

POTENCIÁLNE VYUŽITIE NÍZKOTEPLOTNEJ PLAZMY V ONKOTERAPII

STANISLAV KYZEK^a, FILIP UHRIN^a,
 ĽUDMILA HOLUBOVÁ^a, JULIANA
 TOMEKOVÁ^b, IVANA ĎUROVCOVÁ^a, JANA
 ŠPAČKOVÁ^a, ANDREA ŠEVČOVIČOVÁ^a
 a ELIŠKA GÁLOVÁ^a

^a Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, ^b Katedra experimentálnej fyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava
 eliska.galova@uniba.sk

Došlo 19.10.18, prepracované 1.3.19, prijaté 4.3.19.

Kľúčové slová: nízkoteplotná plazma, onkoterapia, nádorové bunky, imunoterapia

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika plazmy a kritériá jej klasifikácie
3. Využitie plazmy v medicíne
 - 3.1. Generátory nízkoteplotnej plazmy používané v medicíne
 - 3.2. Biologické účinky nízkoteplotnej plazmy
4. Nízkoteplotná plazma v onkoterapii
 - 4.1. Vplyv nízkoteplotnej plazmy na rakovinové bunky
 - 4.2. Antitumorový účinok média ošetreného nízkoteplotnou plazmou
 - 4.3. Využitie živočíšnych modelov pri skúmaní tumorinhibičného účinku nízkoteplotnej plazmy
 - 4.4. Nízkoteplotná plazma v nádorovej imunoterapii
5. Záver

1. Úvod

Vo fyzikálnych a chemických vedách termín plazma označuje štvrté skupenstvo hmoty, zatiaľ čo v medicíne a biológii je tento pojem známy ako tekutá zložka krvi. Tento termín zaviedol vo fyzike Irving Langmuir, ktorému ionizovaný plyn pripomínal niektorými svojimi vlastnosťami práve krvnú plazmu. Nízkoteplotná plazma sa začala v medicíne a biológii využívať až v posledných desaťro-

čiach, čo viedlo k vytvoreniu novej oblasti medicíny – plazmovej medicíny. Okrem využitia jej dekontaminačných účinkov má plazma potenciál aplikácie aj v dermatológii, v stomatológii, ale jednou z najperspektívnejších možností jej využitia v medicíne je liečba niektorých onkologických ochorení.

2. Charakteristika plazmy a kritériá jej klasifikácie

Hoci sa plazma začala v biologických experimentoch používať až v posledných desaťročiach, vo fyzike sa používa takmer jedno storočie. Termínom plazma označil Irving Langmuir vnútornú časť elektrického oblúka, na ktorú nemali vplyv steny a elektródy výbojky. Dnes sa plazma považuje za štvrté skupenstvo hmoty a tvorí ju množstvo rozličných častíc, ktoré sú v neustálej interakcii. Medzi tieto častice patria fotóny, elektróny, ióny, atómy, excitované a neexcitované molekuly či radikály, vrátane reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (ROS a RNS). Plazma teda predstavuje kvázi-neutrálny ionizovaný plyn. Na rozdiel od plynu však obsahuje aj voľné elektrické náboje, a preto je elektricky vodivá. Práve táto vlastnosť plazmy ju predurčuje na rôzne aplikácie¹.

Všeobecne sa plazma rozdeľuje podľa rôznych kritérií. Na základe fyzikálnych vlastností plazmy je možné klasifikovať plazmu na slabu alebo silne ionizovanú. Ak však za hlavný klasifikačný faktor považujeme strednú energiu častíc v plazme, rozlišujeme plazmu na nízkoteplotnú a vysokoteplotnú. Z praktického hľadiska považujeme plazmu za vysokoteplotnú, ak je stredná energia nabitých častíc vyššia ako 100 eV, čomu prislúcha teplota väčšia ako 1 MK. Za nízkoteplotnú plazmu považujeme plazmu, ktorej stredná energia nabitých častíc je nižšia ako 100 eV, napriek tomu však môže teplota, ktorá takejto plazme prislúcha, dosiahnuť 10⁵ K (cit.¹).

