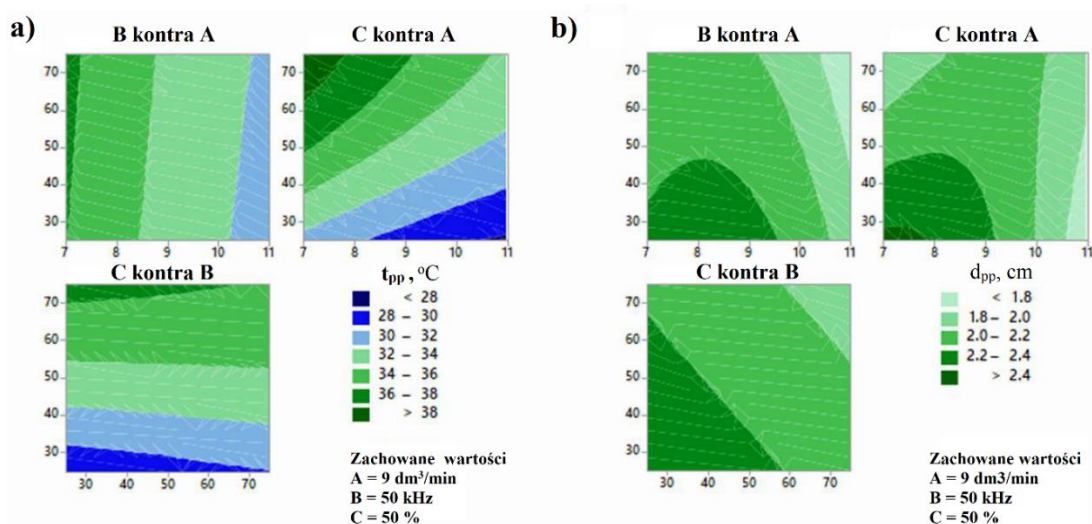
LSS: Liczba stopni swobody, SS: suma kwadratów, MS: średnia kwadratowa, F-wartość: wartości testu Fisher-Snedecor , p-wartość: wartość prawdopodobieństwa.

Zaprezentowana została graficzna analiza składników resztkowych z modelu regresji dla  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ . Rozważając wykres testu normalności, wszystkie punkty układają się wzdłuż linii prostej (Rycina 18, a i b), potwierdzając tym samym ich rozkład normalny. Z krzywej prezentującej wykres punktowy dla standaryzowanych składników resztkowych w zależności od kolejności poziomów, wyniki wykazały położenie losowe po dwóch stronach linii środkowej, wskazując na brak wzajemnych zależności pomiędzy składnikami resztkowymi. Z przedstawionych wyników prowadzonych analiz statystycznych, obydwa modele regresji należy uważać za prawidłowe względem wybranych parametrów operowania pióra plazmowego, przeznaczonego do degradacji antybiotyków z roztworów wodnych.



**Rycina 18.** Wykres testu normalności a także krzywa punktowa dla standaryzowanych składników resztowych w zależności od kolejności obserwowanych poziomów dla pomiarów temperatury stożka plazmy ( $t_{pp}$ , °C, a), oraz długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm, graf b).

Dokonano również graficznej interpretacji wpływu poszczególnych parametrów operacji piórem zimnej plazmy na uzyskiwaną  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ . Największy wpływ na uzyskiwaną odpowiedź układu uzyskano w przypadku doboru parametru A (Rycina 19). Wzrost prędkości przepływu helu doprowadzał do stopniowego spadku temperatury stożka plazmy, wpływając tym samym na zaburzenie stanów wzbudzonych w plazmie, a także dalszy spadek temperatury za sprawą odbieranego ciepła przez molekuly niezjonizowanego helu (Rycina 19, a). W takich warunkach odnotowano wzrost długości  $d_{pp}$  do pewnego poziomu, a następnie gwałtowny jego spadek w wyniku wspomnianego wcześniej efektu ochłodzenia stożka plazmy (Rycina 19, b). Rozpatrując zmienną B, nie stwierdzono istotnego wpływu na temperaturę  $t_{pp}$ , podczas gdy parametr ten wykazał istotne oddziaływanie na długość stożka plazmy, prowadząc do jej zmniejszenia wraz ze wzrostem wartości częstotliwości modulacji napięcia (Rycina 19, a). Wzrost wartości zmiennej C, przekładający się bezpośrednio na moc pola elektrycznego dostarczanego do obszaru wyładowania odpowiadał za niemalże liniowy wzrost temperatury stożka plazmy ( $t_{pp}$ ), świadcząc najprawdopodobniej o energii absorbowanej przez RFT i RFA (Rycina 19, a). Wspomniana prawidłowość nie została potwierdzona w przypadku zmian długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ ), przyczyniając się do jej stopniowego zmniejszenia wraz ze wzrostem wartości wypełnienia (Rycina 19, b).



**Rycina 19.** Wpływ rozpatrywanych zmiennych na temperaturę stożka plazmy w piórze plazmowych ( $t_{pp}$ , °C, a) a także długości stożka plazmy ( $d_{pp}$ , cm). Badane parametry operacyjne: prędkość przepływu helu (parametr A, dm<sup>3</sup>/min), częstotliwość modulacji napięcia (parametr B, kHz), wypełnienie (parametr C, %).

Przeprowadzona wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra plazmowego dla najefektywniejszego rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych, pozwoliła na wytypowanie warunków do generacji zimnej plazmy, które zostały również wykorzystane do obsługi szczotki plazmowej. Szczotka plazmowa, skonstruowana w oparciu o wspomniany model pióra plazmowego, składa się z pięciu elektrod miedzianych (Rycina 17, b, element 5), połączonych we wspólny obwód elektryczny za pomocą obejm z drutu miedzianego (Rycina 17 b, element 9). Elektrody umiejscowione w nasadce z tworzywa sztucznego wykonanej w technologii druku 3D (Rycina 17 b, element 3), wraz z dołączonym zaworem stanowiącym przyłączy gazu wyładowczego He+N<sub>2</sub> (Rycina 17 b, element 2 i 1). Szczotka plazmowa umiejscowiona 1,0 cm ponad powierzchnią przepływającego roztworu antybiotyku w centralnej części komory reakcyjnej (Rycina 17 b, element 7), wspomnianej przy okazji omawianej konstrukcji pióra plazmowego. Obwód elektryczny pomiędzy pięcioma elektrodami miedzianymi i komorą reakcyjną był generowany z wykorzystaniem przenośnego generatora wysokich napięć o możliwości modulacji częstotliwości napięć oraz wypełnienia, wykorzystując parametry operacyjne uzyskane w wyniku przeprowadzonej wieloczynnikowej optymalizacji dla pióra plazmowego. Przepływający roztwór antybiotyku z prędkością 1 cm<sup>3</sup>/min po kontakcie z zimną plazmą, był w ciągły sposób zbierany z odbiornika zamontowanego w komorze reakcyjnej (Rycina 17 a, element 7), umożliwiając tym samym prowadzenie procesu w trybie ciągłego przepływu.

#### 13.4.      **Badania efektywności degradacji antybiotyków – analiza HPLC-DAD**

Stężenia antybiotyków w roztworach wodnych poddanych traktowaniu pióra plazmowego, szczotki plazmowej i roztworów nietraktowanych, zostały poddane analizie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (ang. *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD) a także ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (ang. *Ultra-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*, UPLC-MS). Badania zostały wykonane przez dr hab. Magdę Caban, prof. UG z Uniwersytetu Gdańskiego, Wydziału Chemii, Katedry Analizy Środowiska.

Stanowisko pomiarowe HPLC-DAD wyposażone w układ Nexera XR (Shimadzu, Kioto, Japonia) sprzężone z automatycznym podajnikiem próbek SIL-20AC, pompą LC-20AD, piecem kolumnowym CTO-20AC i detektorem SPD-M20A zostało wykorzystane do określenia stężenia roztworów wodnych OFX, DXC, AMP, ChRP i ich mieszanin o nominalnym stężeniu 10 i 35 mg/dm<sup>3</sup> każdego z wymienionych analitów. Kolumna Gemini-NX (5 μm, C18 110A, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) umiejscowiona w piecu w temperaturze 27 °C. Objętość wstrzykiwanego analitu wynosiła 0,025 cm<sup>3</sup>. Temperatura pieca automatycznego podajnika próbek ustalona została na 10 °C. Komponentem A fazy ruchomej był 10 mmol/dm<sup>3</sup> mrówczanu amonu (pH= 3,18 – 3,2) z 0,1 % zawartością kwasu mrówkowego, podczas gdy komponentem B był acetonitryl. Elucja gradientowa rozpoczęta od 15 % zawartości komponentu B, podczas kolejnych 6 min wzrastała do 35 %, utrzymując się przez kolejne 2 min. Powrót do stanu początkowego następował po 2 min. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosił 1 cm<sup>3</sup>/min. Detektor diodowy (DAD) w trakcie pomiarów był ustawiony na zakres długości fali od 190 do 800 nm, podczas gdy dla kolejnych analitów długość fali wynosiła odpowiednio 77 nm dla ChRP, 294 nm dla OFX, 349 nm dla DXC. Krzywa kalibracji została przygotowana z wykorzystaniem roztworów w zakresie stężeń 0,05 – 50 mg/dm<sup>3</sup>. Dokładność oznaczenia w przedziale oznaczanego przedziału stężeń wyniosła 4,7 % (względne odchylenie standardowe). Precyzja pomiarów oscylowała pomiędzy 92 i 101 %, jedynie w przypadku analizy DXC, limit detekcji był wyższy i wynosił 0,5 mg/dm<sup>3</sup>.

#### 13.5.      **Badania efektywności degradacji antybiotyków – analiza UPLC-MS**

Analiza stężenia AMP została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki UPLC-MS, ze względu na niewielką absorpcję w obszarze promieniowania UV/Vis analizowane

związku AMP. Wykorzystano w tym celu układ pomiarowy UPLC-MC 8050 Shimadzu (Kioto, Japonia), sprzężony z potrójnym kwadrupolowym detektorem o niskiej rozdzielczości mas. Wykorzystano do analizy tą samą fazę ruchomą co w przypadku pomiarów techniki HPLC-DAD, z zastrzeżeniem wykorzystania rozpuszczalników klasy spektrometrii mas. Elucja gradientowa rozpoczęta od 5 % zawartości komponentu B, podczas 4 min wzrastała do 70 % zawartości komponentu B, utrzymującego się przez 1 min. Powrót do stanu początkowego zajmował 1 min. Do pomiarów wykorzystano kolumnę Eurospher II 100-3 C18H (3 $\mu$ m, 50 x 3mm, Knauer). Prędkość przepływu fazy ruchomej ustalono na 0,3 cm<sup>3</sup>/min. Temperaturę pieca kolumnowego ustalono na 35 °C, a objętość wprowadzanego analitu wynosiła 0,005 cm<sup>3</sup>. Parametry operacyjne systemu pomiarowego zostały dobrane następująco: gaz nebulizujący z prędkością przepływu 3 dm<sup>3</sup>/min, przepływ gazu grzewczego 10 dm<sup>3</sup>/min, przepływ gazu osuszającego 10 dm<sup>3</sup>/min, temperatura 300 °C, temperatura desolvacji 526 °C, temperatura linii desolvacji 250 °C, temperatura bloku cieplnego 400 °C, napięcie 4 kV. Analiza jakościowa i ilościowa roztworu AMP była prowadzona w trybie MRM (ang. *Multi Reaction Monitoring*). Czas retencji AMP został ustalony dla tych warunków na 2,34 min. Krzywa kalibracji wykazała przebieg liniowy w zakresie od 0,01 do 1 mg/dm<sup>3</sup>. Dobierając odpowiednie rozcieńczenie analizowanych próbek, uzyskując stężenia poniżej 1 mg/dm<sup>3</sup> przeprowadzono pomiary ilościowe AMP zarówno jako pojedynczego składnika jak i jego zawartości w mieszaninach.

### **13.6. Badania stopnia mineralizacji antybiotyków – analiza TOC/TN**

Analiza stężenia całkowitej zawartości węgla organicznego (TOC) oraz azotu (TN) została przeprowadzona za pomocą analizatora multi N/C 3100 (Analytik Jena, Jena, Niemcy) w próbkach roztworów antybiotyków poddanych działaniu pióra plazmowego i szczotki plazmowej, celem określenia wpływu oddziaływania zimnej plazmy na strukturę chemiczną biologicznie aktywnych molekuł. Pomiary całkowitego stężenia węgla organicznego (metoda pomiaru nieusuwalnego węgla organicznego, ang. *Non Purgeable Organic Carbon*, NPOC) oraz azotu próbek roztworów antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy jak i próbek nietraktowanych zostały przeprowadzone następująco: 10,00 cm<sup>3</sup> analizowanej próbki zostało przeniesione do szklanej fiolki i zakwaszone z wykorzystaniem 2 M roztworu HCl do pH 2, celem usunięcia CO<sub>2</sub>. Pomiary zawartości TOC/TN przeprowadzono w atmosferze tlenu (99,999 % SIAD, Polska) w temperaturze 800 °C wewnątrz pieca rurowego. Uzyskane wyniki zostały automatycznie odniesione do

krzywej kalibracji i zaprezentowane jako wartości średnie wyrażone w mg/dm<sup>3</sup> z trzech oddzielnych pomiarów, wyznaczając odchylenie standardowe w programie multiWIN software (wersja 4,12).

### 13.7. Badanie aktywności biobójczej roztworów antybiotyków potraktowanych zimną plazmą – testy dyfuzyjno-krażkowe

Właściwości antybakteryjne wodnych roztworów antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy zostały określone za pomocą standardowego testu dyfuzyjno-krażkowego z wykorzystaniem gatunków bakteryjnych Gram(+) i Gram(-), a także dwóch ludzkich patogenów oportunistycznych. Wybrane modele bakteryjne wykorzystane do oceny właściwości antybakteryjnych roztworów OFX, DXC, AMP, ChRP i ich mieszanin o stężeniu 10 i 35 mg/dm<sup>3</sup> poddanych traktowaniu piórem plazmowym bądź szczotką plazmową podsumowano w Tabeli 12.

**Tabela 12.** Modele bakteryjne wykorzystane do przeprowadzenia badań nad właściwościami antybakteryjnymi roztworów antybiotyków OFX, DOX, AMP, ChRP i ich mieszanin poddanych traktowaniu pióra plazmowego i szczotki plazmowej.

Gatunek	Szczep nr.	Grupa Gram()	Rok, kraj	Pochodzenie	Charakterystyka	Referencje
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, DSM 1103, CCUG 17620	Gram(-)	1946, USA	Odizolowane od człowieka w warunkach klinicznych	Gatunek wzorcowy; Szczep zalecany do oceny wrażliwości na antybiotyki	Minogue i wsp., 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 23857, 168, BGSC 1A700, NBRC 101244	Gram(+)	1875, brak danych	Napar z siana	Gatunek wzorcowy; Laboratoryjny auksotrof wymagający tryptofanu, pochodzi ze szczepu Marburg poddanego mutagenizacji promieni rentgenowskich; pierwszy zsekwencjonowany genom <i>Firmicute</i>	Kunst i wsp., 1997
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756, DSM 1636, CCUG 46356	Gram(-)	brak danych, USA	Brak danych	Patogen oportunistyczny; Szczep wykorzystywany do testowania związków przeciw drobnoustrojów	Kim i wsp., 1998

<i>Enterobacter</i>	ATCC	Gram(-)	1890,	Płyn	Ludzki pathogen	Ren i wsp.,
<i>cloacae</i>	13047,		brak	rdzeniowy	oportunistyczny,	2010
<i>subsp.</i>	DSM		danych		odpowiedzialny za	
<i>cloacae</i>	30054,				zakażenia szpitalne	
	NBRC					
	13535					

*ATCC: Amerykańska Kolekcja Kultur (USA); BGSC: Centrum Genetycznych Zapasów Bacillus (USA); DSM: Niemiecka kolekcja Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych (Niemcy); CCUG – Kolekcja Kultur Uniwersytetu w Gothenburg (Szwecja); NBRC: NITE Centrum Zasobów Biologicznych (Japonia)*

Badane modele biologiczne były uprzednio przechowywane w temperaturze -80 °C, zawieszone w 40 % roztworze gliceryny stanowiąc kolekcje bakteryjną pochodzącą z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Pojedyncze szczepy bakteryjne zostały powzięte z zamrożonej kolekcji i następnie posiane redukcyjnie na agarze Mullera-Hintona (M-HA, BTL, Łódź, Polska). Po 24 godzinnym okresie inkubacji w temperaturze 37 °C, pojedyncze kolonie bakteryjne zostały przeniesione do 5,0 cm<sup>3</sup> bulionu Mullera-Hintona (M-HA, BTL, Łódź, Polska). Po zakończeniu kolejnej 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C, mieszając zawartość z prędkością 120 obr./min, uzyskane w ten sposób kolonie bakteryjne zostały odwirowane w czasie 10 min przy prędkości 6500 obr./min. Powstały supernatant został odrzucony, a uformowany pelet bakteryjny przemyty dwukrotnie jałową wodą destylowaną, doprowadzając do uzyskania gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej 0,5 w skali McFarlanda (McF), oznaczone za pomocą densytometru DEN-1B (BioSan, Ryga, Łotwa).

Przygotowana w ten sposób zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McF została wykorzystana do przeprowadzenia standardowych testów dyfuzyjno-krażkowych. Jałowy wacik bawełniany zanurzany był w zawieszynie bakteryjnej. Nadmiar zawiesiny z wacika był usuwany, a komórki bakteryjne były następnie trzykrotnie rozprowadzane po całej powierzchni płytki M-HA. Kolejnym etapem, na wierzchu każdej zaszczepionej płytki M-HA zostały umieszczone trzy sterylne białe krążki (średnica 5 mm, Biomaxima, Lublin, Polska). Na przygotowane białe krążki naniesiono 0,01 cm<sup>3</sup> badanych roztworów antybiotyków. Jako kontrolę wykorzystano roztwory antybiotyków nie poddanych działaniu zimnej plazmy. Celem zapewnienia odpowiedniej dyfuzji biologicznie aktywnych składników przez krążki, badane płytki M-HA inkubowano przez godzinę w 4

°C, a następnie inkubowane przez 24 godziny w 37 °C. Po zakończonym okresie inkubacji, zmierzone zostały średnice obszaru zahamowania wzrostu bakteryjnego. Na potrzeby analizy statystycznej, testy zostały przeprowadzone w co najmniej dwóch powtórzeniach, dla dwóch oddzielnych eksperymentów. Zebrane wyniki pomiarowe zostały graficznie zaprezentowane i poddane analizie statystycznej z użyciem oprogramowania R (wersja 3.1.3). Wyznaczone wartości średnie obszaru zahamowania wzrostu bakteryjnego wywołanego roztworami antybiotyków traktowanych zimną plazmą zostały przyrównane do roztworów nietraktowanych przy wartości  $p < 0,05$  z wykorzystaniem testu dwustronnego t (Studenta lub Welcha, zależnie od spełnienia wymagań dla analizy parametrycznej oszacowanej z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka lub Levensa).

Badania zostały wykonane w Wydziale Biotechnologii UG i GUMed, Instytut Biotechnologii UG przez dr Agatę Motykę-Pomagruk.

### **13.8. Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej**

Dla określenia procesów zachodzących w trakcie oddziaływania roztworów antybiotyków z układami generującymi zimną plazmę, wykorzystano metody kolorymetryczne umożliwiające określenie stężenia poszczególnych RFT i RFA. Przeprowadzenie pomiarów ilościowych i jakościowych reaktywnych indywiduów generowanych w wyniku traktowania zimną plazmą są istotne ze względu na ich zaangażowanie w procesy rozkładu antybiotyków a także obserwowane obniżenie właściwości antybakteryjnych. Celem lepszego wglądu w udział poszczególnych RFT w procesy degradacji antybiotyków, przeprowadzono doświadczenia mające na celu zamaskowanie obecności rodników  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  wraz z  $\text{O}_3$ , a także  $\text{O}_2^-$ .

Pierwszymi pomiarami zmian we właściwościach fizykochemicznych roztworów antybiotyków poddanych działaniu pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej zostały określone w oparciu o wartości pH i przewodnictwa elektrycznego. Zmiany pH zostały zbadane z wykorzystaniem podręcznego pH metru HI 98103 (HANNA Instruments, Olsztyn, Polska). Przewodnictwo elektryczne roztworów OFX, DXC, AMP, ChRP i ich mieszanin o stężeniu 10 bądź 35 mg/dm<sup>3</sup> określono z użyciem konduktometru CPC-505 (Elmetron, Zabrze, Polska). Pomiary były przeprowadzane w trzech niezależnych powtórzeniach (n=3). Analizowano objętość 5,0 cm<sup>3</sup> świeżo uzyskanych próbek po traktowaniu zimną plazmą.



Analiza jakościowa i ilościowa jonów  $\text{NO}_2^-$  wytworzonych w wyniku oddziaływania roztworów antybiotyków z piórem plazmowym lub szczotką plazmową została przeprowadzona z pomocą komercyjnie dostępnego spektrofotometru HANNA HI 96708 (HANNA Instruments, Salaj, Rumunia). Oznaczenia prowadzone były zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując odczynniki dedykowane do zestawu kolorymetrycznego ze spektrofotometrem HI 96708. Objętość  $5,00 \text{ cm}^3$  analizowanego roztworu została rozcieńczona wodą dejonizowaną do końcowej objętości  $10,00 \text{ cm}^3$  przed przeprowadzeniem analizy. Stężenie jonów  $\text{NO}_2^-$  było oznaczane z trzech niezależnych pomiarów.

Jakościowe i ilościowe badania zawartości jonów  $\text{NO}_3^-$  przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego spektrofotometru HANNA HI 96728 (HANNA Instruments, Salaj, Rumunia), w sposób identyczny do omówionego przy okazji analiz jonów  $\text{NO}_2^-$ , kierując się zaleceniami dostarczonymi przez producenta. Końcowe wyniki pochodziły z trzech niezależnych oznaczeń.

Stężenie nadtlenu wodoru zostało oznaczone metodą spektrofotometryczną, przeprowadzając reakcję pomiędzy  $\text{H}_2\text{O}_2$  i metawanadanem amonu ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ,  $6,2 \text{ mmol/dm}^3$ ) w obecności kwasu siarkowego VI ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $0,058 \text{ mol/dm}^3$ ), postępując w sposób identyczny z opisanym w podrozdziale **6.8. Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne**. Analiza była przeprowadzona w trzech oddzielnych pomiarach.

Sumaryczne stężenie reaktywnych form tlenu tj.  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{HO}_2$  wytworzonych w wyniku oddziaływania zimnej plazmy z roztworami antybiotyków zostało oznaczone za pomocą metody spektrofotometrycznej z użyciem roztworu jodku potasu ze skrobią. Roztwór zawierający jodek potasu o stężeniu  $0,3 \text{ \% (m/v)}$  i skrobię o stężeniu  $0,5 \text{ \% (m/v)}$  został przygotowany poprzez ogrzanie w temperaturze  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , zachowując mieszanie z prędkością  $1000 \text{ obr./min}$ . Mieszanina była utrzymywana w takich warunkach do uzyskania całkowicie klarownego roztworu. Schłodzona mieszanina reakcyjna, została następnie przeniesiona w objętości  $2,90 \text{ cm}^3$  do  $0,1 \text{ cm}^3$  roztworu analizowanego poddanego działaniu zimnej plazmy, utrzymując ją następnie w temperaturze pokojowej przez  $30 \text{ min}$ , upewniając się tym samym o zakończonym postępie reakcji. Ostatecznie uzyskany barwny roztwór był przenoszony do kuwety kwarcowej, celem określenia wartości absorbancji przy długości fali  $590 \text{ nm}$ . Stężenie sumaryczne RFT, wykazujących potencjał utleniający

przekraczający wartości 0,54 V został wyznaczony w oparciu o przygotowaną krzywą wzorcową, wykorzystując roztwory nadtlenu wodoru (zakres stężeń od 0,75 do 17,00 mg/dm<sup>3</sup>). Jako kontrolę wykorzystano nietraktowane roztwory antybiotyków. Pomiar przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

Zaangażowanie rodników OH<sup>•</sup> w procesach degradacji w pojedynczych roztworów rozpatrywanych antybiotyków zbadano poprzez wprowadzenie roztworu alkoholu etylowego, który maskuje rodniki OH<sup>•</sup> (Tang i wsp., 2018). Aby zapewnić wystarczający poziom zamaskowania rodników OH<sup>•</sup>, alkohol etylowy został wprowadzony przy 1000-krotnym nadmiarze w stosunku do stężenia badanych roztworów antybiotyków (Tang i wsp., 2018). Dla zamaskowania aktywności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>3</sub> w procesach degradacji, do badanych roztworów antybiotyków wprowadzono 10% FBS (Boehm i wsp., 2016). Wprowadzając do roztworów wodnych antybiotyków kurkuminę o końcowym stężeniu 570 μmol dm<sup>-3</sup>, zamaskowana została aktywność O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Kunchady i wsp., 1990). Tak przygotowane roztwory wodne pojedynczych antybiotyków z odpowiednimi związkami maskującymi zostały następnie potraktowane z pomocą szczotki plazmowej operowanej w warunkach optymalnych. Roztwory potraktowane plazmą zostały następnie poddane analizie z użyciem technik badawczych HPLC-DAD i UPLC-MS/MS, celem określenia wydajności rozkładu i porównania ich z wynikami uzyskanymi dla roztworów antybiotyków bez dodania związków maskujących.

