

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu

Ocena skuteczności i bezpieczeństwa stosowania zimnej plazmy atmosferycznej CAP w procesie gojenia ran na modelu myszy

2. Czas trwania projektu **10 dni**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5): **leczenie ran, zimna plazma atmosferyczna (CAP), odpowiedź immunologiczna Th2**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): **badania podstawowe (A)**

- A. Badania podstawowe
- B. Badania translacyjne lub stosowane
- C. Badania mające na celu zachowanie gatunku
- D. Badania z zakresu medycyny sądowej
- E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich
- F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania
- G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego
- H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Celem projektu jest analiza efektów fizjologicznych wywoływanych w obrębie uszkodzonej skóry przez jej naświetlanie strumieniem zimnej plazmy atmosferycznej (CAP) emitowanej z nowego prototypu ołówka plazmowego (mogącego precyzyjnie kierować strumień plazmy na zmieniony chorobowo fragment skóry). Badania będą dotyczyły przede wszystkim statusu komórek lokalnie naciekających do miejsca uszkodzenia skóry jak i efektów systemicznych wobec komórek układu odporności wrodzonej i swoistej. Innym, niemniej ważnym aspektem projektu jest określenie bezpieczeństwa stosowania CAP poprzez zbadanie poziomu genotoksyczności *in vivo* erytrocytarnym testem mikrojądrowym, według naszej wiedzy będziemy jednym z pierwszych zespołów podejmujących tę kwestię. Liczne doniesienia

wskazują na potencjalne zastosowanie CAP w leczeniu ran¹, chronicznych zakażeń² i nowotworów skóry³. Dzięki proponowanym badaniom będzie możliwe lepsze poznanie efektów CAP na tempo gojenia ran i towarzyszących procesów komórkowych i molekularnych.

Doświadczenie jest zaplanowane w sposób ograniczający stres i cierpienie zwierząt. Niewielkie biopsje skóry wykonywane są w znieczuleniu, a ból ograniczony poprzez podanie leku przeciwbólowego przez dwa pierwsze dni po wykonaniu biopsji. Dzięki zachowywaniu wysokich standardów higienicznych zwierzętarni ogranicza się możliwość wtórnych zakażeń ran skóry zwierząt. Traktowanie CAP lub substancją referencyjną odbywać się będzie w ciągu krótkiego czasu unieruchomienia zwierzęcia.

Klasyfikacja celu procedury lub procedur planowanych do wykonania w ramach doświadczenia zgodnie z rozporządzeniem:

badania podstawowe [PB11]:

- kategoria obejmująca wiele układów.

Piśmiennictwo:

1. Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Exp Dermatol*. 2017 Feb;26(2):156-162. doi: 10.1111/exd.13156. PubMed PMID: 27492871.
2. Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. *Arch Biochem Biophys*. 2016 Sep 1;605:76-85. doi:10.1016/j.abb.2016.03.033. Epub 2016 Apr 1. PubMed PMID: 27046340.
3. Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther*. 2016 Jun;33(6):894-909. doi: 10.1007/s12325-016-0338-1. Epub 2016 May 3. Review. Erratum in: *Adv Ther*. 2016 Nov 25;:. PubMed PMID: 27142848; PubMed Central PMCID: PMC4920838.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Do doświadczenia wybrano myszy (samice) szczepu Balb/c w liczbie 30 sztuk.

Zaplanowano testy na grupach po 10 osobników w danej kategorii, co jest minimalną liczbą, która pozwoli osiągnąć wyniki o zakładanej istotności statystycznej:

1. Grupa kontrolna myszy (10 osobników), nietraktowanych

2. Grupa referencyjna myszy (10 osobników), traktowanych lekiem do dezynfekcji ran
3. Grupa badanych myszy (10 osobników), traktowanych strumieniem CAP

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO; PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR).