3. Využitie plazmy v medicíne

Plazmový výskum v oblasti biológie je zameraný najmä na potravinárstvo, poľnohospodárstvo a medicínu. Využitie nízkoteplotnej plazmy v medicíne patrí medzi najperspektívnejšiu biologickú aplikáciu plazmy. Plazmová medicína predstavuje novú oblasť medicínskeho výskumu na rozhraní fyziky plazmy a vied o živej prírode. Hoci zavedené elektro-chirurgické techniky, akou je napr. koagulácia pomocou argónovej plazmy, sú založené najmä na deštruktívnych účinkoch plazmy na biologický materiál, aktuálny výskum v plazmovej medicíne sa zameriava hlav-

ne na selektívne, neletálne a stimulačné účinky plazmy na živé bunky a tkanivá².

3.1. Generátory nízko-teplotnej plazmy používané v medicíne

V posledných rokoch sa venuje veľká pozornosť generátorom nízko-teplotnej plazmy, v dôsledku čoho sa vyvinuli dva základné typy plazmových prístrojov, ktoré sa používajú vo výskume, ale aj pri praktických aplikáciách v plazmovej medicíne³. Prvým sú dielektrické bariérové výboje (Dielectric Barrier Discharges, DBD), v ktorých sa plazma generuje zvyčajne vo vzduchu, ako pracovnom plyne, v medzere medzi izolovanými dielektrickými vysokonapäťovými elektródami a ošetrovaným tkanivom, ktoré slúži ako protielektróda. Druhým typom plazmových prístrojov sú plazmové „jety“ pracujúce pri atmosférickom tlaku (Atmospheric Pressure Plasma Jets, APPJ), ktoré pozostávajú z trysky vybavenej jednou alebo dvomi elektródami. Plazma je teda generovaná vo vnútri trysky a transportovaná von priamo k objektu, ktorý má byť ošetrovaný. Plazmové „jety“ sa môžu líšiť konfiguráciou elektród, pracovným plynom a elektrickými parametrami aplikácie⁴.

Z praktického hľadiska majú oba koncepty svoje výhody aj nevýhody. Pokrytie väčšej plochy ošetrovania je jednoduchšie s DBD, APPJ sú však vhodnejšie na presné bodové ošetrovania. Veľkou výhodou DBD je, že zvyčajne využíva atmosférický vzduch a pri aplikácii nepotrebuje žiadne prídavné zariadenia dodávajúce selektívne plyny. Plazmové „jety“, ktoré využívajú selektívne pracovné plyny, však generujú plazmu v presne definovanom prostredí⁵.

3.2. Biologické účinky nízko-teplotnej plazmy

V začiatkoch plazmovej medicíny sa výskum zamerával najmä na štúdium účinkov nízko-teplotnej plazmy aplikovanej na mikroorganizmy a cicavčie bunky v podmienkach *in vitro*^{3,6}. Medzi efekty, ktoré sú veľmi užitočné hlavne pre medicínu, patrí najmä potenciál plazmy inaktivovať široké spektrum mikroorganizmov vrátane tých, ktoré sú viacnásobne rezistentné na liečivá a podporovať regeneráciu tkanív a hojenie rán^{7,8}. Okrem toho sa ukázalo, že v rakovinových bunkách môže byť spustená programovaná bunková smrť (apoptóza) pri vyšších expozičných časoch ošetrovania nízko-teplotnou plazmou, čo otvára ďalšie možnosti jej aplikácie v onkológii⁹.

Na základe aktuálneho stavu poznatkov sú biologické účinky nízko-teplotnej plazmy založené na dvoch hlavných princípoch. Prvým princípom je, že biologické účinky plazmy sú spojené so zmenami vnútorného prostredia buniek indukovanými plazmou. Druhým je, že ROS a RNS, ktoré sa tvoria v plazme a dostávajú sa do kvapaliny, hrajú dominantnú úlohu v biologických odpovediach indukovaných plazmou. Ostatné komponenty plazmy, ako sú UV žiarenie alebo elektrické pole či prúd, sú považované za sekundárne zložky plazmy. UV žiarenie má navyše len

slabé alebo žiadne priame biologické účinky, pretože plazmové zdroje vhodné na medicínske aplikácie sú dizajnované tak, aby sa eliminoval efekt UV žiarenia. Do úvahy je však potrebné vziať podpornú úlohu UV žiarenia pri tvorbe reaktívnych foriem kyslíka a dusíka fotochemickou reakciou⁶.