### **13.9. Badania przestrzennej dystrybucji reaktywnych form tlenu**

Przeprowadzono również pomiary przestrzennej dystrybucji RFT generowanych przez wytworzoną zimną plazmę. Pióro plazmowe lub szczotka plazmowa zostało wykorzystane do potraktowania powierzchni żelowych modeli zawierających mieszaninę jodku potasu ze skrobią, przygotowanych zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale: **6.8. Badanie reaktywnych form tlenu i azotu w fazie ciekłej - pomiary kolorymetryczne.** Zachowując identyczną odległość, tj. 10 mm pomiędzy piórem plazmowym/szczotką plazmową a powierzchnią modelu żelowego, napromieniowano ją w czasie 5, 15, 30, 60 i 120 s. Po zakończonym traktowaniu zimną plazmą, modele żelowe były fotografowane, a obserwowana powierzchnia przestrzennej dystrybucji była analizowana z użyciem programu graficznego ImageJ (wersja 1.8.0\_172).

Analiza statystyczna wraz z graficznym przedstawieniem opracowywanych wyników wyznaczających zmiany wartości pH, konduktancji, stężenia jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, cząstek

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, całkowitej zawartości RFT i ich przestrzennej dystrybucji zostały przeprowadzone za pomocą programu GraphPad Prism 8.0 (GraphPadsoftware, USA). Porównania uzyskanych wartości średnich grup badawczych z wynikami kontroli przeprowadzono z pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z porównywaniem par badanych grup testem Tukeya post hoc (\* p < 0,03; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0006; \*\*\*\* p < 0,0001). Ponadto porównania pomiędzy parami grup badawczych pióra plazmowego i szczotki plazmowej zostały poddane jednoczynnikowej analizie wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\* p < 0,005; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0006; \*\*\*\* p < 0,0001).

#### **14. Wyniki i dyskusja dla bezpośredniego zastosowania układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków**

##### **14.1. Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra plazmowego**

Stężenia a także rodzaj generowanych reaktywnych indywiduów przez źródło zimnej plazmy związane jest z parametrami operacyjnymi, typem gazu wyładowczego jak i warunkami prądowo-napięciowymi generatora zimnej plazmy. Ustalenie odległości pomiędzy źródłem zimnej plazmy a traktowaną powierzchnią, jak również głębokość uzyskiwanej penetracji stanowią kluczowe parametry przy realizacji doświadczeń (Thirumdas i wsp., 2018; Herianto i wsp., 2021). Mając na uwadze przytoczone zależności, powiązano parametry temperatury stożka zimnej plazmy-  $t_{pp}$  i długości stożka zimnej plazmy-  $d_{pp}$  generowanych wyładowań na efektywność oddziaływania z roztworami rozpatrywanych antybiotyków. Parametr  $t_{pp}$  możemy tym samym powiązać z temperaturą rotacyjną molekuł występujących w fazie gazowej pióra plazmowego a także całkowitą energią układu w szczególności elektronów i reaktywnych form wytworzonych w wyniku inicjacji wyładowań źródła zimnej plazmy. Sugerując się wartościami oznaczonego parametru  $d_{pp}$ , możliwe jest dobieranie odpowiedniej odległości pomiędzy źródłem zimnej plazmy a traktowaną powierzchnią, zwiększając tym samym możliwości penetracji stożka zimnej plazmy a co za tym idzie intensyfikację oddziaływań z traktowanym obiektem. Wzmoczenie zachodzących oddziaływań efektywnie zwiększa stężenia generowanych reaktywnych form o długim czasie życia tj. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a także wzmacnia reakcję kaskadowe z udziałem molekuł takich jak: OH<sup>•</sup>, NO<sup>•</sup>, O, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, ONOO<sup>-</sup> (Gorbanev i wsp., 2018).

Biorąc pod uwagę wspomniane zależności, parametry charakteryzujące stożek zimnej plazmy tj. jej temperaturę  $t_{pp}$ , oraz długość  $d_{pp}$  zostały wybrane jako odpowiedzi układu reakcyjno-wyładowczego w wyniku przeprowadzonej wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operacyjnych z ukierunkowaniem do rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych. Przygotowane modele dla metodologii powierzchni odpowiedzi, zmienne A, B, C zostały dobrane do sporządzenia matrycy eksperymentalnej w ramach testu Box-Behnken, dążąc do uzyskania największych wartości parametrów  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ . Przeprowadzone analizy statystyczne wraz z oceną trafności dopasowanych modeli zostały szerzej przedstawione i opisane w rozdziale **13.3. Wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych pióra plazmowego**. Wyznaczone zostały warunki dla największej efektywności prowadzenia procesu degradacji antybiotyków z przepływających roztworów wodnych, uzyskując największe wartości parametrów  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ , generowane po przez ustalenie prędkości przepływu helu (parametr A)  $7,0 \text{ dm}^3/\text{min}$ , częstotliwość modulacji napięcia  $25 \text{ kHz}$  (parametr B), oraz wypełnienia  $52 \%$  (parametr C). Tak dobrane parametry generacji zimnej plazmy umożliwiły uzyskanie temperatury  $t_{pp}$  wynoszącej  $36,4 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $d_{pp}$  odpowiednio  $2,23 \pm 0,09 \text{ cm}$ . Adekwatność ustalonego modelu została następnie zweryfikowana eksperymentalnie przeprowadzając dodatkowe doświadczenie. Dla optymalnych parametrów tj.  $A = 7,0 \text{ dm}^3/\text{min}$ ,  $B = 25 \text{ kHz}$  i  $C = 52 \%$  temperatura stożka  $t_{pp}$  wyniosła  $36,4 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ , a jej długość  $d_{pp}$   $2,30 \pm 0,05 \text{ cm}$ . Uwzględniając wartości modelowe, błąd względny dla tak uzyskanych wyników wyniósł  $-0,1 \%$  dla  $t_{pp}$  i  $+3,1 \%$  dla  $d_{pp}$ , wskazując dużą precyzję dobranych modeli.

Podczas przeprowadzonych analiz statystycznych określono odmienny wpływ parametru C na uzyskiwane wartości  $t_{pp}$  i  $d_{pp}$ , poddano rozważaniom możliwość uzyskania największej penetracji stożka zimnej plazmy przy ustaleniu najmniejszej wartości  $t_{pp}$ . Dla tak ustalonych warunków operacyjnych, uzyskane najwyższe wartości  $d_{pp}$  mogą przyczynić się do uzyskania największej penetracji traktowanego roztworu. Przeprowadzono tym samym dodatkowe doświadczenie, w ramach którego uzyskany model doprowadzić miał do uzyskania najniższej wartości  $t_{pp}$  przy największej długości stożka  $d_{pp}$ . Modelowane wartości operacyjne tj.  $A = 8,0 \text{ dm}^3/\text{min}$ ,  $B=25 \%$  i  $C =25 \%$ , gdzie odpowiedź układu zapewniła wartości parametrów  $t_{pp}$  wynoszącą  $29,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $d_{pp}$   $2,52 \pm 0,09 \text{ cm}$ . Eksperymentalna walidacja modelu statystycznego poprzez wykorzystanie wspomnianych wartości operacyjnych do generacji zimnej plazmy z pomocą pióra plazmowego, określono wartości  $t_{pp}$  wynoszącą  $29,6 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $d_{pp}$  wynoszącą  $2,48 \pm 0,08 \text{ cm}$ , co odpowiadało

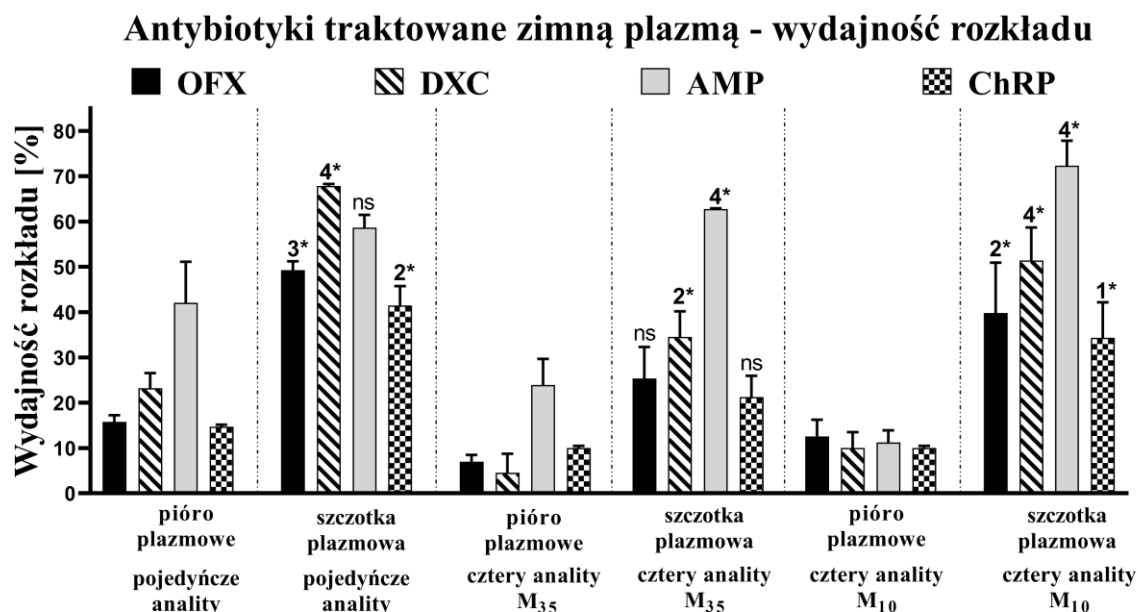
błędowi względnemu +0,3 % i -1,5 % odpowiednio, wskazując na wysoką precyzję obydwu dobranych modeli.

Kolejnym sposobem zwiększenia efektywności wykorzystania układu reakcyjno-wyładowczego do rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych, rozszerzono obszar oddziaływania poprzez zwiększenie ilości wytwarzanych plamek zimnej plazmy, tworząc wysokowydajną szczotkę plazmową z pięcioma elektrodami. Do generacji plazmy z użyciem systemu szczotki plazmowej wykorzystano parametry operacyjne wygenerowane na drodze optymalizacji wieloparametrowej przeprowadzonej dla pióra plazmowego. Tak zaprojektowany układ eksperymentalny o wysokiej innowacyjności powinien wykazać znaczącą efektywność degradacji antybiotyków z roztworów wodnych w porównaniu z układem pióra plazmowego. Sformułowana hipoteza badawcza została zweryfikowana na drodze eksperymentalnej.

#### **14.2. Efektywność degradacji antybiotyków – analiza HPLC-DAD i UPLC-MS**

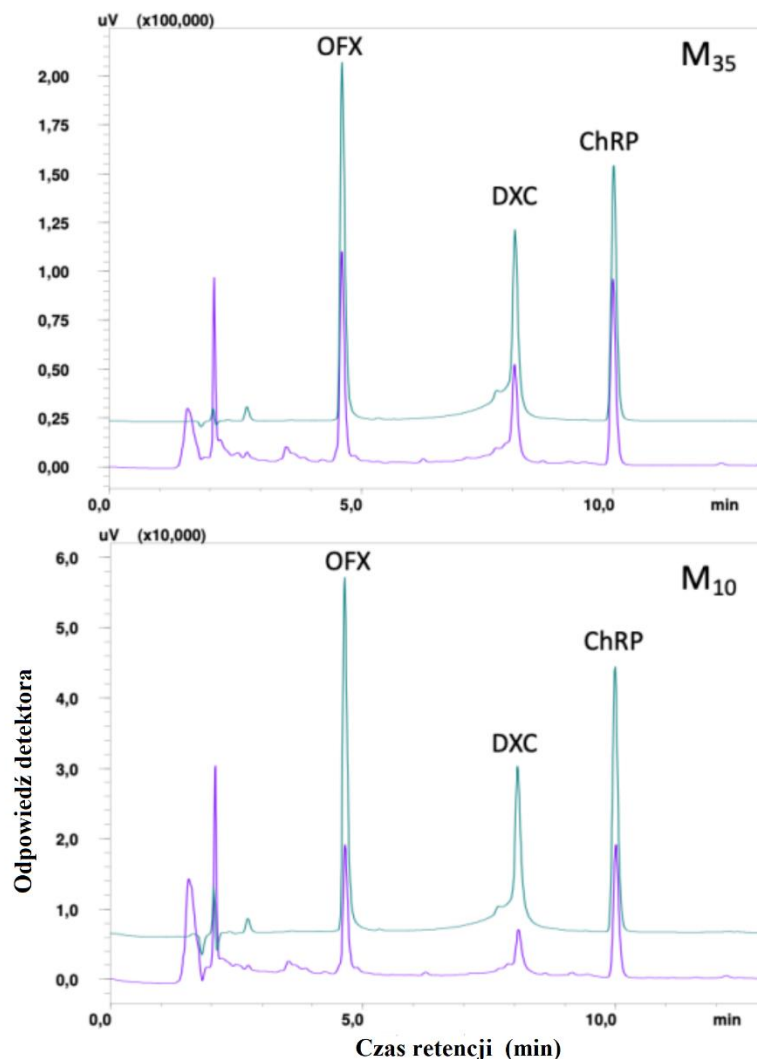
Ocenę wpływu liczby dżetów plazmy generowanych przez źródło na efektywność rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych przeprowadzono z wykorzystaniem techniki HPCL-DAD. Procentowy ubytek analizowanych antybiotyków został wyznaczony poprzez porównanie ich stężeń w roztworach wodnych przed jak i po poddaniu ich działaniu zimnej plazmy (Rycina 20). Efektywność rozkładu antybiotyków z wykorzystaniem pojedynczego pióra plazmowego okazała się znacznie niższa w porównaniu z układem szczotki plazmowej dla wszystkich analizowanych molekuł o aktywności biologicznej. Pióro plazmowe zapewniło zauważalnie mniejszy stopień rozkładu zarówno roztworów wodnych pojedynczego antybiotyku jak i mieszanin czterech antybiotyków o stężeniu 10 lub 35 mg/dm<sup>3</sup>. Przeciętny stopień rozkładu był trzykrotnie większy (najmniej dwukrotnie, a najwięcej pięciokrotnie) przy wykorzystaniu układu szczotki plazmowej w porównaniu z piórem plazmowym. Interesujące różnice w uzyskanych wynikach uzyskano dla roztworów DXC, gdzie efektywność degradacji dla układu szczotki plazmowej była 22-krotnie większa w porównaniu z piórem plazmowym. Układ szczotki plazmowej wykorzystany do usuwania zanieczyszczeń pojedynczego antybiotyku z roztworu wodnego doprowadził do co najmniej 50 % redukcji wyjściowej zawartości antybiotyku. Nie stwierdzono jednakże całkowitej degradacji w żadnym z rozpatrywanych roztworów antybiotyków, zapewniając znaczące jego usunięcie. Pomijając antybiotyk AMP w mieszaninie o stężeniu analitów 35 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>35</sub>) traktowanej szczotką plazmową, efektywność degradacji była w pozostałych

przypadkach większa dla roztworów z pojedynczym antybiotykiem. Zwiększona zawartość antybiotyków w roztworach wodnych stanowi czynnik ograniczający efektywność prowadzonego procesu.



**Rycina 20.** Wydajność rozkładu (%) antybiotyków z roztworów wodnych zawierających pojedynczy analit lub mieszaninę czterech analitów o stężeniu 35 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>35</sub>) lub 10 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>10</sub>) poddanych działaniu pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej. Wykorzystane oznaczenia OFX- ofloksacyna; DXC – doksycyklina; AMP – ampicylina; ChRP – chloroamfenikol. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (1\* < 0,01; 2\* < 0,001; 3\* < 0,0002; 4\* < 0,0001).

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD prezentują chromatogramy (mierzone przy długości fali 254 nm) dla mieszanin roztworów antybiotyków nietraktowanych (krzywa zielona) i traktowanych szczotką plazmową (krzywa fioletowa), zawierających nominalne stężenie każdego z analitów 35 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>35</sub>) i 10 mg/dm<sup>3</sup> (M<sub>10</sub>) (Rycina 21). Pomimo ewentualnej obecności antybiotyku AMP w mieszaninie, sygnały pochodzące od tych molekuł nie zostały zarejestrowane ze względu na niewielką absorbancję w wykorzystanym zakresie długości fal obszaru UV/Vis. Na przedstawionych chromatogramach zaobserwowano znaczącą redukcję intensywności uzyskiwanych sygnałów dla roztworów traktowanych szczotką plazmową. W początkowym przebiegu uzyskanych chromatogramów odnotowano wystąpienie niezidentyfikowanych sygnałów, należących najprawdopodobniej do produktów rozkładu o wysokiej polarności w porównaniu z wyjściowymi antybiotykami. Dane zebrane z analizy chromatografii cieczowej dla pojedynczych roztworów antybiotyków wskazały, że pik uzyskany w 2 min okresu retencji należy do DXC.



**Rycina 21.** Uzyskane chromatogramy ( przy długości fali 254 nm) z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD dla roztworów mieszanin  $M_{35}$  i  $M_{10}$  poddanych traktowaniu szczotką plazmową operowaną w warunkach optymalnych. Zielona krzywa prezentuje sygnały dla roztworów nietraktowanych, fioletowa krzywa odpowiada sygnałom antybiotyków OFX, DXC, ChRP poddanych traktowaniu szczotki plazmowej.

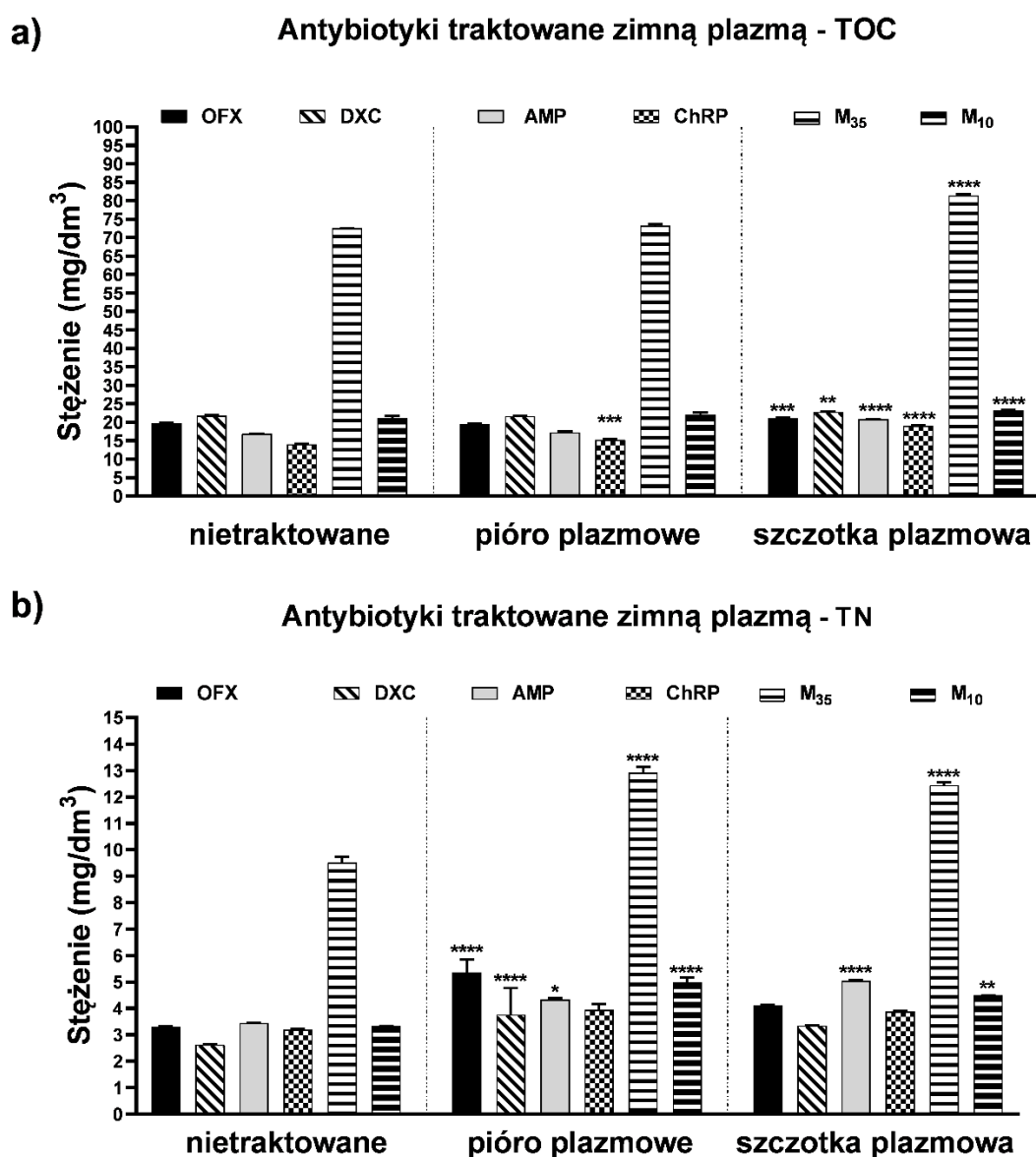
### 14.3. Stopień mineralizacji antybiotyków – analiza TOC/TN