Wykorzystano słowa kluczowe: CAP, cold atmospheric plasma and wound healing, non-thermal atmospheric plasma and wound healing.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

- zimna plazma atmosferyczna (CAP) wpływa korzystnie na proces mikrowaskularyzacji ran^{1-4,11} oraz proliferacji keratynocytów^{13,14}
- CAP wydaje się aktywować mechanizmy regeneracji skóry zakonserwowane u ludzi i myszy^{6-7,12,15-19}
- skuteczność traktowania ran za pomocą CAP jest zależna od składu użytych gazów oraz długości naświetlania ran^{5, 10,17, 20}
- CAP można stosować do pobudzania aktywności przeciwnowotworowej w przypadku raków skóry⁸ oraz wywoływać efekt przeciwbakteryjny w chronicznych zakażeniach ran^{9,21}

B. Brak jest danych dotyczących:

- wpływu CAP na pobudzenie odpowiedzi immunologicznej Th2 związanej z zabliznianiem ran
- wpływu CAP na pobudzenie ekspresji cząsteczek YM1, Relm- α , arginazy na makrofagach obecnych w skórze
- specyficznego składu oraz natężenia wiązki plazmy generowanej przez badany „ołówkę plazmowy” na szybkość gojenia ran

Planuje się wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt potrzebnych do otrzymania założonej w projekcie siły wnioskowania statystycznego, przy założeniu niskiej zmienności międzyosobniczej w odpowiedzi na zastosowane bodźce. Doświadczenie będzie przeprowadzane z wykorzystaniem 10 osobników w grupie. Jest to według naszej wiedzy i w oparciu o dane literaturowe liczba minimalna, lecz wystarczająca do planowanego zadania²²

Zastąpienie użycia modelu zwierzęcego poprzez stosowanie modeli *in vitro* w proponowanym projekcie jest niemożliwe przy obecnym stanie wiedzy. Proponowane doświadczenie zostało poprzedzone badaniami *in vitro*, których wyniki wskazują na korzystne pobudzenie aktywności proliferacyjnej komórek nabłonkowych eksponowanych na zimną plazmę atmosferyczną. Te wyniki muszą być jednak potwierdzone *in vivo* w kontekście

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

zarówno skuteczności, ale i bezpieczeństwa stosowania (tj. ewentualnych efektów genotoksycznych powstałych po ekspozycji skóry na promieniowanie i reaktywne formy tlenu i azotu).

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach zapewniających dobrostan. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie ograniczyć ból i cierpienie poprzez stosowanie leków przeciwbólowych przez dwa dni po wykonaniu biopsji skóry. W przypadku wystąpienia nieprzewidywalnych na tym etapie doświadczenia, niekorzystnych dla dobrostanu zwierząt konsekwencji wykonania ran skórnych (np. widocznych objawów zakażeń bakteryjnych ran, wydzieliny ropnej z miejsca uszkodzenia skóry) lub w efekcie zastosowania plazmy atmosferycznej, doświadczenie będzie przerwane, a myszy poddane eutanazji.

Bibliografia:

1. Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff AK, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *J Dermatol Sci.* 2018 Feb;89(2):181-190. doi:10.1016/j.jdermsci.2017.11.008. Epub 2017 Nov 26. PubMed PMID: 29191392.
2. Borchardt T, Ernst J, Helmke A, Tanyeli M, Schilling AF, Felmerer G, Viöl W. Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment. *Microcirculation.* 2017 Nov;24(8). doi: 10.1111/micc.12399. PubMed PMID: 28857373; PubMed Central PMCID: PMC6084368.
3. Hartwig S, Preissner S, Voss JO, Hertel M, Doll C, Waluga R, Raguse JD. The feasibility of cold atmospheric plasma in the treatment of complicated wounds in cranio-maxillo-facial surgery. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017 Oct;45(10):1724-1730. doi: 10.1016/j.jcms.2017.07.008. Epub 2017 Jul 27. PubMed PMID: 28843407.
4. Kramer A, Conway BR, Meissner K, Scholz F, Rauch BH, Moroder A, Ehlers A, Meixner AJ, Heidecke CD, Partecke LI, Kietzmann M, Assadian O. Cold atmospheric pressure plasma for treatment of chronic wounds: drug or medical device? *J Wound Care.* 2017 Aug 2;26(8):470-475. doi: 10.12968/jowc.2017.26.8.470. PubMed PMID: 28795892.
5. Schmidt A, Bekeschus S, Jablonowski H, Barton A, Weltmann KD, Wende K. Role of Ambient Gas Composition on Cold Physical Plasma-Elicited Cell Signaling in Keratinocytes. *Biophys J.* 2017 Jun 6;112(11):2397-2407. doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.030. PubMed PMID: 28591612; PubMed Central PMCID: PMC5474686.
6. Hartwig S, Doll C, Voss JO, Hertel M, Preissner S, Raguse JD. Treatment of Wound Healing Disorders of Radial Forearm Free Flap Donor Sites Using Cold Atmospheric Plasma: A Proof of Concept. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Feb;75(2):429-435. doi: 10.1016/j.joms.2016.08.011. Epub 2016 Aug 24. PubMed PMID: 27637776.
7. Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Exp Dermatol.* 2017 Feb;26(2):156-162. doi: 10.1111/exd.13156. PubMed PMID: 27492871.
8. Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther.* 2016 Jun;33(6):894-909. doi: 10.1007/s12325-016-0338-1. Epub 2016 May 3. Review. Erratum in: *Adv Ther.* 2016 Nov 25;.. PubMed PMID: 27142848; PubMed Central PMCID: PMC4920838.
9. Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Sep 1;605:76-85. doi:10.1016/j.abb.2016.03.033. Epub 2016 Apr 1. PubMed PMID: 27046340.
10. Kisch T, Schleusser S, Helmke A, Mauss KL, Wenzel ET, Hasemann B, Mailaender P, Kraemer R. The repetitive use of non-thermal dielectric barrier discharge plasma boosts cutaneous microcirculatory effects. *Microvasc Res.* 2016 Jul;106:8-13. doi: 10.1016/j.mvr.2016.02.008. Epub 2016 Mar 2. PubMed PMID:26944583.
11. Kisch T, Helmke A, Schleusser S, Song J, Liodaki E, Stang FH, Mailaender P, Kraemer R. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): Results of a controlled, prospective cohort study. *Microvasc Res.* 2016 Mar;104:55-62. doi: 10.1016/j.mvr.2015.12.002. Epub 2015 Dec 3. PubMed PMID: 26655582.
12. Xu GM, Shi XM, Cai JF, Chen SL, Li P, Yao CW, Chang ZS, Zhang GJ. Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice. *Wound Repair Regen.* 2015 Nov-Dec;23(6):878-84. doi: 10.1111/wrr.12364. PubMed PMID: 26342154.

13. Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, Masur K. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol*. 2016 Mar;41(2):202-9. doi: 10.1111/ced.12735. Epub 2015 Jul 15. PubMed PMID: 26175125.
14. Kartaschew K, Mischo M, Baldus S, Bründermann E, Awakowicz P, Havenith M. Unraveling the interactions between cold atmospheric plasma and skin-components with vibrational microspectroscopy. *Biointerphases*. 2015 Jun 6;10(2):029516. doi:10.1116/1.4919610. PubMed PMID: 25947390.
15. Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Li YF, Morfill GE, Bosserhoff AK, Karrer S. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on β -defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2015 Mar 13;10(3):e0120041. doi:10.1371/journal.pone.0120041. eCollection 2015. PubMed PMID: 25768736; PubMed Central PMCID: PMC4359157.
16. Salehi S, Shokri A, Khani MR, Bigdeli M, Shokri B. Investigating effects of atmospheric-pressure plasma on the process of wound healing. *Biointerphases*. 2015 Jun 10;10(2):029504. doi: 10.1116/1.4914377. PubMed PMID: 25758659.
17. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014 Nov;22(6):477-90. doi: 10.4062/biomolther.2014.105. Epub 2014 Nov Review. PubMed PMID: 25489414; PubMed Central PMCID: PMC4256026.
18. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013 Nov 12;8(11):e79325. doi: 10.1371/journal.pone.0079325. eCollection 2013. PubMed PMID: 24265766; PubMed Central PMCID: PMC3825691.
19. Heinlin J, Zimmermann JL, Zeman F, Bunk W, Isbary G, Landthaler M, Maisch T, Monetti R, Morfill G, Shimizu T, Steinbauer J, Stolz W, Karrer S. Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen*. 2013 Nov-Dec;21(6):800-7. doi: 10.1111/wrr.12078. Epub 2013 Aug 12. PubMed PMID: 23937657.
20. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, Monetti R, Steffes B, Bunk W, Li Y, Klaempfl T, Karrer S, Landthaler M, Stolz W. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2012 Aug;167(2):404-10. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10923.x. Epub 2012 Jul 10. PubMed PMID: 22385038.
21. Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, Zimmermann JL, Pompl R, Stolz W. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*. 2010 Jul;163(1):78-82. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09744.x. Epub 2010 Mar 5. PubMed PMID: 20222930.
22. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample Size Determination. *Ilar Journal*. 2002;43(4):207-213.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☒ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.