4. Nízko-teplotná plazma v onkoterapii

V minulosti bol zaznamenaný obrovský pokrok v systémových terapiách pri liečbe rakoviny, ktoré viedli k zvýšenej miere prežitia, dlhodobej remisii a dokonca aj k vyliečeniu niektorých nádorových ochorení¹⁰. Účinnosť terapie sa zvýšila v kombinácii s liečbou zameranou na chirurgické odstránenie nádoru alebo rádioterapiu¹¹. Pri použití chemoterapeutík je problémom, že tie okrem nádorových buniek poškodzujú aj nenádorové. Zdravé tkanivo je však schopné toto poškodenie opraviť, čo umožňuje pokračovanie v liečbe pacienta¹². Vzhľadom na to, že značné množstvo pacientov neodpovedá na existujúce typy liečby alebo trpí relapsom ochorenia, pokračuje hľadanie nových prístupov k liečbe rakoviny. Kľúčovou úlohou však stále ostáva minimalizovanie vedľajších účinkov pri súčasnom maximalizovaní účinnosti cytotoxických agensov aplikovaných na rakovinové bunky, čo môže vyriešiť práve použitie nízko-teplotnej plazmy¹³.

4.1. Vplyv nízko-teplotnej plazmy na rakovinové bunky

Účinky plazmy na cicavčie bunky boli prvýkrát zaznamenané v roku 2004, keď Kieft a spol.¹⁴ sledovali inhibíciu bunkovej adhézie, čo malo za následok indukciu bunkovej smrti – apoptózy. Odvtedy bola apoptická bunková smrť indukovaná plazmou pomocou DBD pozorovaná nielen na normálnych bunkách, akými sú fibroblasty a epitelové bunky mliečnej žľazy, ale aj na rôznych typoch rakovinových buniek, ako sú bunky mozgového tumoru, kolorektálne, kožné, pľúcne a pankreatické rakovinové bunky a rakovinové bunky vaječníkov^{15,16}.

Pri ošetrovaní nádorového tkaniva plazmou je dôležité, aby sa jej antitumorový účinok selektívne prejavil len u rakovinových buniek. Niektoré štúdie naznačujú, že plazma, na rozdiel od doteraz používaných protinádorových liečiv, dokáže selektívne inhibovať bunkovú proliferáciu v nádorových bunkách alebo v nich indukovať apoptózu vo vyššej miere v porovnaní s normálnymi bunkami. Viacerí autori pozorovali selektívnu toxicitu plazmy generovanú pomocou DBD alebo APPJ na nádorových bunkách, pričom porovnávali rakovinové bunky pľúc s normálnymi bunkami (embryonálnymi fibroblastmi a pľúcnymi epitelovými bunkami)¹⁶, bunky melanómu s normálnymi kožnými keratinocytmi¹⁷, bunky gliómu (typ mozgového tumoru) so zdravými astrocytmi¹⁸ alebo nádorové bunky vaječníkov s normálnymi fibroblastmi¹⁹.

Predpokladá sa, že zásadný rozdiel v citlivosti nádorových a normálnych nenádorových buniek by mohol

byť podmienený kontaktnou inhibíciou charakteristickou pre normálne bunky, pri ktorej sa proliferatívny signál vypne. Naopak, pri nádorových bunkách tento kontrolný systém nefunguje, a preto sa neustále delia. Je možné, že práve prítomnosť týchto rozdielov v proliferatívnej aktivite a v kontrolnom systéme apoptózy nádorových a nenádorových buniek, ovplyvňuje zmeny v ich senzitivite na ošetrovanie plazmou¹⁸. Okrem neobmedzeného množenia existujú aj ďalšie bunkové vlastnosti používané ako indikátory malignej transformácie buniek. Je to napríklad schopnosť vniknúť do okolitého tkaniva (invazivnosť), schopnosť tvoriť metastázy (pohyblivosť) a schopnosť pevne priľnúť k okolitým bunkám a formovať metastatické lézie (adhezivnosť). Práve ošetrovanie plazmou môže znížiť invazivnosť nádorových buniek, mechanizmus tohto javu však nie je v súčasnosti dostatočne objasnený^{20,21}.