Dla pełniejszego określenia procesów zachodzących wskutek oddziaływania zimnej plazmy z roztworem antybiotyku zostało przeprowadzone badania z użyciem techniki analitycznej umożliwiającej pomiary stężenia całkowitej zawartości węgla organicznego TOC (metoda NPOC)(Rycina 22, a) i całkowitego azotu TN (Rycina 22, b). Zawartość TOC znacząco wzrastała dla wszystkich badanych roztworów antybiotyków poddanych działaniu szczotki plazmowej w porównaniu z roztworami nietraktowanymi. Największą zawartość TOC zarejestrowano w roztworze  $M_{35}$  poddanym działaniu szczotki plazmowej (nietraktowane –  $72,59 \pm 0,08 \text{ mg/dm}^3$ ; szczotka plazmowa –  $81,43 \pm 0,06 \text{ mg/dm}^3$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), co tłumaczyć można największą zawartością bioaktywnych molekuł, jak i

dodatkowym przyrostem TOC wywołanym oddziaływaniem zimnej plazmy z roztworem farmaceutyków. Względnie najniższy przyrost zawartości TOC w roztworach traktowanych szczotką plazmową stwierdzono dla DXC, wynosząc  $22,80 \pm 0,19 \text{ mg/dm}^3$  w porównaniu z roztworem nietraktowanym  $21,73 \pm 0,28 \text{ mg/dm}^3$  (\*\*  $p < 0,001$ ). Dla grup badawczych poddanych działaniu piórem plazmowym, jedynie w przypadku roztworu ChRP wystąpił statystycznie istotny wzrost TOC w porównaniu z roztworem nietraktowanym ( $15,24 \pm 0,21 \text{ mg/dm}^3$  i  $14,08 \pm 0,10 \text{ mg/dm}^3$  odpowiednio) (\*\*\*\* $p < 0,0006$ ). Rozpatrując pozostałe zmiany w stężeniach TOC antybiotyków traktowanych piórem plazmowym, układ ten w nieznacznym stopniu wpływa na zmianę ich struktury chemicznej. Obserwacje te pozostają również w dobrej korelacji z analizą przeprowadzoną z użyciem techniki HPLC-DAD. Odnotowane wyniki mogą być związane ze zjawiskiem odparowania wody wskutek oddziaływania zimnej plazmy z cieczą (Dzimitrowicz i wsp., 2021). Użycie systemu szczotek plazmowych znacząco wpływa na zmianę struktury chemicznej badanych farmaceutyków, co zostało również odnotowane przy okazji zaprezentowanych wyników eksperymentalnych z pomocą techniki HPLC-DAD. Porównywalne wyniki zostały zaprezentowane na łamach pracy Dzimitrowicz (Dzimitrowicz i wsp., 2021). W tym przypadku wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *Atmospheric Pressure Glow Discharges*, APGD) zostały wykorzystane jako źródło zimnej plazmy, stanowiąc wysoko energetyczną alternatywę w porównaniu do prezentowanych tutaj wyładowań barierowych generowanych w szczotce plazmowej lub piórze plazmowym. Zawartość całkowitego azotu (TN) w roztworach antybiotyków poddanych działaniu dwóch układów zimnej plazmy ulegała znaczącym zmianom (Rycina 22, b). Statystycznie istotne wzrosty zawartości TN odnotowano w największej ilości antybiotyków poddanych działaniu pióra plazmowego. Największą zawartość TN ponownie stwierdzono dla mieszaniny antybiotyków M<sub>35</sub>, wraz z największym przyrostem w porównaniu z roztworem nietraktowanym dla pióra plazmowego ( $12,92 \pm 0,21 \text{ mg/dm}^3$  i  $9,52 \pm 0,21 \text{ mg/dm}^3$  odpowiednio)(\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Znaczne zwiększenie stężenia TN potwierdzono również w roztworze OFX traktowanym piórem plazmowym w porównaniu z roztworem nietraktowanym ( $5,36 \pm 0,49 \text{ mg/dm}^3$  kontra  $3,30 \pm 0,02 \text{ mg/dm}^3$ ) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Jedynie w przypadku roztworu ChRP poddanego traktowaniu zarówno piórem plazmowym jak i szczotki plazmowej nie doprowadziło do znaczących przyrostów TN. Zwiększone zawartości TN w roztworach antybiotyków poddanych działaniu zimną plazmą, w szczególności piórem plazmowym mogą być powiązane ze wzmożonym wytworzeniem RFA w efekcie indukowanych reakcji kaskadowych. Biorąc pod uwagę



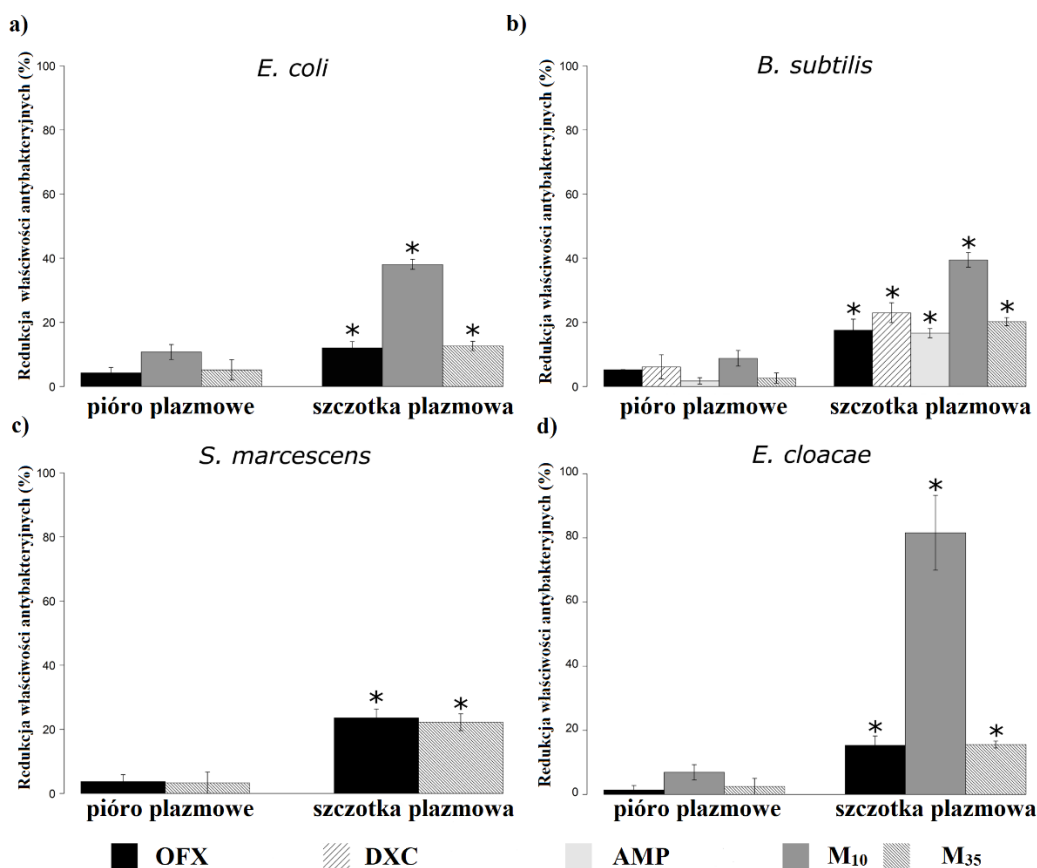
stosunkowo niewielką wydajność rozkładu antybiotyków z użyciem pióra plazmowego, perspektywa wytworzenia zwiększonej ilości RFA, może wskazywać na ich nieznaczny udział w odnotowanych procesach degradacji molekuł bioaktywnych. Celem potwierdzenia wspomnianych obserwacji, szczegółowa analiza zawartości poszczególnych RFA zostanie przeprowadzona i omówiona.



**Rycina 22.** Analiza stężenia TOC (a) i TN (b) w roztworach wodnych antybiotyków poddanych traktowaniu w warunkach optymalnych piórem plazmowym i szczotką plazmową w porównaniu z roztworami nietraktowanymi. Porównanie pomiędzy zmierzonymi wartościami przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z porównywaniem par badanych grup testem Tukeya post hoc (\*  $p < 0,03$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0006$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). OFX – ofloksacyna, DXC -doksycyklina, AMP – ampicylina, ChRP – chloroamfenikol, M<sub>35</sub> – mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 35 mg/dm<sup>3</sup>, M<sub>10</sub>- mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 10 mg/dm<sup>3</sup>.

#### 14.4. Aktywność biobójcza roztworów antybiotyków potraktowanych zimną plazmą – testy dyfuzyjno-krażkowe

Celem oszacowania indukcji właściwości antybakteryjnych roztworów antybiotyków potraktowanych zimną plazmą w odniesieniu do roztworów nietraktowanych, przeprowadzono standardowe testy dyfuzyjno-krażkowe dobierając modele bakteryjne *E. coli* i *B. subtilis* a także dwóch ludzkich patogenów oportunistycznych *S. marcescens* i *E. cloacae* (Tabela 13). W pomiarach uwzględniono wszystkie badane roztwory pojedynczych antybiotyków, a także ich mieszanin M<sub>35</sub> i M<sub>10</sub>, jednak procentową redukcję obserwowanych właściwości antybakteryjnych zaprezentowano z wykorzystaniem roztworów farmaceutyków o stężeniach wykazujących działanie biobójcze (Rycina 23). Roztwory wodne OFX i mieszaniny M<sub>10</sub> potraktowane piórem plazmowym wykazały redukcję obserwowanych właściwości antybakteryjnych wynoszącą 1,39 % i 10,76 % odpowiednio (Rycina 23). Testy dyfuzyjno-krażkowe przygotowane dla modelu *B. subtilis* okazały się nieco bardziej podatne na roztwór DXC traktowany piórem plazmowym w porównaniu z roztworami OFX i AMP, jednakże odnotowany średni współczynnik redukcji był niski i zamykał się na poziomie 1,73 – 6,12 % (Rycina 23, b). Pośród badanych roztworów wodnych antybiotyków, roztwór ChRP nie wykazał żadnych właściwości biobójczych względem badanych modeli bakteryjnych, tym samym wyłączając możliwość określenia wpływu traktowania zimną plazmą. Poruszając przykład mieszanin roztworów tj. M<sub>10</sub> i M<sub>35</sub>, ekspozycja na pióro plazmowe prowadziło do większej dezaktywacji właściwości biobójczych, w przypadku gdy stężenie poszczególnych analitów wynosiło 10 mg/dm<sup>3</sup> w porównaniu ze stężeniem 35 mg/dm<sup>3</sup>.



**Rycina 23.** Procentowa redukcja właściwości antybakteryjnych (%) badanych roztworów wodnych antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy generowanej w warunkach optymalnych z użyciem pióra plazmowego lub szczotki plazmowej względem modeli bakteryjnych: a - *Escherichia coli* ATCC 25922; b - *Bacillus subtilis* ATCC 23857; c - *Serratia marcescens* ATCC 14756; d - *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Zaprezentowane wyniki ujęto jedynie dla roztworów wodnych antybiotyków, które wykazały właściwości biobójcze względem dobranych modeli bakteryjnych. Redukcja właściwości antybakteryjnych została określona poprzez pomiar średnicy obszaru zahamowania wzrostu bakteryjnego uzyskanego w wyniku przeprowadzonych testów dyfuzyjno-krażkowych, odnosząc wyniki do roztworów nietraktowanych. Przedstawiono wyniki jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy. Porównanie średnich wartości redukcji wywołanej przez traktowanie pióra plazmowego lub szczotki plazmowej przeprowadzono z pomocą testu studenta t lub testu t Welcha (przy  $p < 0,05$ ) zależnie od tego, czy wariancje były równe (określone zużyciem testu Levenesa).

Rozpatrując roztwory antybiotyków poddanych traktowaniu szczotką plazmową, obserwowana redukcja właściwości antybakteryjnych zmieniała się od 12,06 % (roztwór OFX względem *E. coli*) do 81,59 % (roztwór M<sub>10</sub> względem *E. cloacae*) (Rycina 23, a i d). Stwierdzono również, że roztwory antybiotyków potraktowanych szczotką plazmową wykazały statystycznie istotnie niższe właściwości biobójcze w porównaniu z roztworami farmaceutyków poddanych traktowaniu piórem plazmowym. Przy pomiarach prowadzonych dla pojedynczych roztworów antybiotyków poddanych napromienianiu szczotką plazmową, roztwór DXC wykazał największą redukcję właściwości antybakteryjnych w porównaniu z roztworami OFX i AMP (23 % kontra 17,54% i 16,64 % odpowiednio) względem bakterii *B. subtilis*, co pozostaje w dobrej zgodności dla wyników

uzyskanych w przypadku roztworów wodnych traktowanych piórem plazmowym. Mieszanki antybiotyków poddanych działaniu szczotki plazmowej podobnie jak to miało miejsce przy piórze plazmowym, największą redukcję właściwości antybakteryjnych uzyskano dla stężenia analitów wynoszącym  $10 \text{ mg/dm}^3$  ( $M_{10}$ ) (w przybliżeniu 20 %) w porównaniu z mieszaniną  $M_{35}$ .

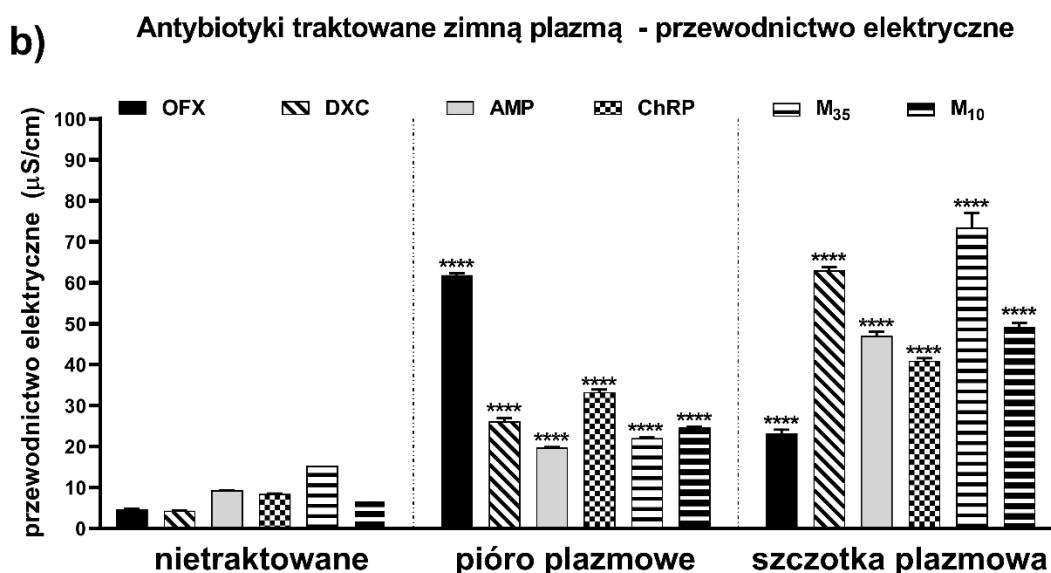
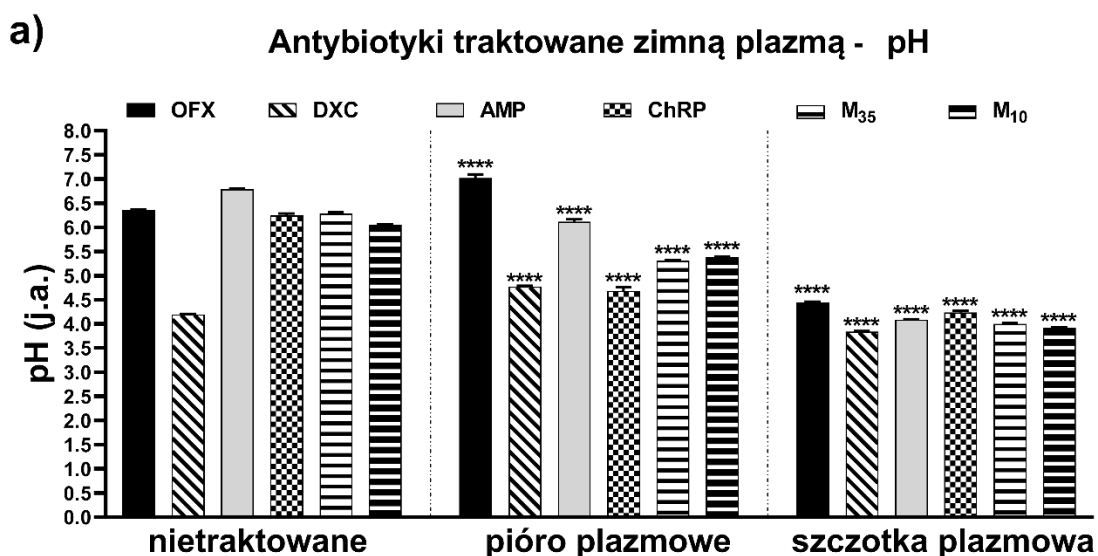
Biorąc pod uwagę przeprowadzone pomiary a także stan wiedzy, trafnym jest stanowisko grup badawczych Sarangapani (Sarangapani i wsp., 2019) i Zhang (Zhang i wsp., 2021) wskazujących na konieczność poparcia wyników degradacji antybiotyków pomiarami odchyleń właściwości biobójczych farmaceutyków poddanych działaniu zimnej plazmy. Podczas prac, wybrano roztwory antybiotyków przynależących do różnych grup, dwóch przedstawicieli fluorochinolonów (ofloksacyny i cyprofloksacyny) i jednego cefalosporyny (cefiksymu) odpowiednio. Z tego też względu niemożliwe było określenie wszystkich zmian we właściwościach antybakteryjnych antybiotyku poddanego działaniu zimną plazmą, który nie wykazał aktywności biobójczych, co pozostaje w dobrej zgodności z wynikami opisanymi przez zespół Sarangapani (Sarangapani i wsp., 2019). Ponadto, odnotowane obniżenie redukcji właściwości antybakteryjnych nie było znaczące, aczkolwiek odnotowano znaczącą poprawę po zwiększeniu ilości stożków generowanej plazmy poprzez wykorzystanie szczotki plazmowej. Prezentowane układy generujące zimną plazmę operowane były w trybie ciągłego przepływu, pozwalając na przepływ wodnego roztworu antybiotyku w objętości  $1 \text{ cm}^3$ , pozostając w kontakcie z stożkiem zimnej plazmy przez okres ok. 5 s. Rozpatrując wydajność procesu rozkładu antybiotyków opisanych w pracach badawczych zespołu Sarangapani (Sarangapani i wsp., 2019) i Zhang (Zhang i wsp., 2021), zaprezentowane zostały wyższe wartości w porównaniu do tych opisanych w przedstawianej rozprawie. Wymagany czas 25 lub 30 min odpowiednio do potraktowania stałej objętości roztworu niesie za sobą duże ograniczenie co do adaptacji tego rozwiązania technologicznego do procesów w większej skali. Zmiana metodologii prowadzonych badań biologicznych w pracy (Sarangapani i wsp., 2019) z testów dyfuzyjno-krażkowych na testy umożliwiające określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) doprowadziła do uzyskania wykluczających się wzajemnie wyników. Roztwór cyprofloksacyny poddany działaniu zimnej plazmy wykazał niższe wartości MIC w porównaniu do roztworów nietraktowanych, w odróżnieniu do roztworów OFX napromieniowanych zimną plazmą, które częściowo utraciły właściwości biobójcze porównując do próbek grupy kontrolnej (Sarangapani i wsp., 2019).

#### 14.5. Reaktywne formy tlenu i azotu w fazie ciekłej

Pierwszym krokiem prowadzącym do ustalenia reakcji zachodzących podczas degradacji antybiotyków z roztworów wodnych w wyniku operowania układów pióra plazmowego i szczotki plazmowej było ustalenie zmian wartości pH i przewodności (Rycina 24 a i b odpowiednio). Wartości pH badanych roztworów ulegały zmianom w sposób zależny od rodzaju antybiotyku poddawanego napromieniowaniu piórem plazmowym. Znaczące wzrosty pH na poziomie statystycznie istotnym zaobserwowano dla roztworów OFX (nietraktowany:  $6,36 \pm 0,01$  i traktowany:  $7,02 \pm 0,08$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) i DXC (nietraktowany:  $4,20 \pm 0,07$  i traktowany  $4,77 \pm 0,02$ ). Dla pomiarów pozostałych roztworów antybiotyków potraktowanych piórem plazmowym, stwierdzone zostały znaczące obniżenia wartości pH w porównaniu do roztworów nietraktowanych tj. AMP ( $6,12 \pm 0,05$  kontra  $6,79 \pm 0,02$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), ChRP ( $4,69 \pm 0,08$  kontra  $6,25 \pm 0,04$ ), natomiast spadek wartości pH dla mieszanin czterech antybiotyków M<sub>10</sub> i M<sub>35</sub> był porównywalnie duży. Eksperymenty przeprowadzone z użyciem systemu szczotek plazmowych przyczyniły się do znacznych spadków wartości pH dla wszystkich rozpatrywanych roztworów antybiotyków na poziomie statystycznie istotnym (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Największe spadki (w porównaniu z roztworami nietraktowanymi) zostały stwierdzone dla OFX ( $4,45 \pm 0,01$  kontra  $6,36 \pm 0,01$ ), AMP ( $4,09 \pm 0,02$  kontra  $6,12 \pm 0,05$ ) i M<sub>10</sub> ( $3,92 \pm 0,02$  kontra  $6,05 \pm 0,01$ ) (Rycina 24, a). Duże spadki pH dla roztworów wodnych AMP, ChRP, M<sub>35</sub> i M<sub>10</sub> poddanych działaniu pióra plazmowego a także we wszystkich badanych roztworach antybiotyków napromieniowanych szczotką plazmową można powiązać z wytworzeniem w wyniku oddziaływania plazmy z cieczą w atmosferze otaczającego powietrza kwasu azotowego (V) i azotowego (III) (Jamroz i wsp., 2014). Ze względu na strukturę chemiczną OFX (należącej do grupy chinolonów i zawierające atomy fluoru F), powstanie HF w roztworach zawierających ten antybiotyk i traktowanych plazmą jest wysoce prawdopodobne (Magureanu i wsp., 2021). Przedstawiciel grupy tetracyklin, DXC zawiera w swojej strukturze chemicznej siarkę, podczas interakcji z zimną plazmą może również generować H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Magureanu i wsp., 2021). Możliwość wytworzenia cząsteczek kwasów w efekcie działania zimnej plazmy mogą przyczyniać się do wysokich spadków wartości pH, co też wydaje się korespondować ze zmianami obserwowanymi w przeprowadzonych doświadczeniach.

Przewodnictwo elektryczne określane również jako konduktancja, określa zdolność materii do przewodzenia prądu elektrycznego. Jony dodatnie i ujemne są odpowiedzialne

za to zjawisko. Porównując różnice w wartościach konduktancji roztworów antybiotyków poddanych działaniu pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej, możliwym jest określenie zmian w całkowitej zawartości jonów na skutek oddziaływania roztworów z zimną plazmą. Dla grup eksperymentalnych traktowania pojedynczych antybiotyków lub ich mieszanin z pomocą pióra plazmowego, znaczący wzrost konduktancji odnotowano dla wszystkich grup badawczych (Rycina 24, b). Porównywalne wyniki uzyskano również dla wszystkich wybranych roztworów antybiotyków poddanych ekspozycji szczotki plazmowej, wskazując znaczący wzrost konduktancji (Rycina 24, b). Roztwór OFX poddany degradacji w układzie pióra plazmowego wykazał znacząco większy przyrost wartości konduktancji w porównaniu z traktowaniem szczotki plazmowej ( $61,87 \pm 0,52 \mu\text{S/cm}$  kontra  $23,23 \pm 0,85 \mu\text{S/cm}$ ). Przytoczone zmiany konduktancji dla roztworu OFX, nie znalazły potwierdzenia w przypadku pozostałych wodnych roztworów farmaceutyków, gdzie wzrosty konduktancji były znacząco większe przy okazji wykorzystania układu szczotki plazmowej (Rycina 24, b).



**Rycina 24.** Pomiary wartości pH (a) i konduktancji (b) zmierzone w roztworach wodnych antybiotyków poddanych degradacji zimną plazmą generowaną w warunkach optymalnych z użyciem pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej. Wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe zostały wyznaczone w oparciu o trzy niezależne pomiary. Analizę statystyczną porównania pomiędzy zmierzonymi wartościami przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z porównywaniem par badanych grup testem Tukeya post hoc (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). OFX – ofloksacyna, DXC -doksycyklina, AMP – ampicylina, ChRP – chloroamfenikol, M<sub>35</sub> – mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 35 mg/dm<sup>3</sup>, M<sub>10</sub>- mieszanina czterech antybiotyków o stężeniu pojedynczego analitu 10 mg/dm<sup>3</sup>.