4.2. Antitumorový účinok média ošetrovaného nízkoteplotnou plazmou

Rakovina vaječníkov je jedným z typov rakoviny s najhoršou prognózou medzi gynekologickými malignými tumormi, pričom v mnohých prípadoch progresívnej rakoviny vaječníkov sa vyskytuje rezistencia na liečivá. Výskumníci z Nagoya University preto vyvinuli originálny prístup, keď pomocou plazmového generátoru, ktorý bol založený na DBD, ožiarili médium potrebné pre kultiváciu nádorových buniek. Po pridaní ošetrovaného média k nádorovým bunkám vaječníkov pozorovali jeho selektívny antitumorový účinok, pričom pre normálne peritoneálne mezoteliálne bunky nachádzajúce sa v okolí nádorových buniek vaječníkov bolo menej toxické. Autori navyše pozorovali signály redukčných produktov indukovaných ROS a RNS v nádorových bunkách vaječníkov, ktoré boli vystavené médiu ožiarenému plazmou. To naznačuje, že príčinou eliminácie nádorových buniek je indukcia apoptózy spôsobená zvýšenou produkciou intracelulárnych ROS a RNS. Inhibičný účinok média ošetrovaného plazmou bol pozorovaný aj pri nádorových bunkách vaječníkov, ktoré boli rezistentné na liečivá. Práve preto je táto liečebná metóda perspektívnejšia aj pri liečbe nádorov rezistentných na protirakovinové liečivá, ktoré navyše nie je možné ošetriť plazmou priamo²².

4.3. Využitie živočíšnych modelov pri skúmaní tumor-inhibičného účinku nízkoteplotnej plazmy

Predtým, ako sa nízkoteplotná plazma môže využiť v klinickej praxi, je potrebné otestovať jej účinky na živočíšnych modeloch. Dosiaľ však bolo zrealizovaných len niekoľko štúdií zameraných na sledovanie tumor-inhibičných účinkov plazmy na živočíšnych modeloch.

Dnes už je známych niekoľko štúdií, v ktorých sa potvrdil pozitívny účinok plazmy na elimináciu nádorových buniek aj na myšacom modeli. Pomocou ošetrovania plazmou s DBD sa podarilo inhibovať rast mozgového nádoru a nádoru močového mechúra myši, čo v oboch prípadoch viedlo k predĺženému času prežívania

u ošetrovanej skupiny v porovnaní s kontrolnou skupinou^{23,24}. V ďalšej štúdií sa podarilo redukovať hmotnosť nádoru pankreasu myši pri kombinovanom účinku plazmy generovanej pomocou DBD a protinádorového liečiva gemcitabínu v porovnaní so samotným gemcitabínom¹⁵. Pomocou plazmového ošetrovania s DBD sa navyše na myšacom modeli podarilo zredukovať hmotnosť subkutánneho tumoru, ktorý bol tvorený bunkami rezistentnými na liečivá²². Je teda vysoký predpoklad, že ošetrovanie povrchových tumorov, prítomných na tele alebo na povrchu telových dutín, bude v budúcnosti možné prostredníctvom plazmy aj u človeka.

4.4. Nízkoteplotná plazma v nádorovej imunoterapii

Imunoterapia je terapia, ktorá využíva zložky vlastného imunitného systému pacienta. Nádorová imunoterapia je sľubný liečebný prístup, pri ktorom sú ochranné účinky vlastného imunitného systému pacienta využívané na špecifické zacielenie na nádorové bunky bez negatívneho vplyvu na nenádorové bunky²⁵. Za normálnych podmienok, bunky imunitného systému identifikujú a zničia mutované bunky skôr, ako vytvoria v tele nádor. Medzi identifikované kľúčové bunky protinádorovej imunitnej odpovede patria antigén prezentujúce bunky (APC), T-bunky a NK (Natural Killer) bunky²⁶. Pri hromadení viacerých mutácií sa však niektoré poškodené bunky stávajú pre imunitné bunky „neviditeľné“ a postupne sa množia, až kým nevytvoria nádor. Takéto bunky navyše aktívne potlačujú aktivitu imunitných buniek prostredníctvom mechanizmov, ktoré stále nie sú úplne vysvetlené²⁷. Cieľom imunoterapie je obnoviť imunitné odpovede, ktoré vedú k potlačeniu rakoviny prostredníctvom procesov prirodzených pre ľudské telo. Tento účinok je systémový a špecifický voči nádoru, proti ktorému bol iniciovaný. To, že imunitné bunky môžu participovať pri liečbe rakoviny pomocou plazmy, naznačujú viaceré práce, v ktorých boli ako modelové organizmy použité myši s rozličnými typmi nádorov, ako sú pankreatické nádory, gliómy alebo nádory vaječníkov^{9,15,22}.