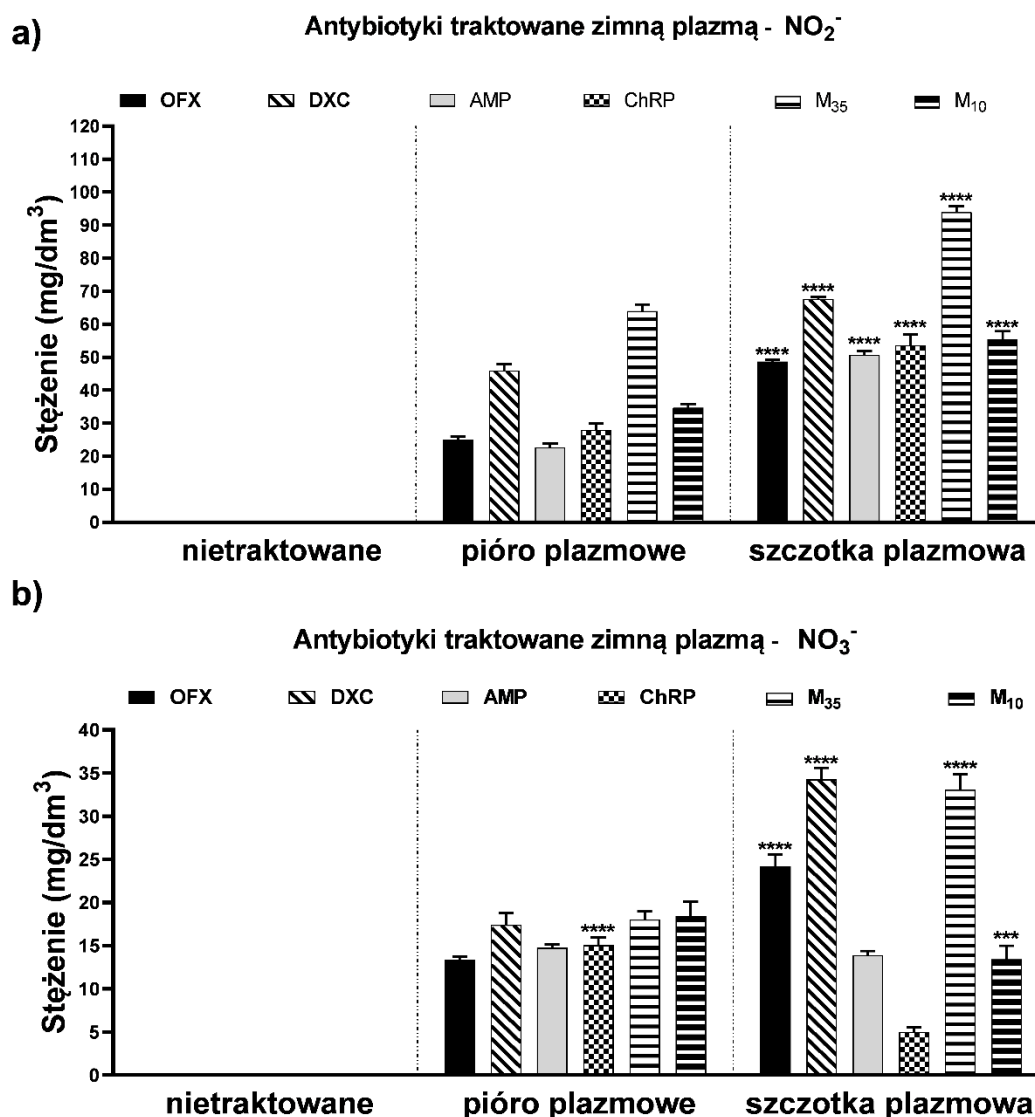
Pomiary kolorymetryczne zostały przeprowadzone w celu określenia stężeń jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> w roztworach poddanych traktowaniu zimną plazmą atmosferyczną. Analiza zawartości jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wykazała znaczące ich stężenia wytworzone w układach poddanych działaniu pióra plazmowego (Rycina 25, a). Największe stężenia jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wytworzone uzyskano w roztworach wodnych DXC (46,00  $\pm$  1,15 mg/dm<sup>3</sup>) i M<sub>35</sub> (64,00  $\pm$  2,00 mg/dm<sup>3</sup>). W pozostałych roztworach rozpatrywanych antybiotyków traktowanych piórem plazmowym,

zmierzone wartości jonów  $\text{NO}_2^-$  osiągały wartości oscylujące w okolicach  $30 \text{ mg/dm}^3$ . Analiza roztworów poddanych działaniu z użyciem szczotki plazmowej wykazała znacząco większe stężenia jonów  $\text{NO}_2^-$  w porównaniu z wynikami prezentowanymi dla pióra plazmowego. Roztwory DXC i mieszaniny antybiotyków  $\text{M}_{35}$  poddane działaniu szczotki plazmowej zawierały najwyższe stężenie jonów  $\text{NO}_2^-$ , wynosząc odpowiednio  $67,67 \pm 1,73 \text{ mg/dm}^3$  i  $94,00 \pm 1,73 \text{ mg/dm}^3$ . W pozostałych roztworach antybiotyków potraktowanych szczotką plazmową, stężenie jonów  $\text{NO}_2^-$  przekraczało  $50 \text{ mg/dm}^3$ . Należy zwrócić uwagę, że oddziaływanie zimnej plazmy z roztworami DXC i mieszaniną  $\text{M}_{35}$  doprowadziło do największego wytworzenia jonów  $\text{NO}_2^-$ . Tak wysokie stężenie jonów  $\text{NO}_2^-$  w roztworze  $\text{M}_{35}$  może być wynikiem obecności zdecydowanie większej zawartości bioaktywnych molekuł a tym samym częstotliwości inicjowanych reakcji kaskadowych. Analizy przeprowadzone dla roztworów DXC, mogły ulec zaburzeniom w trakcie pomiarów kolorymetrycznych, ze względu na żółtawy odcień roztworu post reakcyjnego. Biorąc pod uwagę możliwe zaburzenia prowadzonej analizy stężenia  $\text{NO}_2^-$ , jako odnośnik do pomiarów zastosowano nietraktowane przez plazmę roztwory (Rycina 25, a).

Drugim kluczowym przedstawicielem RFA pozostają jony  $\text{NO}_3^-$ , których stężenie zostało wyznaczone w roztworach wodnych farmaceutyków poddanych działaniu zimnej plazmy. Procesy degradacji zrealizowane z pomocą pióra plazmowego przyczyniły się do wytworzenia znaczących stężeń jonów azotanowych (V) we wszystkich traktowanych próbkach farmaceutyków (Rycina 25, b). Najwyższe stężenie tych reaktywnych form ustalone zostało dla mieszanin  $\text{M}_{35}$  ( $18,02 \pm 1,35 \text{ mg/dm}^3$ ) i  $\text{M}_{10}$  ( $18,46 \pm 1,53 \text{ mg/dm}^3$ ) potraktowanych piórem plazmowym. Dla roztworów zawierających pojedyncze antybiotyki, stężenia jonów  $\text{NO}_3^-$  nie przekraczały  $18,00 \text{ mg/dm}^3$ . Wykorzystanie układu szczotki plazmowej do procesów degradacji, odznaczyło się zdecydowanie większymi zmianami uzyskanych analiz określanego stężenia jonów  $\text{NO}_3^-$ . Zdecydowanie większy wzrost stężenia  $\text{NO}_3^-$  dla roztworów traktowanych szczotką plazmową stwierdzono dla OFX ( $24,22 \pm 1,35 \text{ mg/dm}^3$ ), DXC ( $34,26 \pm 1,35 \text{ mg/dm}^3$ ) i  $\text{M}_{35}$  ( $33,08 \pm 2,23 \text{ mg/dm}^3$ ). Porównując wyniki analiz uzyskanych dla stężenia jonów azotanowych w roztworach antybiotyków degradowanych z pomocą pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej, wykorzystanie pióra plazmowego zapewniło większą ich generację w przypadku ChRP ( $15,06 \pm 0,89$  kontra  $5,02 \pm 0,51 \text{ mg/dm}^3$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) i  $\text{M}_{10}$  ( $18,46 \pm 1,53$  kontra  $13,44 \pm 1,35 \text{ mg/dm}^3$ , \*\*\*  $p < 0,0006$ ). Wykorzystanie układu szczotki plazmowej do degradacji roztworów farmaceutyków przyczyniło się do wzrostu stężenia jonów  $\text{NO}_3^-$  (w roztworach



post plazmowych) w porównaniu dla pióra plazmowego w przypadku: OFX ( $24,22 \pm 1,35$  mg/dm<sup>3</sup> kontra  $13,36 \pm 0,34$  mg/dm<sup>3</sup>, \*\*\*\* p < 0,0001), DXC ( $34,26 \pm 1,35$  mg/dm<sup>3</sup> kontra  $17,42 \pm 1,35$  mg/dm<sup>3</sup>, \*\*\*\* p < 0,0001), a także M<sub>35</sub> ( $34,85 \pm 2,23$  mg/dm<sup>3</sup> kontra  $19,79 \pm 1,35$  mg/dm<sup>3</sup>, \*\*\*\* p < 0,0001).



**Rycina 25.** Analiza stężeń jonów NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (a) i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (b) w roztworach wodnych antybiotyków traktowanych zimną plazmą operowaną w warunkach optymalnych z wykorzystaniem układów pióra plazmowego lub szczotki plazmowej. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\* p < 0,005; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0006; \*\*\*\* p < 0,0001).

#### 14.6. Przestrzenna dystrybucja reaktywnych form tlenu wraz z ich oznaczeniem

Jeden z głównych przedstawicieli RFT o długim czasie życia oraz o stosunkowo wysokim potencjale redoks – nadtlenek wodoru został oznaczony celem poznania

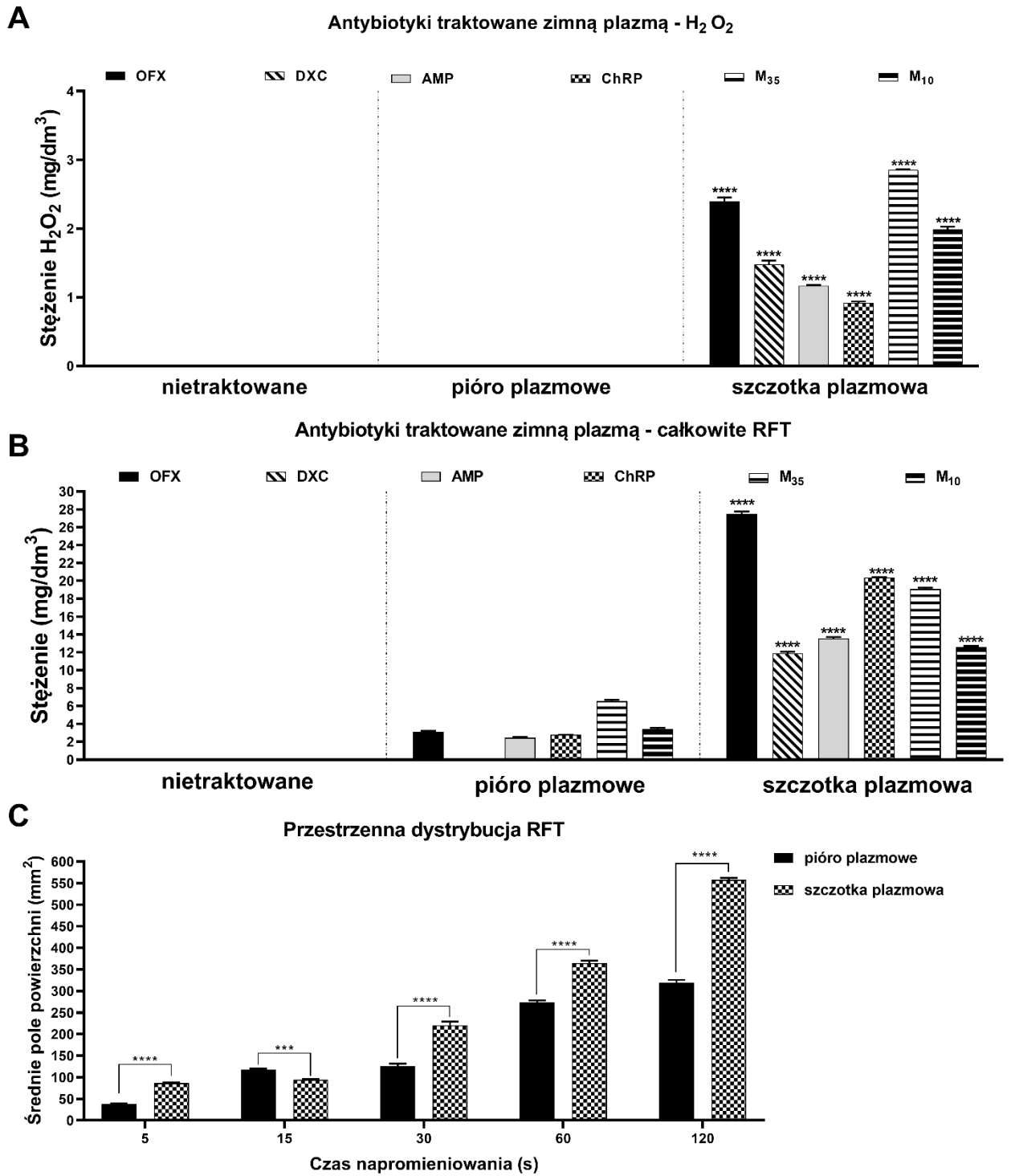
złożoności oddziaływania zimnej plazmy z komponentami roztworów wodnych. Przeprowadzona została analiza stężenia  $H_2O_2$  w roztworach antybiotyków traktowanych piórem plazmowym lub szczotką plazmową (Rycina 26, a). W roztworach wodnych antybiotyków traktowanych piórem plazmowym nie oznaczono stężenia  $H_2O_2$  ze względu na jego stosunkowo małe stężenie. Z kolei we wszystkich roztworach antybiotyków traktowanych za pomocą szczotki plazmowej wyznaczono stężenie  $H_2O_2$ . Najwyższe stężenie nadtlenu wodoru wyznaczono dla roztworu  $M_{35}$  ( $2,85 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$ ), a następnie OFX ( $2,39 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$ ) i dalej roztworu  $M_{10}$  ( $1,99 \pm 0,06 \text{ mg/dm}^3$ ) (Rycina 26, a). Rozpatrując kluczową rolę pozostałych przedstawicieli RFT takich jak  $OH^\bullet$ ,  $O$ ,  $O_3$  i  $HO_2$  w procesach degradacji farmaceutyków, ich ilościowe oznaczenie wydaje się być kluczowym etapem dla określenia reakcji zachodzących pomiędzy zimną plazmą i molekułami roztworów wodnych. Z tego też względu przeprowadzono badania w których oznaczono całkowite stężenia RFT, których potencjał utleniający był większy niż wartość 0,54 V. W przypadku pióra plazmowego najwyższe sumaryczne stężenie RFT było obserwowane w roztworze  $M_{35}$  ( $6,53 \pm 0,18 \text{ mg/dm}^3$ ), podczas gdy dla reszty roztworów oznaczone stężenia nie przekraczały wartości  $3 \text{ mg/dm}^3$ . Dodatkowo, nie stwierdzono wytworzenie RFT w roztworze DXC poddanym działaniu pióra plazmowego. W przypadku roztworów antybiotyków poddanych działaniu szczotki plazmowej, najwyższe sumaryczne stężenie RFT zostało oznaczone dla OFX ( $27,48 \pm 0,27 \text{ mg/dm}^3$ ), ChRP ( $20,37 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$ ) i  $M_{35}$  ( $19,06 \pm 0,18 \text{ mg/dm}^3$ ). Warto nadmienić, że znacznie większe sumaryczne stężenia RFT obserwowano w roztworach antybiotyków traktowanych za pomocą szczotek plazmowych w porównaniu do analogicznych procesów przeprowadzonych z udziałem pióra plazmowego (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) w każdym z rozpatrzonych roztworów farmaceutyków (Rycina 26, b). Uzupełnieniem badań nad mechanizmami zachodzących interakcji pomiędzy zimną plazmą i cieczą, przeprowadzono wizualizację przestrzennej dystrybucji RFT, w wyniku oddziaływania pióra plazmowego bądź szczotki plazmowej z powierzchnią modeli żelowych zawierających kompleks jodku potasu ze skrobią. Tak przeprowadzone doświadczenie umożliwia określenie różnic w powierzchni zajmowanej przez wytworzone RFT na przestrzeni kolejnych odcinków czasowych prowadzonego traktowania. Podczas prowadzonego procesu degradacji antybiotyków z roztworów wodnych, pióro plazmowe bądź szczotka plazmowa operowane były w trybie ciągłego przepływu roztworu farmaceutyków, a czas ekspozycji na źródło był ustalany na ok. 5 s. Podejmując próby lepszego zrozumienia mechanizmu oddziaływania z zimną plazmą w procesie degradacji farmaceutyków, wydłużony został czas kontaktu zimnej plazmy z napromieniowaną

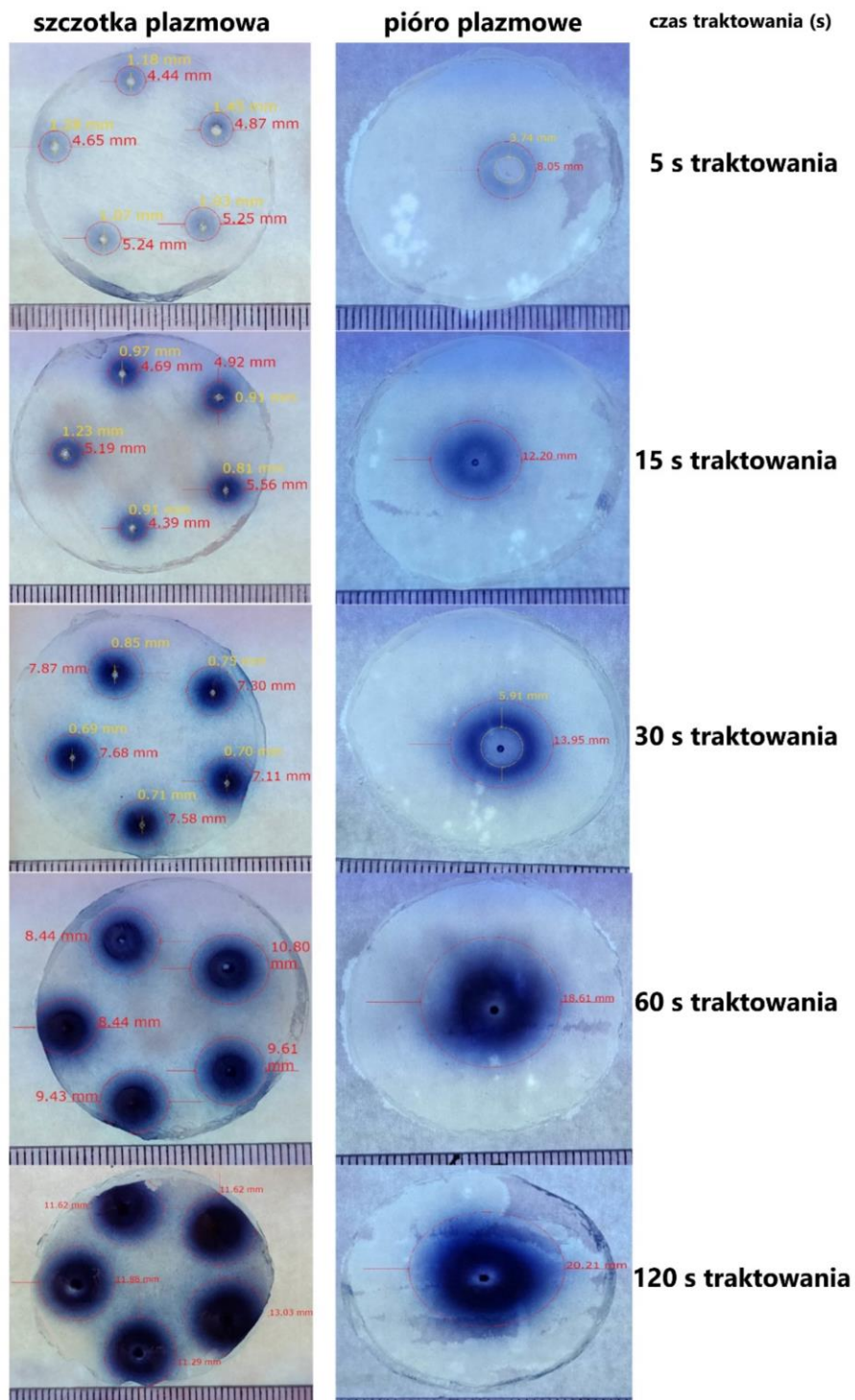
powierzchnią do 15, 30, 60 i 120 s. (Rycina 26, c). Zaobserwowano, że traktowana powierzchnia ulegała niebiesko-fioletowemu zabarwieniu, a obszar tej koloryzacji wzrastał wraz z wydłużeniem czasu napromieniowania. Podczas pierwszych 30 s doświadczenia, wystąpił obszar nienaruszony reakcją w kształcie okręgu, znajdujący się w centralnym punkcie traktowania. Nieprzereagowany fragment powstały w wyniku operowania stożka zimnej plazmy został zbadany i opisany przez zespół badawczy Liu (Liu i wsp., 2018). W trakcie 15 s początkowego okresu napromieniowania, większy obszar niebiesko-fioletowego zabarwienia został wyznaczony dla układu pióra plazmowego w porównaniu ze szczotką plazmową ( $117,01 \pm 3,19$  kontra  $94,35 \pm 1,34$  mm<sup>2</sup>, \*\*\* p < 0,001). Przyglądając się pozostałym okresom napromieniowania źródłem zimnej plazmy, zabarwione obszary modeli żelowych znacząco były większe dla eksperymentów z użyciem szczotki plazmowej w porównaniu z piórem plazmowym, a największy obszar zabarwienia został stwierdzony po 120 s traktowania ( $557,557 \pm 4,91$  mm<sup>2</sup>). Tak przedstawiające się wyniki analiz potwierdzają słuszność doboru układu szczotki plazmowej do procesów degradacji antybiotyków, zapewniając zwiększony obszar oddziaływania na granicy zimnej plazmy i powierzchni traktowanej cieczy, zapewniając tym samym większą efektywność wytwarzania RFT.

Prowadząc dalsze rozważania nad udziałem poszczególnych przedstawicieli RFT w procesach degradacji, zrealizowane zostały eksperymenty angażujące związki maskujące. Celem określenia zaangażowania rodników OH• w procesach degradacji badanych roztworów antybiotyków, wprowadzenie alkoholu etylowego doprowadziło do ponad 90% obniżenia wydajności degradacji ofloksacyny ( $2,75 \pm 0,11\%$  kontra  $49,23 \pm 0,03\%$  wydajności rozkładu dla roztworów bez związku maskującego i z dodatkiem związku maskującego odpowiednio) i chloroamfenikolu ( $2,27 \pm 0,07\%$  kontra  $41,50 \pm 7,38\%$ ) poddanych działaniu szczotki plazmowej. W przypadku roztworu doksycykliny, dodatek etanolu niemalże trzykrotnie zmniejszył wydajność rozkładu ( $28,04 \pm 0,34\%$  kontra  $67,83 \pm 0,01\%$ ), podczas gdy dla roztworu ampicyliny degradacja nie nastąpiła ( $59,17 \pm 0,53\%$  kontra  $58,63 \pm 0,05\%$ ). Wykorzystanie FBS jako związku maskującego dla aktywności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>3</sub>, najwyższa redukcja wydajności rozkładu została stwierdzona dla chloroamfenikolu, nie stwierdzając jego rozkładu. W przypadku roztworu doksycykliny, dodatek FBS zapewnił niemalże trzykrotnie niższą wydajność rozkładu ( $23,43 \pm 0,12\%$  kontra  $67,83 \pm 0,01\%$ ). Zamaskowanie aktywności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>3</sub> przyczyniło się do dwukrotnie mniejszej wydajności rozkładu antybiotyków ofloksacyny ( $25,54 \pm 0,66\%$  kontra  $49,23 \pm$

0,03%) a także ampicyliny ( $20,12 \pm 3,94\%$  kontra  $58,63 \pm 0,05\%$ ). Ostatecznie, analizując wpływ dodatku kurkuminy jako związku maskującego aktywność  $O_2^-$ , najwyższe obniżenie wydajności rozkładu wyznaczone zostało dla chloroamfenikolu (niemalże 80% obniżenie,  $9,16 \pm 0,12\%$  kontra  $41,50 \pm 7,38\%$ ). W przypadku roztworów wodnych ofloksacyny ( $40,80 \pm 0,14\%$  kontra  $49,23 \pm 0,03\%$ ) i doksycykliny ( $49,38 \pm 0,24\%$  kontra  $67,83 \pm 0,01\%$ ), zamaskowanie aktywności  $O_2^-$  wiązało się z obniżeniem o odpowiednio 15% i 25% wydajności rozkładu. Warto nadmienić, że w przypadku roztworu wodnego ampicyliny poddanego działaniu szczotki plazmowej, wydajność rozkładu zmieniała się nieznacznie w efekcie wprowadzania związków maskujących. Wyjątek stanowiło wprowadzenie związku maskującego – FBS, doprowadzając do niemalże 65% obniżenia wydajności rozkładu antybiotyku ( $20,12 \pm 3,94\%$  kontra  $58,63 \pm 0,05\%$ ).

Przeprowadzone doświadczenia z użyciem związków maskujących dostarczyły dodatkowych informacji co do reaktywnych form mogących uczestniczyć w procesach rozkładu antybiotyków traktowanych systemami zimnej plazmy. Pomiar kolorymetryczny zapewniły określenie stężenia  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  i  $H_2O_2$  oraz całkowitej zawartość RFT w roztworach wodnych antybiotyków potraktowanych piórem plazmowym i szczotką plazmową. W większości przedstawionych i omówionych przypadków, szczotka plazmowa umożliwiła wygenerowanie znacząco wyższe stężenia wyznaczonych RFT i RFA, wskazując na ich wspólny udział w uzyskanej wydajności rozkładu. Jednakże, dodatkowo przeprowadzone doświadczenia z użyciem związków maskujących wykazały, że  $OH^\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_3$ , i  $O_2^-$  mogą odgrywać istotną rolę w procesach degradacji antybiotyków.





**Rycina 26.** Analiza stężeń nadtlenu wodoru (a) oraz całkowitej zawartości RFT (b) w roztworach antybiotyków poddanych działaniu zimnej plazmy operowanej w warunkach optymalnych z użyciem układu pióra plazmowego lub szczotki plazmowej. Wartości średnie z przeprowadzonych analiz zostały porównane między sobą parami z pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ). Wizualizacja przestrzennej dystrybucji RFT (c) generowanych w wyniku kontaktu źródła zimnej plazmy z powierzchnią modeli żelowych zawierających jodek potasu i skrobię. Czas traktowania modeli żelowych został ustalony na 5, 15, 30, 60 i 120 s. Porównania wartości średnich obszarów zabarwionych na kolor niebiesko-fioletowy wytworzonych z pomocą pióra plazmowego i szczotki plazmowej zostały podsumowane wykresem słupkowym i poddane analizie statystycznej poprzez porównanie wartości średnich sparowanych grup pomiędzy dwoma rozpatrywanymi układami, wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, wielokrotnym porównywaniem grup testem Sidaka (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

W przedstawionych badaniach eksperymentalnych, dwa układy zimnej plazmy, które pracowały w trybie ciągłego przepływu tj. pióro plazmowe i szczotka plazmowa zostały zastosowane do procesu degradacji czterech antybiotyków (ofloksacyny, doksycykliny, ampicyliny i chloroamfenikolu), należących do czterech klas chemicznych, przygotowując pojedyncze roztwory wodne o stężeniu  $35 \text{ mg/dm}^3$  lub mieszaniny tych czterech farmaceutyków o stężeniu każdego z analitów wynoszącym 10 lub  $35 \text{ mg/dm}^3$ . Zimna plazma była generowana w mieszaninie helu z azotem. Istotność dobrania odpowiedniego gazu wyładowczego związana była z możliwością generowania odpowiednich stężeń RFT i RFA w układach z zimną plazmą (Magureanu i wsp., 2021). Hipoteza zakładała, że dodatek azotu do helowej zimnej plazmy przyczyni się do wzrostu produkcji  $\text{HNO}_3$  i  $\text{HNO}_2$ , a tym samym do znacznego obniżenia pH roztworu. Generalnie dla niskich wartości pH obserwowano wzrost produkcji rodników  $\text{OH}^\bullet$ . Wykorzystanie układu szczotek plazmowych do procesów degradacji doprowadziło do wytworzenia mierzalnego stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Potwierdzone stężenia wytworzonych  $\text{H}_2\text{O}_2$  i RFT powiązane są ze zmierzoną wydajnością prowadzonego procesu degradacji, wskazując na znacznie większą efektywność i wszechstronność w porównaniu do układu pióra plazmowego. Względy te, przekładać się mogą do prostszego wykorzystania podobnych układów w sektorze przemysłowym, w szczególności procesów oczyszczania ścieków z zanieczyszczeń farmaceutykami. Przyszłe prace realizowane w tym kierunku, powinny skupiać się wokół zwiększenia efektywności procesu rozkładu. Ponadto niezbędne wydaje się zaangażowanie dodatkowych prac, mających na celu ograniczenie spadków wartości pH roztworów po traktowaniu zimną plazmą, mogących zaszkodzić środowisku naturalnemu i organizmom wodnym. Również kluczowym wydaje się przeprowadzenie prac skupiających się nad podjęciem procesów degradacji antybiotyków z roztworów wody kranowej lub ścieków, a także neutralizacji negatywnych spadków pH.

## 15. Podsumowanie i wnioski po realizacji zadania III

Na potrzeby prowadzonych prac, zostały zaprojektowane i stworzone autorskie układy reakcyjno-wyładowcze z przeznaczeniem do prowadzenia procesów degradacji antybiotyków z roztworów wodnych. Aby zaproponować najlepsze warunki degradacji antybiotyków, przeprowadzona została wieloczynnikowa optymalizacja parametrów operacyjnych zimnych plazm wraz z metodologią projektowania eksperymentów Box-Behnken.

- I. Uzyskane z modeli statystycznych parametry operacyjne, zapewniły dobranie warunków do wytworzenia stożka plazmy o najwyższej temperaturze i możliwie największej długości.
- II. Wyładowania barierowe generowane z pomocą systemów pióra plazmowego lub szczotki plazmowej zostały następnie wykorzystane do przeprowadzenia czterech wybranych antybiotyków o stężeniu  $35 \text{ mg/dm}^3$  bądź mieszanin tych antybiotyków o stężeniu każdego z analitów wynoszącego  $10$  lub  $35 \text{ mg/dm}^3$ .
- III. Potwierdzony został korzystny wpływ zwiększenia ilości generowanych stożków plazmy w układzie szczotki plazmowej na uzyskanie większej efektywności degradacji farmaceutyków.
- IV. Skonstruowany układ szczotki plazmowej wytwarzający pięć stożków plazmy, charakteryzował się zwiększoną ilością generowanych RFT i RFA w wyniku oddziaływania z wodnymi roztworami antybiotyków.
- V. Zaobserwowano znaczące obniżenie wartości pH roztworów poddanych oddziaływaniom ze szczotką plazmową, podczas gdy stężenia całkowitej zawartości RFT wraz z  $\text{H}_2\text{O}_2$  ulegały znacznemu wzrostowi.
- VI. W przypadku szczotki plazmowej obserwowano zauważalne obniżenie właściwości biobójczych roztworów post plazmowych, co zostało potwierdzone za pomocą przeprowadzonych testów dyfuzyjno-krażkowych z uwzględnieniem obydwu szczepów bakteryjnych i ludzkich patogenów.
- VII. Układ szczotki plazmowej przyczynił się do znaczącego obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów farmaceutyków.
- VIII. Obniżenie aktywności biologicznej wodnych roztworów farmaceutyków na skutek działania zimnej plazmy wytworzonej w szczotce plazmowej, może przyczynić się do obniżenia wielolekowej oporności patogenów bakteryjnych



Innowacyjność a także skuteczność zaproponowanej konstrukcji szczotki plazmowej została doceniona przyznaniem polskiego zgłoszenia patentowego pt. *„Sposób rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych z zastosowaniem zimnej plazmy atmosferycznej, generowanej w przepływowej szczotce plazmowej oraz szczotka plazmowa do realizacji tego sposobu”* Zgłoszenie oznaczono numerem: P.441085. Prezentowane rozwiązania technologiczne, dotyczące konstrukcji i wykorzystania przepływowych szczotek plazmowych zostały objęte ochroną na mocy międzynarodowego zgłoszenia w trybie PCT pt. *„Method of degrading antibiotics from aqueous solutions by using cold atmospheric pressure plasma generated in a flowing plasma brush and a plasma brush intended for this method.”* PCT/PL2022/050027.

Przedstawione badania są też podstawą przygotowanej publikacji Terefinko Dominik, Caban M., Motyka-Pomagruk A., Babinska W., Pohl P., Jamroz P., Cyganowski P., Sledz W., Lojkowska E., Stepnowski P., Dzimitrowicz A. pt. *„Removal of clinically significant antibiotics from aqueous solutions by applying unique high-throughput continuous-flow plasma pencil and plasma brush systems”*.

## **16. Perspektywy stworzenia klinicznej terapii opartej o zimne plazmy atmosferyczne względem nowotworu.**

Stworzenie produktu klinicznego do zastosowań przeciwnowotworowych związane jest z kilkoma etapami badań, które należy zrealizować. Badania na modelach *in vitro* i *in vivo*, które zostały powyżej opisane, są przypisywane do fazy przedklinicznej. Na tym etapie prowadzonych badań, kluczowy etap stanowi zaproponowanie sposobu traktowania, którego wszystkie zaangażowane i inicjowane procesy generowania zimnej plazmy i oddziaływania na komórki zostały dogłębnie zrozumiane i poznane. Selektywne wytwarzanie głównych RFT i RFA jest kluczowym etapem do podjęcia badań klinicznych. Z tych właśnie względów, różne warunki inicjacji i powstawania zimnej plazmy mogą doprowadzić do zmian w stężeniach generowanych reaktywnych form. Rodzaj wykorzystywanego gazu plazmo- twórczego lub ich mieszanin, ich prędkość przepływu, a także wybór sposobu generowania wyładowań, mogą wpływać na wytworzone reaktywne formy w fazie gazowej. Właściwe dobieranie warunków wytwarzania reaktywnych form tlenu i azotu, poprzez dobór parametrów prądowo-napięciowych, gazu wyładowczego ma kluczowe znaczenie. Należy także uwzględnić fakt, że poszczególne rodzaje nowotworowych linii komórkowych oddziałują w różny sposób względem wybranych reaktywnych form (Lietz i wps., 2018).

Ze względów na perspektywy klinicznego wykorzystania zimnych plazm, należy szczegółowo określić, które nowotworowe linie komórkowe są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny lub na wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT i RFA. Otaczające środowisko podczas oddziaływania z zimną plazmą jest kolejnym czynnikiem, który znacząco wpływa na kompozycję generowanej zimnej plazmy. Oddziaływanie pomiędzy elektronami generowanymi przez źródło zimnych plazm ze składnikami komórkowymi zazwyczaj przyczynia się do różnych procesów: uszkodzenia błony komórkowej, wytwarzania wewnątrzkomórkowych RFT i RFA, a także aktywacji ścieżek sygnałowych. Aby uzyskać selektywny efekt przeciwnowotworowy wobec komórek raka piersi bądź czerniaka poddanych działaniu zimnej plazmy, należy precyzyjnie dobierać sposób generowania plazmy. W warunkach klinicznych napromieniowywanie samych komórek za pomocą zimnych plazm są ciężkie do kontrolowania i przewidzenia, a także wiążą się z wysokimi kosztami. Z tego też względu, najrozsądniejszym rozwiązaniem wydaje się być wytwarzanie mieszaniny o określonym stężeniu RFT i RFA w cieczach poddanych działaniu zimnych plazm. Komercyjnie dostępne pożywki hodowlane, które zostaną

poddane napromieniowaniu zimną plazmą, zapewniają dobrą kontrolę zawartości poszczególnych składników takiej pożywki. Należy nadmienić, że liczba badań rozpatrujących składy poszczególnych cieczy poddawanych działaniu zimnych plazm nieustannie wzrasta. Z tej właśnie perspektywy, dostrajanie stężenia reaktywnych form tlenu i azotu w mediach poddanych aktywacji wydaje się być bardziej rzetelnym podejściem. Na uwagę zasługuje ponadto fakt, że tak przygotowane ciecze aktywowane plazmą zachowują swoje właściwości nawet do 14 dni (Adachi i wsp., 2015). Kolejnym zagadnieniem w trakcie badań przedklinicznych pozostaje poznanie głębokości penetracji poszczególnych reaktywnych form podczas napromieniowania komórek/tkanek w trakcie traktowania zimnymi plazmami. Na chwilę obecną, nieliczne prace badawcze podejmują się badań nad układami reakcyjno-wyładowczymi, umożliwiającymi generację zimnych plazm podskórną, celem zwiększenia zdolności do penetracji takiego traktowania. Wprowadzanie podskórne cieczy napromieniowanej zimną plazmą może stanowić alternatywę o dobrej możliwości kontroli obszaru oddziaływania. Kolejną możliwością rozwiązania problemów zdolności do penetracji w głąb tkanek, równoczesne wykorzystanie podskórnie wprowadzanych roztworów post-plazmowych i napromieniowanie powierzchni nowotworu źródłem zimnych plazm. Na chwilę obecną, tak zaproponowane podejście do zwalczania czerniaka nie jest szeroko rozpatrywane przez środowiska badawcze.

Przechodząc z badań w fazie przedklinicznej, po zrealizowanych badaniach nad wytwarzaniem określonych reaktywnych związków, ich szczegółowego przebadania i studiowania ich zdolności do penetracji, następnym etapem powinno być prowadzenie prac z wykorzystaniem modeli tkankowych, *in vitro* i *in vivo*, celem potwierdzenia selektywnego oddziaływania źródeł zimnych plazm względem komórek raka piersi czy czerniaka. W tym przypadku, parametry operacyjne zimnych plazm jak dawka plazmy (czas napromieniowania, kąt napromieniowania, prędkość przepływu gazu plazmotwórczego), a także sposób poddawania napromieniowaniu, odległość traktowanej powierzchni powinny być rozpatrywane, aby zminimalizować uszkodzenia nanoszone komórkom nienowotworowym. Jednakże, w środowisku naukowym brakuje obecnie dobrego wytłumaczenia dla mechanizmu oddziaływania zimnych plazm na komórki nowotworowe. Opracowanie ogólnego podejścia traktowania względem poszczególnych linii nowotworowych jest jednym z bardziej pożądanym wyników prowadzonych prac.

Pierwszą przeszkodą napotykaną przez RFT i RFA w trakcie kontaktu z komórkami pozostaje błona komórkowa. Utlenianie błony komórkowej poprzez reaktywne formy tlenu

proceeds to disturbances in its fluidity and permeability. Oxidation of the cell membrane leads also to the formation of pores, through which freely pass molecules of water as well as RFT and RFA, contributing in the same way to the increase of oxidative stress and activation of signaling pathways (Yeagle, 1991). Natural protection against these disturbances in the cell membrane is associated with the presence of cholesterol fractions. Individual cell lines of tumors show different cholesterol content and, therefore, different sensitivity to the action of RFT and RFA (Eichholzer et al., 2000). A similar dependence was observed in the case of cell motility, where their mobility increased with the decrease of cholesterol fractions. In this case, the expression of specific aquaporins was correlated with the reduced production of RFT and RFA. More interestingly, individual tumor lines show the expression of different aquaporins, and not all aquaporins are capable of RFT transport through cell membranes. Moreover, it was observed that the appearance of specific aquaporin fractions was associated with chemoresistance and this factor should be considered during the preparation of treatment methods using cold plasmas (Gao et al., 2012). Treatment of tumor cells directly with cold plasmas leads to their activation. A similar phenomenon was observed during the activation of cells to a sensitive state as a result of incubation in liquid activated plasmas. Another issue remains the variable expression of the p53 gene in different cell lines, leading to different effects of cold plasmas and this fact should be taken into account at the stage of designing an effective anti-tumor therapy. Exposure to cold plasma sources leads to changes in the morphology of tumor cells, leading to the formation of blebs, as well as the reduction of cell size (Bekeschus et al., 2017). Such changes in cell morphology were observed exclusively in the case of tumor cells, confirming also a significant increase in the expression of Caspase 8, Caspase 3 and Systrin-2 (Bekeschus et al., 2017). The increase in Systrin-2 expression induced by cold plasma leads to the increase in iNOS expression and, therefore, to the enhanced induction of programmed cell death. It should be noted that cold plasma stimulates immune cells, supporting in this way the adaptive response of the immune system, positively contributing to the anti-tumor response. The same most promising approach seems to be the use of direct cold plasma treatment combined with other therapies or immune modulators. During phase 0 clinical trials,

farmakokinetyka (biodostępność i połowiczny czas rozkładu leków) powinna być zbadana przynajmniej w grupie 10 osób, aczkolwiek etap ten jest często pomijany na rzecz prac w fazie 1. Badania farmakokinetyki są realizowane w trakcie badań laboratoryjnych na modelach *in vitro* i *in vivo*. Czas połowicznego rozkładu leków należy postrzegać jako czas aktywności RFT i RFA, które to zostały już dokładnie zbadane i opisane w literaturze (Saadati i wsp., 2018). Duże perspektywy wykorzystania zimnych plazm bazują w znacznej części na selektywności oddziaływania pomiędzy składowymi zimnej plazmy i traktowanych komórek. Faza 1 badań klinicznych jest realizowana celem określenia czy wykorzystanie danego leku lub terapii jest bezpieczne dla grupy 20-100 zdrowych ochotników, a w przypadku terapii przeciwnowotworowej, w grupie pacjentów z obciążeniem nowotworowym. Pomyślne zrealizowanie tej fazy badań klinicznych wiąże się z wykazaniem braku efektów szkodliwych bądź efektywności terapii w grupie przynajmniej 70% spośród osób badanych (Fisher, 2015). Poniżej pokrótce zostaną przedstawione badania kliniczne nad wykorzystaniem zimnych plazm do zastosowania w procesach leczenia ran, a także zwalczania nowotworu szyi. Przytoczenie przykładu badań niezwiązanych z rakiem piersi lub czerniakiem, ma na celu przybliżenie metodologii prac z wykorzystaniem źródeł zimnych plazm do wytworzenia gotowego produktu klinicznego, a także perspektyw pomyślnego stworzenia terapii do zwalczania tych nowotworów. Pierwszym przykładem zrealizowanych badań klinicznych jest przypadek 51-letniego pacjenta rasy białej, płci męskiej, zmagającego się z bakteryjnym zakażeniem rany nowotworowej szyi z wyprostem do policzka, znajdującym w stadium paliatywnym (według klasyfikacji TNM, nowotworowi przypisano stadium IVb). Taki rodzaj ran nowotworowych często wiąże się z bólem, nieprzyjemnym odorem i krwawieniem. Obszar litego nowotworu w trakcie tych badań był traktowany z wykorzystaniem produktu medycznego kINPen® MED w czasie 5-6 min każde 2-3 dni. Wybrany sposób traktowania zimną plazmą przyczynił się do zmniejszenia stanu zapalnego w ranie nowotworowej, obniżenia poziomu bólu i odoru w obrębie całej powierzchni rany. Drugim przedstawionym przypadkiem badań klinicznych przeprowadzono z pomocą 55-letniego pacjenta płci męskiej, cierpiącego z powodu rany nowotworowej podbródka zakażonej bakteryjnie. Traktowanie zimną plazmą przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia medycznego kINPen® MED. prowadząc traktowanie w czasie 4-5 min każde 2-3 dni. Stwierdzono znaczące obniżenie obciążenia mikrobiologicznego w obrębie traktowanej rany. Ponadto stwierdzono zauważalne obniżenie rozmiaru nowotworu i jego reemisji, związane prawdopodobnie z indukcją śmierci apoptotycznej wśród komórek nowotworowych, a

także aktywacji i modulacji komórek zapalnych. Badania te w sposób pośredni wykazały wystąpienie śmierci apoptotycznej inicjowanej przez zimną plazmę, sugerując tym samym możliwość wykorzystania zimnej plazmy jako urządzenia do polepszenia jakości życia pacjentów znajdujących się w terminalnym stadium nowotworu. Nie stwierdzono ponadto wystąpienia negatywnych skutków wobec komórek nienowotworowych tak prowadzonego traktowania (Metelmann i wsp., 2015).

Badania kliniczne nad stworzeniem terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem technologii zimnych plazm znajdują się w początkowym. Rozpatrując obecny stan wiedzy i rozumienia zjawiska zimnych plazm i ich oddziaływania ze składnikami komórek, badania na zwierzętach lub pacjentach pozostają kluczowym etapem do oceny przydatności klinicznej tego typu rozwiązań technologicznych. Rozwijając tą myśl, podskórnice wprowadzone ksenogreniczne nowotwory różnych linii nowotworowych powinny być wykorzystywane na modelach mysich. Starając się przewidzieć nieustannie rozwijane prace, pierwsze badania kliniczne do zaproponowania terapii przeciwko czerniakowi z użyciem zimnych plazm zostaną zrealizowane w ciągu najbliższych 3-7 lat.

Naukowe zainteresowanie aktywnością biologiczną zimnych plazm na nowotwór skóry czy piersi są nieustannie rozwijane. Terapie przeciwnowotworowe w tym obszarze badań skupiają się głównie na rozwijaniu źródeł zimnych plazm jako narzędzi wspomagających powszechnie wykorzystywane metody zwalczania. Bezpośrednie oddziaływanie komórek nowotworu piersi lub czerniaka z zimną plazmą w znacznym stopniu przeprowadza je w stan wrażliwości, czyniąc je podatniejsze na stres oksydacyjny lub inne terapie przeciwnowotworowe. Obserwowane zahamowanie proliferacji komórkowej na skutek działania zimnych plazm może przyczynić się do obniżenia złośliwości nowotworu, pozytywnie wpływając na proces jego zwalczania. Proces ten poszerza możliwości środowiska naukowego w zakresie opracowania nowych metod leczenia czerniaka. Jednakże biorąc pod uwagę obecną wiedzę i zrozumienie oddziaływania zimnych plazm z komórkami, stworzenie efektywnej terapii przeciwko nowotworowi skóry wydaje się być dość odległy. Trudności te mogą zostać pokonane z czasem i wysiłkiem środowiska badawczego, a układy reakcyjno-wyładowcze zimnych plazm powinny być rozpatrywane jako mocny kandydat do stworzenia narzędzia do walki z rakiem piersi o wysokiej zdolności przerzutowania czy czerniakiem skóry.

## 17. Podsumowanie i wnioski końcowe

Podjmując się badań określenia aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej, przeprowadzone prace badawcze zaprezentowały wyniki traktowania pośredniego (zadanie I), bezpośredniego i mieszanego (zadanie II) komórek raka piersi i komórek nienowotworowych, a także obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków (zadanie III).

- i. Adaptując układy reakcyjno-wyładowcze, generujące zimną plazmę atmosferyczną do zastosowań biomedycznych, modulować możemy uzyskiwaną odpowiedź zarówno względem komórek nienowotworowych jak i modeli biologicznych ludzkiego nowotworu piersi.
- ii. Opracowanie układu pióra plazmowego, wraz z przeprowadzoną wieloczynnikową optymalizacją parametrów operowania umożliwiło generację zimnej plazmy do zastosowań biomedycznych.
- iii. Stożek zimnej plazmy o temperaturze poniżej 40 °C wytworzony w warunkach optymalnych operowania pióra plazmowego, umożliwia traktowanie modeli biologicznych eliminując jednocześnie wpływ szoku termicznego.
- iv. Wykazany został wpływ doboru odpowiedniej pożywki hodowlanej poddawanej aktywacji, czasu jej napromieniowania a także końcowej kompozycji na uzyskiwaną odpowiedź biologiczną.
- v. Komórki nienowotworowe cechował wysoki stopień niewrażliwości na działanie rozpatrywanego układu zimnej plazmy. Jednakże, tak przygotowane aktywowane pożywki hodowlane wykazały najsilniejszy efekt przeciwnowotworowy względem linii MDA-MB-231, doprowadzając do spadku żywotności komórek, zdolności migracji i indukcji śmierci apoptotycznej.
- vi. Odnotowana selektywność oddziaływania pożywek hodowlanych poddanych aktywacji piórem plazmowym wobec komórek linii MCF-10A oraz MDA-MB-231, co stanowić może obiecującą alternatywę do stworzenia terapii przeciw nowotworowi piersi o wysokiej złośliwości.
- vii. Obecność FBS w pożywce hodowlanej poddanej napromieniowaniu zimną plazmą wpływa na zmniejszenie stężenia wytwarzanego nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i przyczynia się do zmniejszonego efektu cytotoksycznego względem komórek raka piersi.