V súčasnosti sa imuno-onkológovia zameriavajú na indukciu imunogénnej bunkovej smrti (ICD, Immunogenic Cell Death) v nádoroch s využitím plazmy, čím by sa potenciálne mohla zlepšiť viditeľnosť nádorových buniek (imunogénov) v procese imunitnej reakcie^{16,28,29}. Keď bunky podstupujú takúto smrť, komunikujú s bunkami imunitného systému pomocou tzv. DAMP (Damage Associated Molecular Patterns). Medzi DAMP patria aktívne sekretované molekuly, akými sú ATP alebo HMGB1 proteíny (High Mobility Group Box 1). Iné DAMP, akými sú kalretikulín alebo HSP90, sú mobilizované presunom zvnútra bunky na vonkajší povrch bunkovej membrány, alebo sú sekretované von z bunky³⁰. Molekuly ATP potom fungujú ako tzv. „find me“ signály a kalretikulín ako tzv. „eat me“ signál pre imunitné bunky. Výsledky niektorých štúdií naznačujú, že práve ošetrovanie plazmou pomocou DBD počas niekoľkých nanosekúnd spôsobuje pri určitých režimoch sekreciu ATP a externalizáciu kalretikulínu, ktoré sú

dôležitým iniciačným krokom pre aktiváciu ICD (cit.³¹).

Extracelulárne ATP teda iniciujú prípravu APC, napr. makrofágov a dendritických buniek, na potenciálne nebezpečenstvo v ich blízkosti³². Hneď, ako sa tieto bunky priblížia k sekretovaným DAMP a na povrchu cieľových buniek sa dostanú do kontaktu s kalretikulínom, začnú takéto cieľové bunky fagocytovať a rozložia ich na malé fragmenty, ktoré fungujú ako antigény³³. Toto je kľúčový iniciačný krok pri tvorbe špecifickej imunitnej odpovede. APC, ktoré so sebou nesú aj antigény v podobe fragmentov buniek, migrujú do orgánov imunitného systému, najmä do lokálnych lymfatických uzlín a sleziny. Tu sa dostanú do kontaktu s T-bunkami, t.j. bunkami zodpovednými za vysoko špecializované odpovede, a stimulujú ich delenie. Tieto bunky potom migrujú pomocou obehového a lymfatického systému a hľadajú cieľové nádorové bunky, ktoré po nájdení zničia³⁴. Je dôležité, že tieto cieľové nádorové bunky môžu, ale nemusia byť prítomné v iniciačnom mieste ošetrovania plazmou pre ICD. To znamená, že akékoľvek metastatické alebo novovzniknuté nádory budú odstránené, ak majú rovnaký antigénový motív. Ďalším dôležitým aspektom takejto špecifickej imunitnej odpovede je produkcia malého množstva pamäťových T-buniek. Tie fungujú ako obrana voči nádoru pri relapse ochorenia v budúcnosti. Indukcia ICD je teda lepšou voľbou pre úspešný klinický výsledok, pretože ochrana trvá dlhšie ako len počas liečby, ako naznačujú niektoré štúdie^{11,35}.

Je známe, že okrem nádorových buniek obsahuje mikroprostredie nádoru aj makrofágy a iné APC, ktoré však namiesto eliminácie nádoru pomáhajú jeho rastu³⁶. Pre efektívnu imunoterapiu je ideálne, aby bolo možné navodiť ICD a zvrátiť alebo prekonať túto imunosupresiu obnovením imunitnej funkcie. Práve plazma ponúka jedinečné riešenie, ktoré žiadny už existujúci spôsob liečby zatiaľ nemá.