- viii. Właściwości przeciwnowotworowe pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą wynikają w głównej mierze z obecności RFT i RTA, np.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$ .
- ix. Pióro plazmowe zostało dostosowane do przeprowadzenia bezpośredniego napromieniowania komórek linii MCF-10A, MCF-7 i MDA-MB-231, zaburzając ich żywotność, ruchliwość i indukując apoptozę.
- x. Wybrane modele *in vitro* raka piersi poddane traktowaniu mieszanemu z użyciem pióra plazmowego wykazały wzmożoną odpowiedź biologiczną, doprowadzając do zaburzeń ich aktywności mitochondrialnej, zahamowanej migracji i śmierci.
- xi. Zdecydowany efekt cytotoksyczny bezpośredniej ekspozycji na pióro plazmowe zaobserwowano dla czasu 45 sekund i dłuższym wobec komórek linii nowotworowej MCF-7 i MDA-MB231 jak i komórek linii nienowotworowej MCF-10A.
- xii. Dążąc do osiągnięcia możliwie znikomej cytotoksyczności względem komórek nienowotworowych, pozostałe badania biologiczne zrealizowano dobierając czas bezpośredniego napromieniowania 30 s. Tak dobrany czas ekspozycji przyczynił się do widocznego spadku żywotności komórek linii MCF-7 i MDA-MB-231, a efekt ten był wzmacniany za sprawą inkubacji komórek w pożywce aktywowanej plazmą, nie okazując jednocześnie cytotoksyczności względem komórek nienowotworowych.
- xiii. Ustalona dawka zimnej plazmy wpłynęła za zdecydowane zahamowanie mobilności komórek linii MDA-MB-231, w szczególności dla komórek poddanych traktowaniu mieszanemu.
- xiv. Sprawdzając możliwe powody obserwowanego zahamowania mobilności komórek, populacja komórek linii MDA-MB-231 w tak dobranych warunkach traktowania odznaczała się wysokim procentowym udziałem komórek apoptotycznych, wskazując na mocny efekt cytotoksyczny.
- xv. Traktowanie bezpośrednio zainicjowało wystąpienie znaczącej populacji komórek apoptotycznych w linii MCF-10A, jedynie dla jednego z czterech warunków eksperymentalnych.
- xvi. Mieszane podejście wykorzystania układu zimnej plazmy stanowi efektywniejszą alternatywę do traktowania komórek nowotworu piersi o wysokiej złośliwości.



- xvii. Komórki wystawione na bezpośrednią ekspozycję pióra plazmowego wprowadzone zostały prawdopodobnie w stan zwiększonej podatności na reaktywne formy generowane w pożywkach hodowlanych, inicjując tym samym gwałtowniejszą odpowiedź biologiczną komórek linii MDA-MB-231.
- xviii. Wykazany został również wysoki stopień selektywności zaproponowanego układu zimnej plazmy, zapewniając znikomą cytotoksyczność względem komórek nienowotworowych, stanowiąc tym samym dobrą korelację z wynikami zaprezentowanymi dla traktowania pośredniego układem pióra plazmowego.
- xix. Pióro plazmowe dzięki przeprowadzonej optymalizacji jego pracy umożliwiło wywołanie efektów przeciwnowotworowych względem komórek linii raka piersi o wysokiej złośliwości.
- xx. Optymalizując warunki pracy innego układu zimnej plazmy (pióro i szczotka plazmowa) wykazano redukcję aktywności biologicznej względem wodnych roztworów farmaceutyków.
- xxi. Skonstruowany układ reakcyjno-wyładowczy operowany w trybie ciągłego przepływu roztworów antybiotyków, poddano wieloczynnikowej optymalizacji celem określenia parametrów prowadzenia procesu do uzyskania największej efektywności degradacji molekuł o potencjale biobójczym.
- xxii. Optymalizacja zapewniła parametry generujące stożek plazmy o najwyższej możliwej temperaturze i długości, korelując te parametry ze sposobnością wytworzenia największych zawartości reaktywnych indywiduów zaangażowanych w zjawisko degradacji.
- xxiii. Celem zwiększenia efektywności rozkładu wodnych roztworów antybiotyków, skonstruowany został układ szczotki plazmowej. Wykorzystując warunki optymalne wyznaczone dla pióra plazmowego, konstrukcja szczotki plazmowej zapewniła wytworzenie pięć stożków zimnej plazmy.
- xxiv. Wykazane zostało zmniejszenie wyjściowej zawartości farmaceutyków, a stopień redukcji wzrósł wraz ze zwielokrotnieniem liczby stożków plazmy.
- xxv. Efektywność procesu rozkładu zmieniała się znacznie w zależności od traktowanego roztworu antybiotyku.
- xxvi. Wzrost zawartości antybiotyków w roztworach wodnych przekłada się na obniżenie wydajności ich rozkładu zarówno przy użyciu pióra plazmowego jak i szczotki plazmowej.

- xxvii. Największą podatność na traktowanie zimną plazmą wykazały wodne roztwory doksycyliny i ampicyliny.
- xxviii. Szczotka plazmowa zapewniła również widoczną redukcję aktywności biobójczej roztworów poddanych napromieniowaniu w stosunku do rozpatrzonych modeli bakteryjnych, tj. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* i *Enterobacter cloacae*.
- xxix. Efektywność degradacji wodnych roztworów antybiotyków potraktowanych piórem plazmowym i szczotką plazmową była związana z wytworzeniem RFT i RFA tj.,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , , w szczególności  $\text{O}_3$  i  $\text{OH}^\bullet$ .
- xxx. Oznaczone stężenia RFT i RFA w roztworach wodnych antybiotyków potraktowanych szczotką plazmową były znacząco wyższe w porównaniu ze stężeniami uzyskanymi dla pióra plazmowego.
- xxxi. Różnice w oznaczonych stężeniach RFT i RFA dla pióra plazmowego i szczotki plazmowej były bezpośrednio odpowiedzialne za różnice w efektywności rozkładu wodnych roztworów antybiotyków.
- xxxii. Zaobserwowane wyniki zmniejszenia potencjału biobójczego wydają się być niezwykle istotne, ze względu na rozwijający się nieustannie proces nabywania wielolekowej oporności przez bakteryjne patogeny występujące w środowisku naturalnym. Niwelacja właściwości biobójczych roztworów post-plazmowych wraz ze zmniejszeniem ich zawartości nakładają się na pozytywne wyniki prowadzonych prac, tworząc obiecującą ścieżkę rozwoju technologii do wykorzystania w zakładach oczyszczania ścieków.

## 18. Plany na przyszłość

- Kontynuując tematykę badawczą wykorzystania układów zimnej plazmy w medycynie, chciałbym podjąć prace mające na celu określenia ścieżek sygnałowych i indukcji pyroptozy w liniach ludzkiego nowotworu poddanych działaniu zimną plazmą atmosferyczną. Analiza będzie prowadzona z wykorzystaniem cytometrii mas.

- Rozwinięciem tematyki badawczej z obszaru medycyny plazmy będą prace mające na celu uwrażliwienie komórek nowotworowych na działanie chemoterapeutyków za pomocą układów pióra plazmowego. Dodatkowym zagadnieniem będzie podjęcie starań wykorzystania pióra plazmowego do zwalczania zjawiska chemooporności komórek nowotworowych wraz z interpretacją zachodzących mechanizmów .

- Biorąc pod uwagę stosunkowo wysokie koszty operacyjne pióra plazmowego związanych z wysokim przepływem helu, zaprojektowane zostaną nowe układy, w których będzie można stosować azot i/lub powietrze, a następnie zbadany zostanie ich wpływ na wybrane modele linii komórkowych. W projekcie konstrukcji zwiększone zostaną ponadto rozmiary generowanego stożka plazmy, umożliwiając tym samym wytworzenie układu do pracy z modelami *in vivo*.

- Możliwość rozkładu antybiotyków za pomocą zimnej plazmy daje możliwość rozszerzenia badań na inne biologicznie aktywne związki organiczne (np. środki przeciwbólowe i hormony).

- Skonstruowany układ szczotek plazmowych w przyszłości chciałbym połączyć z generatorem, wytwarzającym wyładowania o częstotliwościach radiowych, celem wytworzenia zimnej plazmy z użyciem azotu, bądź jego mieszanki z helem. Przygotowany w ten sposób układ zostanie wykorzystany do przeprowadzenia rozkładu z roztworów wodnych kolejnych antybiotyków- ofloksacyny, doksycykliny, chloroamfenikolu i mieszanin tych czterech farmaceutyków.

- Dla pełniejszego zrozumienia całości zachodzących mechanizmów reakcji, zostaną przeprowadzone prace z wykorzystaniem związków maskujących poszczególne reaktywne formy generowane przez zimną plazmę. Poprzez zamaskowanie poszczególnych związków aktywnych, różnice w efektywności rozkładu antybiotyków będą stanowiły o ich stopniu zaangażowania w procesach degradacji.

- Chciałbym również podjąć prace nad określeniem wpływu pH roztworu antybiotyków na efektywność ich degradacji z użyciem układów zimnej plazmy, tym samym analizując reakcje kaskadowe zaangażowane w tych procesach.
- Ostatnim etapem prac prowadzonych w ramach wykorzystania szczotek plazmowych do rozkładu antybiotyków, przygotuję konstrukcję zwiększającą rozmiar generowanego stożka plazmy bądź zwielokrotnię ilość wytworzonych stożków plazmy do dziesięciu lub piętnastu. Rozwiązanie konstrukcyjne zostanie następnie wykorzystane do oceny efektywności rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych, a także ocenione zostaną właściwości biobójcze tak wytworzonych roztworów post-plazmowych.

## 19. Bibliografia

2020 Breast Cancer Statistics. Dostępne online: <https://www.nationalbreastcancer.org/wp-content/uploads/2020-Breast-Cancer-Stats.pdf> (ostatni dostęp: 13 kwietnia 2020).

Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Neisseria Meningitidis*, 2010; 2011

Adachi, T., Tanaka, H., Nonomura, S., Hara, H., Kondo, S., Hori, M. (2015). Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network. *Free Radic Biol Med.* 79, 28-44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.014>

Adhikari, M., Adhikari, B., Ghimire, B., Baboota, S., Choi, E. H. (2020). Cold atmospheric plasma and silymarin nanoemulsion activate autophagy in human melanoma cells. *Int J Mol Sci.* 21, 1939-1957. <https://doi.org/10.3390/ijms21061939>

Adil, B. H.; Al-Shammari, A. M.; Murbat, H. H. (2020). Breast cancer treatment using cold atmospheric plasma generated by the FEDBD scheme. *Clin. Plasma Med.* 19-20, 100103-100114. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2020.100103>

Adil, B. H.; Al-Shammari, A. M.; Murbat, H. H. (2019). Cold Atmospheric Plasma generated by FE-DBD Scheme cytotoxicity against Breast Cancer cells. *Res. J. Biotech.* 14, 192-195.

Almeida-Ferreira, C.; Silva-Teixeira R.; Laranjo, M.; Almeida N.; Brites G.; Dias-Ferreira, J.; Marques, I.; Neves, R.; et all. (2022) Open-Air Cold Plasma Device Leads to Selective Tumor Cell Cytotoxicity. *Appl. Sci.* 11, 4171-4190. <https://doi.org/10.3390/app11094171>

Apalla, Z., Lallas, A., Sotiriou, E., Lazaridou, E., Ioannides, D. (2017). Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept.* 7, 17-22. <https://doi.org/10.5826/dpc.0702a01>

Azzariti, A., Iacobazzi, R. M., Di Fonte, R., Porcelli, L., Gristina, R., Fracassi, F., Trizino, I., Silvestris, N., Guida, G., Tommasi, S., Sardella, E. (2019). Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci Rep.* 9, 4099-5011. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40637-z>

Bañobre-López, M.; Teijeiro, A.; Rivas, J. (2013). Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 18, 397-400. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011>.

Bekeschus, S., Rödder, K., Fregin, B., Otto, O., Lippert, M., Weltmann, K. D., Wende, K., Schmidt, A., Gandhirajan, R. K. (2017). Toxicity and Immunogenicity in Murine Melanoma following Exposure to Physical Plasma-Derived Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 1-12, <https://doi.org/10.1155/2017/4396467>

Bekeschus, S.; Lippert, M.; Diepold, K.; Chiosis, G.; Seufferlein, T.; Azoitei, N. (2019). Physical plasma-triggered ROS induces tumor cell death upon cleavage of HSP90 chaperone. *Sci. Rep.* 9, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38580-0>.

Beyeler, J.; Schnyder, I.; Katsaros, C.; Chiquet, M. (2014). Accelerated Wound Closure In Vitro by Fibroblasts from a Subgroup of Cleft Lip/Palate Patients: Role of Transforming Growth Factor- $\alpha$ . *PLoS ONE* 9, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111752>

Biazar, E.; Majdi, A.; Zafari, M.; Avar, M.; Aminifard, S.; Zaeifi, D.; Ai, J.; Jafarpour, M.; Montazeri, M.; Rad, H.G. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int. J. Nanomed.* 6, 1117-1127.

Boehm, D.; Heslin, C.; Cullen, P.J.; Bourke, P. (2016). Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. *Sci. Rep.* 337, 21464-21477. <https://doi.org/10.1038/srep21464>

Bruggeman, P. J.; Kushner, M. J.; Locke, B. R.; Gardeniers, J. G. E.; Graham, W. G.; Graves, D. B.; Hofman-Caris, R. C. H. M.; Maric, D.; Reid, J. P.; Ceriani, E. (2016). Plasma-liquid interactions: A review and roadmap. *Plasma Sources Sci. Technol.* 25, 1-59. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/053002>

Cailleau, R.; Olive, M.; Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro* 14, 911-915. <https://doi.org/10.1007/BF02616120>

Calavia, P. G.; Chambrier, I.; Cook, M. J.; Haines, A. H.; Field, R. A.; Russell, D. A. (2018). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 512, 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.030>

Cardona, C. A.; Chica Arrieta, E. L.; Peñuela Mesa, G. A. (2017). Sensitive Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide in Aqueous Samples from Advanced Oxidation Processes: Evaluation of Possible Interferences 578, 161-168. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/328470> [View: 26-04-2022]

Chauvin, J., Judée, F., Yousfi, M., Vicendo, P., Merbahi, N. (2017). Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet. *Sci Rep.* 7, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04650-4>

Chen, P. R., Wang, M. C., Chuang, Y. J. (2018). Use of low temperature cold atmospheric plasma in the treatment of melanoma cells. Proceedings of the 2018 8th International Conference on Bioscience, *Biochemistry and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1145/3180382.3180389>

Cheng, X., Sherman, J., Murphy, W., Ratovitski, E., Canady, J., Keidar, M. (2014). The effect of tuning cold plasma composition on glioblastoma cell viability. *PLoS ONE*. 9, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098652>

Choi, B. B. R., Choi, J. H., Hong, J. W., Song, K. W., Lee, H. J., Kim, U. K., Kim, G. C. (2017). Selective killing of melanoma cells with non-thermal atmospheric pressure plasma and p-FAK antibody conjugated gold nanoparticles. *Int J Med Sci.* 14, 1101-1109. <https://doi.org/10.7150/ijms.20104>

Choi, B. B., Kim, M. S., Song, K. W., Kim, U. K., Hong, J. W., Lee, H. J., Kim, G. C. (2015). Targeting NEU protein in melanoma cells with non-thermal atmospheric pressure plasma and gold nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol.* 11, 900-905. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1999>

Crowley, L. C.; Marfell, B. J.; Scott, A. P.; Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 953-957, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>

Cyganowski, P.; Terefinko, D.; Jamroz, P.; Pohl, P.; Dzimitrowicz, A. (2021). Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma as a Powerful Tool for the Synthesis of Rhenium-Based Nanostructures for the Catalytic Hydrogenation of 4-Nitrophenol. *RSC Adv.* 11, 38596–38604. <https://doi.org/10.1039/D1RA07416D>

Daeschlein, G., Hillmann, A., Gümbel, D., Sicher, C., von Podewils, S., Stope, M. B., Junger, M. (2018). Enhanced anticancer efficacy by drug chemotherapy and cold atmospheric plasma against melanoma and glioblastoma cell lines in vitro. *IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci.* 2, 153-159. <https://doi.org/10.1109/TRPMS.2018.2789659>

Damia, G., D’Incalci, M. (2009) Contemporary pre-clinical development of anticancer agents—what are the optimal preclinical models? *Eur J Cancer.* 45, 2768-2781. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.08.008>

de Souza Santos, L. V.; Meireles, A. M.; Lange, L. C. (2015). Degradation of Antibiotics Norfloxacin by Fenton, UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Environ. Manage.* 154, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.021>

Debath, J.; Muthuswamy, S. K.; Brugge, J. S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30, 256-268. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00032-X)

Devi, L.; Gupta, R.; Jain, S. K.; Singh, S.; Kesharwani, P. (2020). Synthesis, characterization and in vitro assessment of colloidal gold nanoparticles of Gemcitabine with natural polysaccharides for treatment of breast cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 56, 101565- 101573 . <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101565>

Ding, G. C.; Radl, V.; Schloter-Hai, B.; Jechalke, S.; Heuer, H.; Smalla, K.; Schloter, M. (2014). Dynamics of Soil Bacterial Communities in Response to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *PLoS ONE* 9, 1-10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092958>

Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A. (2012). Deep penetration into tissues of reactive oxygen species generated in floating-electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD): an in vitro agarose gel model mimicking an open wound. *Plasma Med.* 2, 71-83. <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2013006218>

Duan, J., Lu, X., He, G. (2017). On the penetration depth of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet through real biological tissue. *Phys Plasmas.* 24, 073506-073512. <https://doi.org/10.1063/1.4990554>

Dzimitrowicz, A.; Bielawska-Pohl, A.; Jamroz, P.; Dora, J.; Krawczenko, A.; Busco, G.; Grillon, C.; Kieda, C.; Klimczak, A.; Terefinko, D. (2020). Activation of the Normal Human Skin Cells by a Portable Dielectric Barrier Discharge-Based Reaction-Discharge System of a Defined Gas Temperature. *Plasma Chem. Plasma Process.* 40, 79-97. <https://doi.org/10.1007/s11090-019-10039-0>

Dzimitrowicz, A.; Cyganowski, P.; Pohl, P.; Jermakowicz-Bartkowiak, D.; Terefinko, D.; Jamroz, P. (2018). Atmospheric Pressure Plasma-Mediated Synthesis of Platinum Nanoparticles Stabilized by Poly(vinylpyrrolidone) with Application in Heat Management

Systems for Internal Combustion Chambers. *Nanomaterials*, 8, 619-634. <https://doi.org/10.3390/nano8080619>.

Dzimitrowicz, A.; Motyka-Pomagruk, A.; Cyganowski, P.; Jamroz, P.; Terefinko, D.; Pohl, P.; Klis, T.; Caban, M. (2021). Cold Atmospheric Pressure Plasmas as Versatile Tools for Effective Degradation of a Mixture of Hazardous and Endocrine Disturbing Compounds from Liquid Wastes. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 106718-106729, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106718>

Eichholzer, M., Stähelin, H. B., Gutzwiller, F., Ludin, E., Bernasconi, F. (2000). Association of low plasma cholesterol with mortality for cancer at various sites in men: 17-y follow-up of the prospective Basel study. *Am J Clin Nutr.* 71, 569-574. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.569>

el Shaer, M.; Eldaly, M.; Heikal, G.; Sharaf, Y.; Diab, H.; Mobasher, M.; Rousseau, A. (2020). Antibiotics Degradation and Bacteria Inactivation in Water by Cold Atmospheric Plasma Discharges Above and Below Water Surface. *Plasma Chem. Plasma Process.* 40, 971–983. <https://doi.org/10.1007/s11090-020-10076-0>.

Elmolla, E. S.; Chaudhuri, M. (2010). Comparison of Different Advanced Oxidation Processes for Treatment of Antibiotic Aqueous Solution. *Desalination* 256, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.02.019>

Ferretti, R., Bhutkar, A., McNamara, M. C., Lees, J. A. (2016). BMI1 induces an invasive signature in melanoma that promotes metastasis and chemoresistance. *Genes Dev.* 30, 18-33. <https://doi.org/10.1101/gad.267757.115>

Fisher, J. A. (2015). Feeding and bleeding: the institutional banalization of risk to healthy volunteers in phase I pharmaceutical clinical trials. *Sci Technol Human Values.* 40, 199-226. <https://doi.org/10.1177/0162243914554838>

Fraszczak, J., Trad, M., Janikashvili, N., Cathelin, D., Lakomy, D., Granci, V., Morizot, A., Audia, S., Micheau, O., Lagrost, L., Katsanis, E., Solary, E., Larmonier, N., Bonnotte, B. (2010). Peroxynitrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells. *J Immunol.* 184, 1876-1884. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900831>

Fridman, G.; Friedman, G.; Gutsol, A.; Shekhter, A. B.; Vasilets, V. N.; Fridman, A. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* 5, 503-533. <https://doi.org/10.1002/ppap.200700154>.

Gao, L., Gao, Y., Li, X., Howell, P., Kumar, R., Su, X., Vlassov, A. V., Piazza, G. A., Riker, A. I., Sun, D., Xi, Y. (2012). Aquaporins mediate the chemoresistance of human melanoma cells to arsenite. *Mol Oncol.* 6, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.11.001>

Gelband, H.; Miller, M.; Suraj, P.; Sumanth, P.; Jordan, G.; Levinson, D.; Barter, A. W.; Laxminarayan, R. (2015). The State of the World's Antibiotics 2015. *Wound healing southern Africa* 8, 30-34.

Ghoncheh, M.; Pournamdar, Z.; Salehiniya, H (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17, 43-46. <http://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.S3.43>



Giger, W.; Alder, A. C.; Golet, E. M.; Kohler, H. P. E.; McArdell, C.S.; Molnar, E.; Siegrist, H.; Suter, M. J. F. (2003). Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters. *Chimia* 57, 485-491. <https://doi.org/10.2533/000942903777679064>.

Gorbanev, Y.; Privat-Maldonado, A.; Bogaerts, A. (2018). Analysis of Short-Lived Reactive Species in Plasma–Air–Water Systems: The Dos and the Do Nots. *Anal. Chem.* 90, 13151-13158. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03336>

Griseti, E.; Merbahi, N.; Golzio, M. (2020). Ani-cancer potential of two plasma-activated liquids: Implication of long-lived reactive oxygen and nitrogen species. *Cancers* 12, 721-735. <https://doi.org/10.3390/cancers12030721>

Guo, H.; Jiang, N.; Wang, H.; Lu, N.; Shang, K.; Li, J.; Wu, Y. (2019). Degradation of Antibiotic Chloramphenicol in Water by Pulsed Discharge Plasma Combined with TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> Composites: Mechanism and Degradation Pathway. *J. Hazard. Mater.* 371, 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.051>

Gurung, J. P.; Subedi, D. P.; Shrestha, R.; Shrestha, B. G. (2020). Application of Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet (APAPJ) in Biomedical Science and Engineering. *J. Trop. Life Sci.* 10, 149-154. <https://doi.org/10.11594/jtls.10.02.07>.

Han, D., Cho, J. H., Lee, R. H., Bang, W., Park, K., Kim, M. S., Shim, J. H., Chae, J. I., Moon, S. Y. (2017). Antitumorigenic effect of atmospheric-pressure dielectric barrier discharge on human colorectal cancer cells via regulation of Sp1 transcription factor. *Sci Rep.* 7, 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep43081>

Herianto, S.; Hou, C. Y.; Lin, C. M.; Chen, H. L. (2021). Nonthermal Plasma-Activated Water: A Comprehensive Review of This New Tool for Enhanced Food Safety and Quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 583–626. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12667>.

Hertrich, S. M., Boyd, G., Sites, J., Niemira, B. A. (2017). Cold plasma inactivation of salmonella in prepackaged, mixed salads is influenced by cross-contamination sequence. *J Food Prot.* 80, 2132-2136. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-242>

Iseni, S., Schmidt-Bleker, A., Winter, J., Weltmann, K. D., Reuter, S. (2014). Atmospheric pressure streamer follows the turbulent argon air boundary in a MHz argon plasma jet investigated by OH tracer PLIF spectroscopy. *J Phys D Appl Phys.* 47, 152001-152008. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/15/152001>

Jamroz, P.; Greda, K.; Pohl, P.; Zyrnicki, W. (2014). Atmospheric Pressure Glow Discharges Generated in Contact with Flowing Liquid Cathode: Production of Active Species and Application in Wastewater Purification Processes. *Plasma Chem. Plasma Process.* 34, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s11090-013-9503-3>

Jeze, M. A.; Tayebi, T.; Khani, M. R.; Niknejad, H.; Shokri, B. (2020). Direct cold atmospheric plasma and plasma-activated medium effects on breast and cervix cancer cells. *Plasma Process. Polym.* 17, 1-14. <https://doi.org/10.1002/ppap.201900241>

Joshi, M. S., Ponthier, J. L., Lancaster, J. R. (1999). Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 27, 1357-1366. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00179-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00179-3)

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, 1-11. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0016270>

Kamdje, A. H. N.; Etet, P. F. S.; Vecchio, L.; Tagne, R. S.; Amvene, J. M.; Muller, J. M.; Krampera, M.; Lukong, K. E. (2014). New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. *World J. Clin. Cases*, 2, 769- 786. <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.769>

Kang, K., Park, J., Hyoung, S., Oh, J. Y. (2014). (12) United States Patent. US 9,539,352 B2

Karami-Gadallo, L., Ghoranneviss, M., Ataie-Fashtami, L. et al (2017). Enhancement of cancerous cells treatment by applying cold atmospheric plasma and photo dynamic therapy simultaneously. *Clin Plasma Med.* 7-8, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2017.08.002>

Kaushik, N.K.; Ghimire, B.; Li, Y.; Adhikari, M.; Veerana, M.; Kaushik, N.; Jha, N.; Adhikari, B.; Lee, S.-J.; Masur, K. (2019). Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol. Chem.* 400, 39-62. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0226>

Kawasaki, T., Sato, A., Kusumegi, S., Kudo, A., Sakanoshita, T., Tsurumaru, T., Uchida, G., Koga, K., Shiratani, M. (2016). Two-dimensional concentration distribution of reactive oxygen species transported through a tissue phantom by atmospheric-pressure plasma-jet irradiation. *Appl Phys Express.* 9, 076202-076208. <https://doi.org/10.7567/APEX.9.076202>

Kim, H. W.; Jeong, D.; Ham, J.; Kim, H.; Ji, H. W.; Choi, E. H.; Kim, S. J. (2020). ZNRD1 and Its Antisense Long Noncoding RNA ZNRD1-AS1 Are Oppositely Regulated by Cold Atmospheric Plasma in Breast Cancer Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/9490567>

Kim, J. H.; Cho, E. H.; Kim, K. S.; Kim, H. Y.; Kim, Y. M. (1998). Cloning and Nucleotide Sequence of the DNA Gyrase GyrA Gene from *Serratia Marcescens* and Characterization of Mutations in GyrA of Quinolone- Resistant Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 190–193. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.190>

Kleineidam, B.; Nokhbehshaim, M.; Deschner, J.; Wahl, G. (2019). Effect of cold plasma on periodontal wound healing—An in vitro study. *Clin. Oral Investig.* 23, 1941-1950. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2643-3>.

Kovalakova, P.; Cizmas, L.; McDonald, T. J.; Marsalek, B.; Feng, M.; Sharma, V. K. (2020). Occurrence and Toxicity of Antibiotics in the Aquatic Environment: A Review. *Chemosphere*, 251, 126351-126366. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>

Kunchandy, E.; Rao, M.N.A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharm.* 58, 237-240. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90201-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90201-E).

Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A. M.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M. G.; Bessières, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; et al. (1997). The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus Subtilis*. *Nature* 390, 249–256, <https://doi.org/10.1038/36786>

Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y. E.; Lee, Y. B. (2018). Veterinary Antibiotics (VAs) Contamination as a Global Agro-Ecological Issue: A Critical View. *Agric., Ecosys. & Environ.* 257, 47-59. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2018.01.026>

Kurosawa, M.; Takamatsu, T.; Kawano, H.; Hayashi, Y.; Miyahara, H.; Ota, S.; Okino, A.; Yoshida, M. (2019). Endoscopic Hemostasis in Porcine Gastrointestinal Tract Using CO<sub>2</sub> Low-Temperature Plasma Jet. *J. Surg. Res.* 234, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.09.068>.

Kwon, J. H.; Powderly, W. G. (2021). The Post-Antibiotic Era Is Here. *Science* 373, <https://doi.org/471.10.1126/SCIENCE.ABL5997>

Li, X. Y., Feng, Z., Pu, S. C., Yang, Y., Shi, X. M., Xu, Z. (2018). Cold atmospheric plasma jet-generated oxidized derivatives of tryptophan and their selective effects on murine melanoma and fibroblast cells. *Plasma Chem Plasma Process.* 38, 919-936. <https://doi.org/10.1007/s11090-018-9910-6>

Li, Y. C.; Park, M. J.; Ye, S. -K.; Kim, C. -W.; Kim, Y. -N. (2006). Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. *Am. J. Pathol.* 168, 1107-1118. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050959>.

Li, Y., Kang, M. H., Uhm, H. S., Lee, G. J., Choi, E. H., Han, I. (2017). Effects of atmospheric-pressure non-thermal bio-compatible plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells. *Sci Rep.* 7, 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep45781>

Lietz, A. M., Kushner, M. J. (2018). Molecular admixtures and impurities in atmospheric pressure plasma jets. *J Appl Phys.* 124, 1-15. <https://doi.org/10.1063/1.5049430>

Lin, A., Gorbanev, Y., De Backer, J., Von Loenhout, J., Van Boxem, W., Lemiere, F., Cos, P., Dewilde, S., Smits, E., Bogaerts, A. (2019). Non-thermal plasma as a unique delivery system of short-lived reactive oxygen and nitrogen species for immunogenic cell death in melanoma cells. *Adv Sci.* 6, 1-15. <https://doi.org/10.1002/advs.201802062>

Lin, L.; Ding, C. B.; Jin, T.; Han, X. H.; Zhou, H.; Wu, Z. W.; Pan, Y. Y. (2020). A meaningful attempt: Applying dielectric barrier discharge plasma to induce apoptosis of MDA-MB-231 cells via regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGFA expression. *Surf. Coat. Technol.* 401, 126293-126300. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126293>

Ling, L.; Jiafeng, J.; Jiangang, L.; Minchong, S.; Xin, H.; Hanliang, S.; Yuanhua, D. (2014). Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Sci. Rep.* 4, 1-7. <https://doi.org/10.1038/srep05859>.

Liu, D., He, T., Liu, Z., Wang, S., Liu, Z., Rong, M., Kong, M. G. (2018). Spatial-temporal distributions of ROS in model tissues treated by a He + O<sub>2</sub> plasma jet. *Plasma Process Polym.* 15, 1800057-1800063. <https://doi.org/10.1002/ppap.201800057>

Liu, D.; He, T.; Liu, Z.; Wang, S.; Liu, Z.; Rong, M.; Kong, M. G. (2018). Spatial-Temporal Distributions of ROS in Model Tissues Treated by a He+O<sub>2</sub> Plasma Jet. *Plasma Process. Polym.* 15, 1800057-1800065. <https://doi.org/10.1002/PPAP.201800057>

Liu, P.; Zhang, H.; Feng, Y.; Yang, F.; Zhang, J. (2014). Removal of Trace Antibiotics from Wastewater: A Systematic Study of Nanofiltration Combined with Ozone-Based

Advanced Oxidation Processes. *Chem. Eng. J.* 240, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.057>

Liu, Y.; Tan, S.; Zhang, H.; Kong, X.; Ding, L.; Shen, J.; Lan, Y.; Cheng, C.; Zhu, T.; Xia, W. (2017). Selective effects of non-thermal atmospheric plasma on triple-negative breast normal and carcinoma cells through different cell signaling pathways. *Sci. Rep.* 7, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08792-3>.

Lu, X., Xiong, Q., Xiong, Z., Hu, J., Zhou, F., Gong, W., Xian, Y., Zou, C., Tang, Z., Jiang, Z., Pan, Y. (2009). Propagation of an atmospheric pressure plasma plume. *J Appl Phys.* 105, 043304-043309. <https://doi.org/10.1063/1.3079503>

Magureanu, M.; Bilea, F.; Bradu, C.; Hong, D. (2021). A Review on Non-Thermal Plasma Treatment of Water Contaminated with Antibiotics. *J. Hazard. Mater.* 417, 125481-125512. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125481>

Magureanu, M.; Piroi, D.; Mandache, N. B.; David, V.; Medvedovici, A.; Bradu, C.; Parvulescu, V. I. (2011). Degradation of Antibiotics in Water by Non-Thermal Plasma Treatment. *Water Research* 45, 3407–3416. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.057>

Maluta, S.; Kolff, M. W. (2015). Role of Hyperthermia in Breast Cancer Locoregional Resurgence: A Review. *Breast Care* 10, 408-412. <https://doi.org/10.1159/000440792>.

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. *Mater. Adv.* 1, 1494-1505.

Mashayekh, S., Rajaei, H., Akhlaghi, M., Shokri, B., Hassan, Z. M. (2015). Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). *Phys Plasmas.* 22, 1-8. <https://doi.org/10.1063/1.4930536>

Mehrabifard, R.; Mehdian, H.; Hajisharifi, K.; Amini, E. (2020). Improving Cold Atmospheric Pressure Plasma Efficacy on Breast Cancer Cells Control-Ability and Mortality Using Vitamin C and Static Magnetic Field. *Plasma Chem. Plasma Process.* 40, 511-526. <https://doi.org/10.1007/s11090-019-10050-5>.

Metelmann, H. R., Nedrelow, D. S., Seebauer, C., Schuster, M., von Woedtke, T., Weltmann, K. D., Kindler, S., Metelmann, P. H., Finkelstein, S. E., von Hoff, D. D., Podmelle, F. (2015). Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clin Plasma Med.* 3, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.02.001>

Minogue, T. D.; Daligault, H. A.; Davenport, K. W.; Bishop-Lilly, K. A.; Broomall, S. M.; Bruce, D. C.; Chain, P. S.; Chertkov, O.; Coyne, S. R.; Freitas, T.; et al. (2014). Complete Genome Assembly of Escherichia Coli ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announcements* 2, <https://doi.org/10.1128/genomeA.00969-14>

Mirpour, S.; Ghomi, H.; Piroozmand, S.; Nikkhah, M.; Tavassoli, S. H.; Azad, S. Z. (2014). The Selective Characterization of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma Jet on Treatment of Human Breast Cancer and Normal Cells. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 42, 315-322. <https://doi.org/10.1109/TPS.2013.2291860>

Mitsugi, F., Kusumegi, S., Kawasaki, T. (2019). Visualization of ROS distribution generated by atmospheric plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci.* 47, 1057-1062. <https://doi.org/10.1109/TPS.2018.2858807>

Mohades, S., Laroussi, M., Sears, J., Barezzi, N., Razavi, H. (2015). Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells. *Phys Plasmas*. 22, 122001-122007. <https://doi.org/10.1063/1.4933367>

Mokhtari, H.; Farahmand, L.; Yaserian, K.; Jalili, N.; Majidzadeh, A. K. (2019). The antiproliferative effects of cold atmospheric plasmaactivated media on different cancer cell lines, the implication of ozone as a possible underlying mechanism. *J. Cell. Physiol.* 234, 6778-6782. <https://doi.org/10.1002/jcp.27428>.

Morrison, G. R. (1971). Microchemical determination of organic nitrogen with nessler reagent. *Anal. Biochem.* 43, 527-532. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90283-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90283-1)

Naito, K., Tachikawa, T., Fujitsuka, M., Majima, T. (2008). Real-time single-molecule imaging of the spatial and temporal distribution of reactive oxygen species with fluorescent probes: applications to TiO<sub>2</sub> photocatalysts. *J Phys Chem C*. 112, 1048-1059. <https://doi.org/10.1021/jp0763351>

Nie, L., Yang, Y., Duan, J., Sun, F., Lu, X., He, G. (2018). Effect of tissue thickness and liquid composition on the penetration of long-lifetime reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by a plasma jet. *J Phys D Appl Phys*. 51, 345204-345216. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad427>

Nie, L.; Yang, Y.; Duan, J.; Sun, F.; Lu, X. P.; He, G. (2018). Effect of tissue thickness and liquid composition on the penetration of long-lifetime reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by a plasma jet. *J. Phys. D Appl. Phys.* 61, 1-19. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad427>.

Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78, 119-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>

Park, S. B.; Kim, B.; Bae, H.; Lee, H.; Lee, S.; Choi, E. H.; Kim, S. J. (2015). Differential Epigenetic Effects of Atmospheric Cold Plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 10, 1-16. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0129931>

Park, S. B.; Kim, H.; Ji, H. W.; Kim, H. W.; Yun, S. H.; Choi, E. H.; Kim, S. J. (2019). Cold Atmospheric Plasma Restores Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cells by Reversing Expression of Resistance-Related Genes. *Cancers* 11, 2011-2024. <https://doi.org/10.3390/cancers11122011>.

Ren, Y.; Ren, Y.; Zhou, Z.; Guo, X.; Li, Y.; Feng, L.; Wang, L. (2010). Complete Genome Sequence of Enterobacter Cloacae Subsp. Cloacae Type Strain ATCC 13047. *J. Bacteriol.* 192, 2463–2464. <https://doi.org/10.1128/JB.00067-10>

Rödter, K., Moritz, J., Miller, V., Weltmann, K. D., Metelmann, H. R., Gandhirajan, R., Bekeschus, S. (2019). Activation of murine immune cells upon co-culture with plasma-treated B16F10 melanoma cells. *Appl Sci.* 9, 660-677. <https://doi.org/10.3390/app9040660>

Rödter, K.; Moritz, J.; Miller, V.; Weltmann, K.-D.; Metelmann, H.-R.; Gandhirajan, R.; Bekeschus, S. (2019). Activation of Murine Immune Cells upon Co-culture with Plasma-treated B16F10 Melanoma Cells. *Appl. Sci.* 9, 660-677. <https://doi.org/10.3390/app9040660>.

Rodrigues, C.; Pimpão, C.; Mósca, A. F.; Coxixo, A. S.; Lopes, D.; Da Silva, I. V.; Pedersen, P. A.; Antunes, F.; Soveral, G. (2019). Human Aquaporin-5 Facilitates Hydrogen

Peroxide Permeation Affecting Adaption to Oxidative Stress and Cancer Cell Migration. *Cancers* 11, 932-948. <https://doi.org/10.3390/cancers11070932>

Rodriguez, L. G.; Wu, X.; Guan, J. -L. (2005). Wound-Healing Assay. *Cell Migr.* 294, 23-30. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>

Rostami, R.; Mittal, S.; Rostami, P.; Tavassoli, F.; Jabbari, B. (2016). Brain metastasis in breast cancer: A comprehensive literature review. *J. Neurooncol.* 127, 407-414. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-016-2075-3>

Rozeman, E. A., Dekker, T. J. A., Haanen, J. B. A. G., Blank, C. U. (2018). Advanced melanoma: current treatment options, biomarkers, and future perspectives. *Am J Clin Dermatol.* 19, 303-317. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0325-6>

Rubio-Clemente, A.; Cardona, A.; Chica, E.; Penuela, G. A. (2017). Sensitive spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in aqueous samples from advanced oxidation processes: Evaluation of possible interferences. *Afinidad* 74, 161-168. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/328470>

Saadati, F., Mahdikia, H., Abbaszadeh, H. A., Abdollahifar, M. A., Khoramgah, M. S., Shokri, B. (2018). Comparison of direct and indirect cold atmospheric–pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. *Sci Rep.* 8, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25990-9>

Sarangapani, C.; Ziuzina, D.; Behan, P.; Boehm, D.; Gilmore, B. F.; Cullen, P. J.; Bourke, P. (2019). Degradation Kinetics of Cold Plasma-Treated Antibiotics and Their Antimicrobial Activity. *Sci. Rep.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40352-9>

Shi, X. M., Chang, Z. S., Wu, X. L., Zhang, G. J., Peng, Z. Y., Dong, Z. Y., Shao, X. J. (2013). Inactivation effect of argon atmospheric pressure low-temperature plasma jet on murine melanoma cells. *Plasma Process Polym.* 10, 808-816. <https://doi.org/10.1002/ppap.201300018>

Shi, Z.; Zhang, T.; Luo, L.; Zhao, H.; Cheng, J.; Xiang, J.; Zhao, C. (2012). Aquaporins in human breast cancer: Identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 106, 267-272. <https://doi.org/10.1002/jso.22155>.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2019). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 69, 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

Sladek, R.; Stoffels, E.; Walraven, R.; Tielbeek, P.; Koolhoven, R. A. (2004). Plasma Treatment of Dental Cavities: A Feasibility Study. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 32, 1540-1543. <https://doi.org/10.1109/TPS.2004.832636>.

Sokolov, A.; Kråkström, M.; Eklund, P.; Kronberg, L.; Louhi-Kultanen, M. (2018). Abatement of Amoxicillin and Doxycycline in Binary and Ternary Aqueous Solutions by Gas-Phase Pulsed Corona Discharge Oxidation. *Chem. Eng. J.* 334, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.071>

Soule, H. D.; Maloney, T. M.; Wolman, S. R.; Peterson, W. D., Jr.; Brenz, R.; McGrath, C. M.; Russo, J.; Pauley, R. J.; Jones, R. F.; Brooks, S. C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 60, 6075-6086.

Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. (1973). A Human Cell Line from a Pleural Effusion Derived from a Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409-1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>

Stockert, J. C.; Horobin, R. W.; Colombo, L. L.; Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* 120, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>

Subramanian, P. S. G.; Jain, A.; Shivapuji, A. M.; Sundaresan, N. R.; Dasappa, S.; Rao, L. (2020). Plasma-activated water from a dielectric barrier discharge plasma source for the selective treatment of cancer cells. *Plasma Process. Polym.* 17, 1-13. <https://doi.org/10.1002/ppap.201900260>

Suwal, S., Coronel-Aguilera, C. P., Auer, J., Applegate, B., Garner, A. L., Huang, J. T. (2019). Mechanism characterization of bacterial inactivation of atmospheric air plasma gas and activated water using bioluminescence technology. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 53, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.007>

Synnott, N.; Murray, A.; McGowan, P.; Kiely, M.; Kiely, P.; O'Donovan, N.; O'Connor, D.; Gallagher, W.; Crown, J.; Duffy, M. (2017). Mutant p53: A novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? *Int. J. Cancer* 140, 234-246. <https://doi.org/10.1002/ijc.30425>

Szili, E. J., Hong, S. H., Oh, J. S., Gaur, N., Short, R. D. (2018). Tracking the penetration of plasma reactive species in tissue models. *Trends Biotechnol.* 36, 594-602. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.012>

Tan, T. Y., Zhang, L., Neoh, S. C., Lim, C. P. (2018). Intelligent skin cancer detection using enhanced particle swarm optimization. *Knowl Based Syst.* 158, 118-135. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2018.05.042>

Tang, S.; Yuan, D.; Rao, Y.; Li, N.; Qi, J.; Cheng, T.; Sun, Z.; Gu, J.; Huang, H. (2018). Persulfate activation in gas phase surface discharge plasma for synergetic removal of antibiotic in water. *Chem. Eng. J.* 337, 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.117>

Terefinko, D.; Dzimitrowicz, A.; Bielawska-Pohl, A.; Klimczak, A.; Pohl, P.; Jamroz, P. (2021). Biological Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Skin Cancer. *Plasma Chem. Plasma Process.* 41, 507-529. <https://doi.org/10.1007/s11090-020-10150-7>

Thirumdas, R.; Kothakota, A.; Annapure, U.; Siliveru, K.; Blundell, R.; Gatt, R.; Valdramidis, V. P. (2018). Plasma Activated Water (PAW): Chemistry, Physico-Chemical Properties, Applications in Food and Agriculture. *Trends Food Sci. Technol.* 77, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.007>

Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579-591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>

Trizio, I.; Sardella, E.; Rizzi, V.; Dilecce, G.; Cosma, P.; Schmidt, M.; VonWoedtke, T.; Gristina, R.; Favia, P. (2016). Characterization of Reactive Oxygen/Nitrogen Species Produced in PBS and DMEM by Air DBD Plasma Treatments. *Plasma Med.* 6, 13-19.

Turner, N., Ware, O., Bosenberg, M. (2018). Genetics of metastasis: melanoma and other cancers. *Clin Exp. Metastasis*. 35, 379-391. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9893-y>

Van Engeland, M.; Nieland, L. J. W.; Ramaekers, F. C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)

Vermeulen, S., De Waele, J., Vanuytsel, S., De Backer, J., Van der Paal, J., Ramakers, M., Leyssens, K., Marcq, E., Van Audenaerde, J., Smits, L. J. E., Dewilde, S., Bogaerts, A. (2016). Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells. *Plasma Process Polym.* 13, 1195-1205. <https://doi.org/10.1002/ppap.201600116>

Vermeulen, S.; De Waele, J.; Vanuytsel, S.; De Backer, J.; Van Der Paal, J.; Ramakers, M.; Leyssens, K.; Marcq, E.; Van Audenaerde, J.; Smits, E. L. J. (2016). Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells. *Plasma Process. Polym.* 13, 1195-1205. <https://doi.org/10.1002/ppap.201600116>.

Vodickova, A., Schmiedberger, J. (2018). Utilization of reactive oxygen species generated by electric discharge in biomedical engineering. *Plasma Med.* 8, 147-154. <https://doi.org/10.1615/plasmamed.2018024524>

Wang, M.; Holmes, B.; Cheng, X.; Zhu, W.; Keidar, M.; Zhang, L. G. (2013). Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8, 1-11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073741>

Warleta, F.; Campos, M.; Allouche, Y.; Sánchez-Quesada, C.; Ruiz-Mora, J.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1092-1100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.031>.

Xia, J., Zeng, W., Xia, Y., Wang, B., Xu, D., Liu, D., Kong, M. G., Dong, Y. (2019). Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *J Biophotonics*. 12, 1-14. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800046>

Xiang, L., Xu, X., Zhang, S., Cai, D., Dai, X. (2018). Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 124, 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.001>

Xiang, L.; Xu, X.; Zhang, S.; Cai, D.; Dai, X. (2018). Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 124, 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.001>.

Xu, G. M., Liu, J. R., Wu, Y. M., Shi, X. M., Zhang, G. J. (2018). Low-temperature atmospheric pressure helium plasma jet damages malignant melanoma cells by inducing oxidative stress. *IEEE Trans Plasma Sci.* 46, 2805-2813. <https://doi.org/10.1109/TPS.2018.2856122>

Xu, L.; Zhang, H.; Xiong, P.; Zhu, Q.; Liao, C.; Jiang, G. (2021). Occurrence, Fate, and Risk Assessment of Typical Tetracycline Antibiotics in the Aquatic Environment: A Review. *Sci. Total Environ.* 753, 141975-141992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141975>



Yadav, D. K., Adhikari, M., Kumar, S., Ghimire, B., Han, I., Kim, M. H., Choi, E. H. (2020). Cold atmospheric plasma generated reactive species aided inhibitory effects on human melanoma cells: an in vitro and in silico study. *Sci Rep.* 10, 3396-3411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60356-0>

Yan, D., Sherman, J. H., Keidar, M. (2017). Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget.* 9, 15977-15995. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13304>

Yan, D., Xu, W., Yao, X., Lin, L., Sherman, J. H., Keidar, M. (2018). The cell activation phenomena in the cold atmospheric plasma cancer treatment. *Sci Rep.* 8, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33914-w>

Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 73, 1303-1310. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90093-G](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90093-G)

Zhang, H.; Zhang, J.; Ma, J.; Shen, J.; Lan, Y.; Liu, D.; Xia, W.-D.; Xu, D.; Cheng, C.(2020). Differential sensitivities of HeLa and MCF-7 cells at G1-, S-, G2- and M-phase of the cell cycle to cold atmospheric plasma. *J. Phys. D Appl. Phys.* 53, 1-15. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab5e2a>

Zhang, T.; Zhou, R.; Wang, P.; Mai-Prochnow, A.; McConchie, R.; Li, W.; Zhou, R.; Thompson, E. W.; Ostrikov, K. (Ken); Cullen, P. J. (2021). Degradation of Cefixime Antibiotic in Water by Atmospheric Plasma Bubbles: Performance, Degradation Pathways and Toxicity Evaluation. *Chem. Eng. J.* 421, 127730-127742. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127730>.