5. Záver

Plazma patrí medzi faktory, ktoré spôsobujú oxidačný stres, pretože je zmesou reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (ROS a RNS). Okrem toho obsahuje nabité častice či neutrálne atómy. Nízkoteplotná plazma predstavuje ionizovaný plyn, ktorého potenciálne využitie sa vo viacerých oblastiach medicíny neustále zvyšuje. Plazma sa v posledných rokoch začína aplikovať pri liečbe rán, keďže je schopná urýchliť zrážanie krvi a zefektívniť tak liečbu poranení. Predovšetkým však môže nájsť využitie v onkoterapii. Plazma dokáže selektívne eliminovať nádorové bunky bez poškodenia zdravých tkanív a pri tomto procese aktivuje organizmu vlastné obranné bunky. Túto vlastnosť plazmy je možné použiť pri nádorovej imunoterapii. Veľkou výzvou imunoterapie pomocou nízkoteplotnej plazmy je liečba nádorových ochorení, ktoré sa nenachádzajú na povrchu. Problémom je totiž hĺbka penetrácie plazmy. Jednou z možností, ako dostať zložky plazmy do tkanív vo väčších hĺbkach, je využitie kvapalín aktivova-

ných plazmou. Pomocou *in vitro* experimentov sa zistil pozitívny efekt takýchto kvapalín na likvidáciu chemorezistentných nádorových buniek. Mechanizmus, ktorý vedie k takejto selektivitě, však stále nie je dostatočne objasnený, a preto je potrebný ďalší výskum.

Táto práca bola finančne podporená grantmi APVV-16-0216 a VEGA 1/0410/18.

LITERATÚRA

- Martišoviš V.: *Základy fyziky plazmy*. Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava 2004.
- Von Woedtke T., Reuter S., Masur K., Weltmann K.-D.: *Phys. Rep.* **530**, 291 (2013).
- Von Woedtke T., Metelmann H.-R., Weltmann K.-D.: *Contrib. Plasm. Phys.* **54**, 104 (2014).
- Winter J., Brandenburg R., Weltmann K.-D.: *Plasma Sources Sci. Technol.* **24**, 1 (2015).
- Weltmann K.-D., von Woedtke T.: *Plasma Phys. Controlled Fusion* **59**, 1 (2017).
- Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Shekter A. B., Vasilets V. N., Fridman A.: *Plasma Processes Polym.* **5**, 503 (2008).
- Napp M., Daeschlein G., von Podewils S., Hinz P., Emmert S., Haase H., Spitzmueller R., Gümbel D., Kasch R., Jünger M.: *Infection* **44**, 531 (2016).
- Hasse S., Tran T., Hahn O., Kindler S., Metelmann H.-R., von Woedtke T., Masur K.: *Clin. Exp. Dermatol.* **41**, 202 (2015).
- Partecke L. I. a 16 spoluautorov: *BMC Cancer* **12**, 473 (2012).
- Makkouk A., Weiner G. J.: *Cancer Res.* **75**, 5 (2015).
- Witek M., Blomain E. S., Magee M. S., Xiang B., Waldam S. A., Snook A. E.: *Int. J. Radiat. Oncol.* **88**, 1188 (2014).
- Sun C., Bodurka D. C., Weaver C. B., Rasu R., Wolf J. K., Bevers M. W., Smith J. A., Wharton J. T., Rubenstein E. B.: *Support. Care Cancer* **13**, 219 (2005).
- Miller V., Lin A., Fridman A.: *Plasma Chem. Plasma Process.* **36**, 259 (2016).
- Kieft I. E., Broers J. L., Caubet-Hilloutou V., Slaaf D. W., Ramaekers F. C., Stoffels E.: *Bioelectromagnetics* **25**, 362 (2004).
- Brullé L., Vandamme M., Ries D., Martel E., Robert E., Lerondel S., Trichet V., Richard S., Pouvesle J. M., Pape A. L.: *PLoS One* **7**, 1 (2012).
- Pannongom K., Baik K. Y., Nam M. K., Han J. H., Rhim H., Choi E. H.: *Cell Death Dis.* **4**, 1 (2013).
- Zucker S. N., Zirnheld J., Bagati A., Di Santo T. M., Soye B. D., Wawrzyniak J. A., Etemadi K., Nikiforov M., Berezney R.: *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1299 (2012).
- Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Nakamura K., Kajiyama H., Kano H., Kikkawa F., Hori M.: *Plasma Med.* **1**, 265 (2011).
- Iseki S., Nakamura K., Hayashi M., Tanaka H., Kondo H., Kajiyama H., Kano H., Kikkawa F., Hori M.:

- Appl. Phys. Lett. 100, 1 (2012).
20. Wang M., Holmes B., Cheng X., Zhu W., Keidar M., Zhang L. G.: PLoS One 8, 1 (2013).
 21. Kim C. H., Bahn J. H., Lee S. H., Kim G. Y., Jun S. I., Lee K., Baek S. J.: J. Biotechnol. 150, 530 (2010).
 22. Utsumi F., Kajiyama H., Nakamura K., Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Kondo H., Kano H., Hori M., Kikkawa F.: PLoS One 8, 1 (2013).
 23. Vandamme M., Robert E., Dozias S., Sobilo J., Leron-del S., Pape A. L., Pouvesle J. M.: Plasma Med. 1, 27 (2011).
 24. Keidar M., Walk R., Shashurin A., Srinivasan P., Sandler A., Dasgupta S., Ravi R., Preston R. G., Trink B.: Br. J. Cancer. 105, 1295 (2011).
 25. Mellman I., Coukos G., Dranoff G.: Nature 480, 480 (2011).
 26. Fridman W. H., Pages F., Sautès-Fridman C., Galon J.: Nat. Rev. Cancer 12, 298 (2012).
 27. Noy R., Pollard J. W.: Immunity 41, 49 (2014).
 28. Garg A. D., Nowis D., Golab J., Vandenabeele P., Krysko D. V., Agostinis P.: Biochim. Biophys. Acta – Rev. Cancer 1805, 53 (2010).
 29. Ma Y., Ha C. S., Hwang S. W., Lee H. J., Kim G. C., Lee K. W., Song K.: PLoS One 9, 1 (2014).
 30. Krysko D. V., Garg A. D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P.: Nat. Rev. Cancer 12, 860 (2012).
 31. Lin A. a 11 spoluautorov: Plasma Processes Polym. 12, 1392 (2015).
 32. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L.: Annu. Rev. Immunol. 31, 51 (2013).
 33. Garg A. D. a 14 spoluautorov: EMBO J. 31, 1062 (2012).
 34. Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S.: Annu. Rev. Immunol. 20, 621 (2002).
 35. Koks C. A., Garg A. D., Ehrhardt M., Riva M., Vandenberk L., Boon L., De Vleeschouwer S., Agostinis P., Graf N., Van Gool S. W.: Int. J. Cancer 136, 313 (2015).
 36. Whiteside T.: Oncogene 27, 5904 (2008).
- S. Kyzek^a, F. Uhrin^a, E. Holubová^a, J. Tomeková^b, I. Ďurovcová^a, J. Špačková^a, A. Ševčovičová^a, and E. Gálová^a** (^a Department of Genetics, Comenius University in Bratislava, Slovakia; ^b Department of Experimental Physics, Comenius University in Bratislava, Slovakia): **Potential Use of Non-thermal Plasma in Oncotherapy**
- In addition to solids, liquids and gases there is the fourth fundamental state of matter, the plasma which is a partially ionized medium, consisting of electrons, ions, neutral atoms and reactive oxygen and nitrogen species. Application of the non-thermal plasma has a large potential in various areas including medicine. A significant acceleration of wound healing can be achieved through the non-thermal plasma due to its antimicrobial effects, stimulation of proliferation, as well as migration of cells and its influence on cellular adhesive receptors. The non-thermal plasma is able to selectively eliminate cancer cells through reactive oxygen and nitrogen species and it can be used in anticancer therapy.
- Keywords:** non-thermal plasma, oncotherapy, cancer cells, immunotherapy
- Acknowledgements*
This work was supported by grants APVV-16-0216 and VEGA 1/0410/18.