## 20. Życiorys naukowy

### 1 Informacje osobiste:

Imię i nazwisko : Dominik Terefinko  
Data i miejsce urodzenia: 29.07.1994,  
Telefon: +48 71 320 2815  
E-mail: dominik.terefinko@pwr.edu.pl

### 2 Wykształcenie:

#### Studia doktoranckie:

Rodzaj i miejsce studiów: Studia Doktoranckie Interdyscyplinarne w dziedzinie Nauk Chemicznych  
Politechnika Wrocławska,  
Wydział Chemiczny  
Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej

Rozprawa doktorska: *Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy*  
Promotorzy: dr hab. inż. Piotr Jamróz, prof. PWr  
prof. dr hab. Aleksandra Klimczak (IITD, PAN)

#### Studia magisterskie:

Miejsce studiów: Politechnika Wrocławska,  
Wydział Chemiczny

Kierunek kształcenia: Inżynieria Materiałowe, Zaawansowane Materiały Funkcjonalne

Rok ukończenia: 2018

Praca magisterska: *Sposób enkapsulacji nanostruktur platyny w matrycach organicznych za pomocą wyładowania jarzeniowego generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym w kontakcie z cieczą i ich zastosowanie do inaktywacji bakteryjnych fitopatogenów*

Promotor: dr hab. inż. Piotr Jamróz, prof. PWr

#### Studia inżynierskie:

Miejsce studiów: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,  
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Kierunek kształcenia: Nanotechnologia, Nanomateriały Funkcjonalne

Rok ukończenia: 2017

Praca inżynierska: *Otrzymywanie i charakteryzowanie sorbentów do CO<sub>2</sub>*

Promotor: dr hab. inż. Rafał Wróbel, prof. ZUT  
Szkoła średnia:  
Nazwa szkoły: II Liceum Ogólnokształcące im. Marii Skłodowskiej-Curie w Sanoku  
Profil: biologiczno-chemiczny  
Rok ukończenia: 2013

### **3 Dorobek naukowy**

#### **4 Artykuły i rozdziały w książkach:**

##### **I. Publikacja w czasopiśmie ujętym w bazie *Web of Science*, sumaryczny Impact Factor wyniósł 51.096, przy 11 pozycjach prowadzi do średniej wartości 4.645**

- 1) Dzimitrowicz A., Caban M., **TEREFINKO D.**, Pohl P., Jamroz P., Babinska W., Cyganowski P., Stepnowski P., Lojkowska E., Sledz W., Motyka-Pomagruk M. (2022) *Application of pulse-modulated radio-frequency atmospheric pressure glow discharge for degradation of doxycycline from a flowing liquid solution*. Scientific Reports, 12, 7354-7370. **IF=4.380, MEiN=140.**
- 2) Dzimitrowicz A., Motyka-Pomagruk A., Cyganowski P., Jamroz P., **TEREFINKO D.**, Pohl P., Klis T., Caban M. (2021) *Cold atmospheric pressure plasmas as versatile tools for effective degradation of a mixture of hazardous and endocrine disturbing compounds from liquid wastes*. Journal of Environmental Chemical Engineering, vol. 9, s. 1-11. **IF=5.909, MEiN=100.**
- 3) Cyganowski P., **TEREFINKO D.**, Jamroz P., Pohl P., Dzimitrowicz A. (2021) *Non-thermal atmospheric pressure plasma as a powerful tool for the synthesis of rhenium-based nanostructures for the catalytic hydrogenation of 4-nitrophenol*. RSC Advances, vol. 11, s. 1-9. **IF=3.361, MEiN =100.**
- 4) Motyka-Pomagruk A., Dzimitrowicz A., Orłowski J., Babinska W., **TEREFINKO D.**, Rychłowski M., Prusinski M., Pohl P., Lojkowska E., Jamroz P., Sledz W. (2021) *Implementation of a Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma for Eradication of Plant Pathogens from a Surface of Economically Important Seeds*. International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, s. 1-20. **IF=5.924, MEiN =140.**
- 5) Dzimitrowicz A.P., Jamroz P., Pohl P., Babinska W., **TEREFINKO D.**, Sledz W., Motyka-Pomagruk A. (2021) *Multivariate optimization of the FLC-dc-APGD-based reaction-*

*discharge system for continuous production of a plasma-activated liquid of defined physicochemical and anti-phytopathogenic properties.* International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, s. 1-21. **IF=5.924, MEiN =140**

- 6) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl, A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. (2021) *The influence of cold atmospheric pressure plasma-treated media on cell viability, motility, and induction of apoptosis in human non-metastatic (MCF7) and metastatic (MDA-MB-231) breast cancer cell lines.* International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, s. 1-23. **IF=5.924, MEiN =140**
- 7) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. (2021) *Biological Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Skin Cancer.* Plasma Chemistry and Plasma Processing, vol. 41, s. 507-529. **IF=2.950, MEiN =100**
- 8) Dzimitrowicz, A.P., Bielawska-Pohl A., Jamroz P., Krawczenko A., Busco G., Grillon C., Kieda C., Klimczak A., **TEREFINKO D.**, Baszczynska A., Pohl P. (2020) *Activation of the normal human skin cells by a portable dielectric barrier discharge-based reaction-discharge system of a defined gas temperature.* Plasma Chemistry and Plasma Processing, vol. 40, s. 79-97. **IF=2.950, MEiN =100**
- 9) Dzimitrowicz A.P., Motyka-Pomagruk A., Jamroz P., Lojkowska E., Babinska, W., **TEREFINKO D.**, Pohl P. (2018) *Application of silver nanostructures synthesized by cold atmospheric pressure plasma for inactivation of bacterial phytopathogens from the genera Dickeya and Pectobacterium.* Materials. vol. 11, s. 1-16. **IF=3.623, MEiN = 140**
- 10) Dzimitrowicz A.P., Cyganowski P., Pohl P., Jermakowicz-Bartkowiak D., **TEREFINKO D.**, Jamroz P. (2018) *Atmospheric pressure plasma-mediated synthesis of platinum nanoparticles stabilized by poly(vinylpyrrolidone) with application in heat management systems for internal combustion chambers.* Nanomaterials. vol.8, s. 1-15. **IF= 5.076, MEiN =100**
- 11) Dzimitrowicz A.P., Motyka-Pomagruk A., Cyganowski P., Babinska W., **TEREFINKO D.**, Jamroz P., Lojkowska E. (2018) *Antibacterial activity of fructose-stabilized silver nanoparticles produced by direct current atmospheric pressure glow discharge towards quarantine pests.* Nanomaterials. vol. 8, s. 1-16. **IF= 5.076, MEiN =100**

## II. Inne publikacje:

- 1) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz A.P., Pohl P., Jamroz P. (2018) *Zastosowanie piw dolnej fermentacji w syntezie nanostruktur metalicznych. W: Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie : praca zbiorowa.* Red. Doroty Kołodyńskiej. Lublin: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej. Wydział Chemii, s.26-28. **MEiN=80**

**Podsumowując pozycje zawarte w wykazie czasopism naukowych Ministra Edukacji i Nauki, sumaryczna ilość punktów MEiN wyniosła 1380, co przy 12 pozycjach prowadzi do średniej wartości 115.**

## III. Zgłoszenia patentowe i przyznane patenty:

- 1) Dzimitrowicz A., Motyka-Pomagruk A., Caban M., Babinska W., **TEREFINKO D.**, Sledz W., Jamroz P., Cyganowski P., Stepnowski P., Pohl P. (2022) *Sposób rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych z zastosowaniem zimnej plazmy atmosferycznej, generowanej w przepływowej szczotce plazmowej oraz szczotka plazmowa do realizacji tego sposobu.* Zgłosz. pat. nr P. 440185.
- 2) Dzimitrowicz A., Sledz W., Caban M., Jamroz P., Motyka-Pomagruk A., Cyganowski P., **TEREFINKO D.**, Stepnowski P., Pohl P. (2021) *Sposób dezaktywacji związków endokrynnie czynnych z roztworów wodnych.* Zgłosz. pat. nr P. 438832.
- 3) Dzimitrowicz A., Jamroz P., Pohl P., **TEREFINKO D.**, Motyka-Pomagruk A., Babinska W., Sledz W., Lojkowska E., Orłowski J., Prusinski M. (2021) *Sposób ochrony roślin istotnych gospodarczo, zwłaszcza roślin naczyniowych, przed patogenami bakteryjnymi.* Zgłosz. pat. nr P. 438360
- 4) Motyka-Pomagruk A., Dzimitrowicz A., Babinska W., Sledz W., Pohl P., Jamroz P., **TEREFINKO D.**, Lojkowska E. (2021) *Sposób otrzymywania preparatu do stymulacji wzrostu roślin, preparat otrzymany tym sposobem oraz zastosowanie preparatu do stymulacji wzrostu roślin, w szczególności tych istotnych gospodarczo.* Patent. Polska, nr 236377.
- 5) Dzimitrowicz A.P., Sledz W., Caban M., Jamroz P., Motyka-Pomagruk A., Babinska W., Cyganowski P., **TEREFINKO D.**, Stepnowski P., Pohl P., Lojkowska E. (2021) *Sposób dezaktywacji antybiotyków z roztworów wodnych za pomocą wyładowania jarzeniowego generowanego pod ciśnieniem atmosferycznym.* Zgłosz. pat. nr P. 437603.

## IV. Wygłoszone referaty i materiały konferencyjne:

- 1) **TEREFINKO D.**, Caban M., Jamroz P., Pohl P., Dzimitrowicz A. *Cold Atmospheric Pressure Plasma as a new route to limit multi-drug impurity in the aquatic environment*. 63. Zjazd naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź (Polska), Wrzesień 2021.
- 2) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. *The impact of direct and indirect non-thermal plasma treatment on the biological activities of human breast cancer cell lines*. Chemistry & Biotechnology International Conference ChemBiotIC: Wrocław (Poland), June 2021.
- 3) Dzimitrowicz A.P., Motyka-Pomagruk A., Cyganowski P., **TEREFINKO D.**, Klis T., Jamroz P., Caban M. *Zastosowanie nietermicznej plazmy atmosferycznej do degradacji związków endokrynnie czynnych z odpadów ciekłych*. HYDROMICRO 2021: Mikroorganizmy w środowisku wodnym – zagrożenia i nadzieje, June 2021.
- 4) **TEREFINKO D.**, Babinska W., Motyka-Pomagruk A., Caban M., Jamroz P., Sledz W., Pohl P., Lojkowska E., Dzimitrowicz A.P. *A new route towards limiting microbial multidrug resistance through utilization of cold atmospheric pressure plasma-liquid interactions*. European Federation of Biotechnology 2021 virtual conference, EFB2021: Virtual conference, May 2021.
- 5) Dzimitrowicz A.P., Motyka-Pomagruk A., Jamroz P., Babinska W., **TEREFINKO D.**, Lojkowska E., Sledz W., Pohl P. *Cold atmospheric pressure plasma generated in contact with a flowing liquid cathode - a new frontier in continuous synthesis of plasma-activated liquid*. W: 24th International Symposium on Plasma Chemistry. ISPC 2019: Naples (Italy), June 2019.
- 6) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl A., Pohl P., Grillon C., Giovanni B., Klimczak A., Jamroz P. *The He-DBD-based portable reaction-discharge system of a defined rotational temperature as a new tool in the wound healing*. LE STUDIUM Conference - International Meeting on Plasma Cosmetic Science, Orleans (France), November 2019.
- 7) Babinska W., Motyka-Pomagruk A., Dzimitrowicz A.P., Jamroz P., **TEREFINKO D.**, Lojkowska E., Pohl P., Sledz W. *Antibacterial properties of post-plasma solutions against Pectobacterium and Dickeya spp*. W: Eurobiotech 2019, 7<sup>th</sup> Central European congress of Life Sciences, Krakow (Poland), September 2019.
- 8) **TEREFINKO D.**, Dzimitrowicz, A.P., Jamroz P. *Leczenie nowotworów skóry za pomocą*

*zimnej plazmy atmosferycznej*. Konferencja Chemia Biznes Środowisko, Gdansk (Poland), Lipiec 2019.

- 9) **TEREFINKO D.**, Jamroz P. *The importance of reactive species in daily lives*. XIII Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, Wrocław (Poland), listopad 2018.
- 10) **TEREFINKO D.** *Synteza nanocząstek platyny z pomocą wyladowań jarzeniowych pod ciśnieniem atmosferycznym generowanych w kontakcie z cieczą*. XII Wrocławskiego Studenckiego Sympozjum Chemicznego, Politechnika Wrocławska, Wrocław (Poland), maj 2018.

#### **V. Działalność dydaktyczna:**

- 1) Prowadzenie zajęć z : *Podstawy chemii analitycznej, laboratorium*, 2018/2019, semestr zimowy; 2019/2020, semestr letni; 2020/2021, semestr zimowy; 2020/2021, semestr letni; 2021/2022, semestr zimowy; 2021/2022, semestr letni
- 2) Prowadzenie zajęć: *Metrologia i walidacja metod analitycznych, ćwiczenia audytoryjne*, 2018/2019, semestr letni; 2019/2020, semestr letni; 2020/2021, semestr letni;
- 3) Prowadzenie zajęć: *Analiza próbek środowiskowych i przemysłowych, laboratorium*, 2021/2022, semestr zimowy.
- 4) Prowadzenie zajęć: *Analiza śladowa i instrumentalna, laboratorium*, 2021/2022, semestr letni

#### **VI. Staże krajowe i zagraniczne:**

- 1) 16 listopada 2021 – 16 grudnia 2021 roku, Uniwersytet Florencki, Wydział Chemii „Ugo Schiff”, Florencja, Włochy
- 2) 6 stycznia 2021 – 15 czerwca 2021 roku, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław.
- 3) 1 października 2020 roku – 21 grudnia 2020 roku, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław.
- 4) 3 października 2019 roku – 27 marca 2020 roku, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław.
- 5) 15 kwietnia – 27 kwietnia 2019 roku; 04 lipiec – 12 lipiec 2019 roku, Instytut

Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław

- 6) 11 lutego – 23 lutego 2019 roku, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław.
- 7) 05 lutego – 09 lutego 2019 roku, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk.

## **VII. Warsztaty naukowe i szkolenia:**

- 1) 2 lutego – obecnie 2022 roku, *Nature Masterclasses platform, Courses for researchers to build their skills, confidence and careers*. Springer Nature.
- 2) 16 kwietnia 2021 roku, *Tutoring jako forma wsparcia rozwoju doktorantów*, Optima Centrum Rozwoju i Kształcenia Kadr, Politechnika Wrocławska.
- 3) 24, 25 listopada 2020 roku, Szkolenie z obsługi i eksploatacji analizatora węgla organicznego i azotu (TOC/TN), Analizator TOC multi N/C 2100S, Analytik Jena.
- 4) 4 listopada 2020 roku, szkolenie on-line, *Przedsiębiorczość akademicka i komercjalizacja wyników badań*. Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości i Punkt Kontaktowy ds. Transferu Technologii, Politechnika Wrocławska
- 5) 21 października 2020 roku, Szkolenie on-line z obsługi platformy internetowej SciFinder, *Analyze This - Leveraging the analytical literature using SciFinder-n and MethodsNow®*
- 6) 13 października 2020 roku, Szkolenie on-line organizowane przez Narodowe Centrum Nauki NCN, *Szkolenie dla wnioskodawców- koordynator dyscyplin, dr Marta Buchalska*, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska
- 7) 6 października 2020 roku, udział w szkoleniu on-line, *Microsoft Teams dla nauczycieli akademickich*, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska.
- 8) 30 września 2020 roku, Szkolenie on-line z obsługi platformy internetowej SciFinder, *Who Wrote That? - Searching for Authors and Organizations Using SciFinder-n*.
- 9) 29 lipca 2020 roku, *HaloTag Technology. A Single Fusion Tag for Cellular Imaging and Protein Analysis*. Promega, webinarium.
- 10) 27 lipca – 29 lipca 2020 roku, udział w warsztatach on-line *Supramolecular and Colloid Chemistry and Physics for the Life Sciences*.



- 11) 16 lipca 2020 roku, *Lumit Immunoassays: An Easier, Faster Method for Protein Detection*. Promega, webinarium.
- 12) 27 września 2019 roku, Symposium naukowym poświęconym *tematyce egzosomów pochodzenia nowotworowego*, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław, Polska.
- 13) 18 września 2019 roku, *Robotics Technology Conference robotech* organizowaną przez Wydawnictwo Trade Media International, Wrocław, Polska.
- 14) 24 maja 2019 roku, uczestnictwo w seminarium *Cell-based Assays – From Basic Principles to Distinct Applications*,. Promega, Wrocław.
- 15) 21 lutego 2019 roku, Interdyscyplinarne seminarium naukowym Politechniki Wrocławskiej – prof. Macieja Żylicza, *Mikro-ewolucja komórek nowotworowych*, Wrocław, Polska
- 16) 21 lutego 2019 roku, Symposium naukowym poświęconym *tematyce Stresu podczas ciąży a wzrastania i rozwoju potomstwa, na przykładzie skutków tropikalnego super cyklonu w Indiach*. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław, Polska.
- 17) 25 kwietnia – 28 kwietnia 2017 roku, wykłady *Supramolecular Chemistry: From Basics to Applications*, prowadzonych przez prof. Karstena Gloe, TU Dresden, Politechnika Wrocławska, Polska
- 11) 24 kwietnia – 26 kwietnia 2017 roku, *PANIC 2017, PhoBia Annual Nanophotonics International Conference*, Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska.

### **VIII. Znajomość technik badawczych**

- 1) mikroskopia elektronowa TEM i SEM, wraz z osprzętem do mikroanalizy pierwiastkowej EDX
- 2) Dynamiczne rozpraszanie światła DLS
- 3) Mikroskopia sił atomowych AFM
- 4) Mikroskopia konfokalna Ramana
- 5) Rentgenowska dyfraktometria proszkowa XRD

- 6) Rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa XPS
- 7) Analiza węgla organicznego i azotu (TOC/TN)
- 8) spektrofotometria UV/Vis
- 9) Optyczna spektroskopia emisyjna OES
- 10) Absorpcyjna spektrometria atomowa ASA
- 11) Termograwimetria TG
- 12) izotermia BET
- 13) Fluorescencyjny czytnik mikroplątek
- 14) Mikroskopia optyczna do badań biologicznych
- 15) Cytometria przepływowa FCS

#### **IX.    Udział w grantach i projektach badawczych:**

- 1) Uczestnik międzynarodowego projektu badawczego: Projekt Canaletto, PPN/BIT/2021/1/00016, *Zastosowanie zimnych plazm atmosferycznych do uzyskania i modyfikacji biopolimerowych hydrożeli i cienkich warstw*, wykonawca. Kierownicy projektu: dr hab. inż. Anna Dzimitrowicz (Politechnika Wrocławska) i Prof. Massimo Bonini (Uniwersytet Florencki). Okres realizacji projektu: 01 stycznia 2022 – 31 grudnia 2023 roku.
- 2) Doktorant, stypendysta: Projekt SONATA15, 2019/35/D/ST8/04107, *Zastosowanie zimnych plazm atmosferycznych generowanych w kontakcie z przepływającym roztworem do bezpośredniej degradacji antybiotyków oraz obniżenia oporności wielolekowej w środowisku naturalnym*, stypendysta (doktorant). Kierownicy projektu: dr hab. inż. Anna Dzimitrowicz. Okres realizacji projektu: 01 marca 2021 – 28 maja 2022 roku.
- 3) Uczestnik projektu badawczego: Projekt SONATA16, 2020/39/D/ST8/01352, *Katalityczno-separacyjne procesy uwodornienia związków nitroaromatycznych z wykorzystaniem wielofunkcyjnych nanokompozytów polimerowych z nanocząstkami renu*, wykonawca. Kierownik projektu: dr hab. inż. Piotr Cyganowski, prof. PWr. Okres realizacji projektu: 01 sierpnia 2021 – 01 sierpnia 2022.
- 4) Uczestnik projektu badawczego: *BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych*

*Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii*, nr. umowy: POWR.03.02.00-I037/16-00, wykonawca (doktorant).  
Okres realizacji projektu: 1 kwietnia 2018 – 31 marca 2023.

- 5) Uczestnik projektu badawczego: Projekt Opus 17, 2019/33/B/NZ9/00940, realizowany w Konsorcjum złożonym z Politechniki Wrocławskiej oraz Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pt. *Zbadanie antybakteryjnych właściwości roztworów post-plazmowych uzyskiwanych za pomocą zimnych plazm atmosferycznych względem ekonomicznie istotnych fitopatogenów oraz wpływu tych cieczy na wzrost roślin uprawnych*, wykonawca. Kierownicy projektu: dr Wojciech Śledź (Międzyuczelniany Uczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed) i dr hab. inż. Anna Dzimitrowicz (Politechnika Wroclawska). Okres realizacji projektu: 18 lutego 2020 roku - 18 lutego 2023 roku.
- 6) Uczestnik projektu badawczego: OPUS 7, 2015/17/N/ST4/03804, *Zminiaturyzowane wyładowania jarzeniowe pod ciśnieniem atmosferycznym generowane w kontakcie z cieczą jako nowe źródła wzbudzenia i atomizacji w analitycznej optycznej spektrometrii emisyjnej - badanie mechanizmów transportu i wzbudzenia analitów oraz charakterystyka analityczna*, wykonawca. Kierownik projektu: prof. dr hab. inż. Paweł Pohl. Okres realizacji projektu: październik 2017 - luty 2018.

#### 7) Nagrody i wyróżnienia:

- 1) Stypendium dla doktoranta, wykonawcy z projektu badawczego Sonata 15, Wrocław, 01.03.2021 – 28.05.2022
- 2) Stypendium dla doktoranta, wykonawcy z projektu badawczego BioTechNan, Wrocław, 01.10.2018-01.10.2022
- 3) Nagroda przyznawana przez podmiot zagraniczny za odbycie stażu zagranicznego „**Young Investigator Training Program (YITP) 2019**” sponsorowaną przez ACRI (Associazioni di Fondazioni e Casse di Risparmio Spa), Sesto Fiorentino, Włochy, 14.10.2021.
- 4) Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej w latach 2018/2019; 2019/2020, 2021/2022.
- 5) Stypendium dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej w latach 2018/2019, 2021/2022
- 6) Stypendium stażowe w ramach projektu BioTechNan, Wrocław, 15.11.2021.

- 7) Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej za wybitne osiągnięcia naukowe, Wrocław, 15.11.2021.
- 8) Nagroda specjalna Prezesa Urzędu Patentowego RP podczas X edycji konkursu Student-Wynalazca za patent na wynalazek pt. *Sposób otrzymywania preparatu do stymulacji wzrostu roślin, preparat otrzymywany tym sposobem oraz zastosowanie preparatu do stymulacji wzrostu roślin, w szczególności tych istotnych gospodarczo*. Kielce, luty, 2020.

#### **8) Działalność organizacyjna**

- 1) Członkostwo Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem Oddział Wrocławski, Sekcja Chemii Plazmy, luty 2021 – obecnie.
- 2) Członkostwo European Chemical Society, EuChemS, luty 2021-obecnie