

Soğuk Atmosferik Plazma ve Kanser

Ayşe ÖZDEMİR^{1*}

¹ Elektrik ve Elektronik Mühendisliği, Ankara Bilim Üniversitesi, Ankara, Türkiye, <https://orcid.org/0000-0003-4050-6682>

*Corresponding Author: ayse.ozdemir@ankarabilim.edu.tr

Received: 7 October 2021; Accepted: 18 December 2021

Öz

Plazma doğal bir gazı enerji eklenerek gazın iyonize hale getirilmesiyle oluşmaktadır. Plazma içeriğindeki reaktif oksijen ve nitrojen parçacıkları, UV fotonları ve çeşitli uyarılmış parçacıklar nedeniyle biyolojik aktiviteyi etkileyebilmektedir. Tedavi edilecek doku ve amaca göre sıcak veya soğuk plazma uygulanmaktadır. Soğuk plazma uygulandığı doku ve çevresinde hasara neden olmaması nedeniyle klinik uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir. Soğuk atmosferik plazma, plazmanın bir çeşidi olup ısı etkisiz dermatoloji alanında yara, kaşıntı, ağrı, yara izi, aktinik keratoz, diyabetik ayak ve egzama tedavisinde kullanılmasının yanı sıra son yıllarda dişçilikte beyazlatma, implant yüzeylerinin modifikasyonu, yüzey kaplama gibi uygulamalarda da sık sık kullanılmaya başlamıştır. Bu derleme yazısında öncelikle plazma hakkında genel bilgiler verilecek ardından soğuk atmosferik plazmanın kanser tedavisinde kullanımı incelenecektir.

Anahtar kelimeler: soğuk atmosferik plazma, kanser, plazma jet, apoptozis

Cold Atmospheric Plasma and Cancer

Abstract

Plasma is formed by adding energy to natural gas and ionizing it. Depending on the tissue to be treated and the purpose, hot plasma or cold plasma have been applied. Cold plasma is more preferred in clinical applications because it does not cause damage to the tissue and its surroundings. Cold atmospheric plasma is a type of plasma and it has been used in dermatology in the treatment of wounds, itching, pain, scarring, actinic keratosis, diabetic foot and eczema without thermal effect, as well as in applications such as bleaching, modification of implant surfaces, surface coating in dentistry in recent years. In this review article, firstly, general information about plasma will be given and then the use of cold atmospheric plasma in cancer treatment will be discussed.

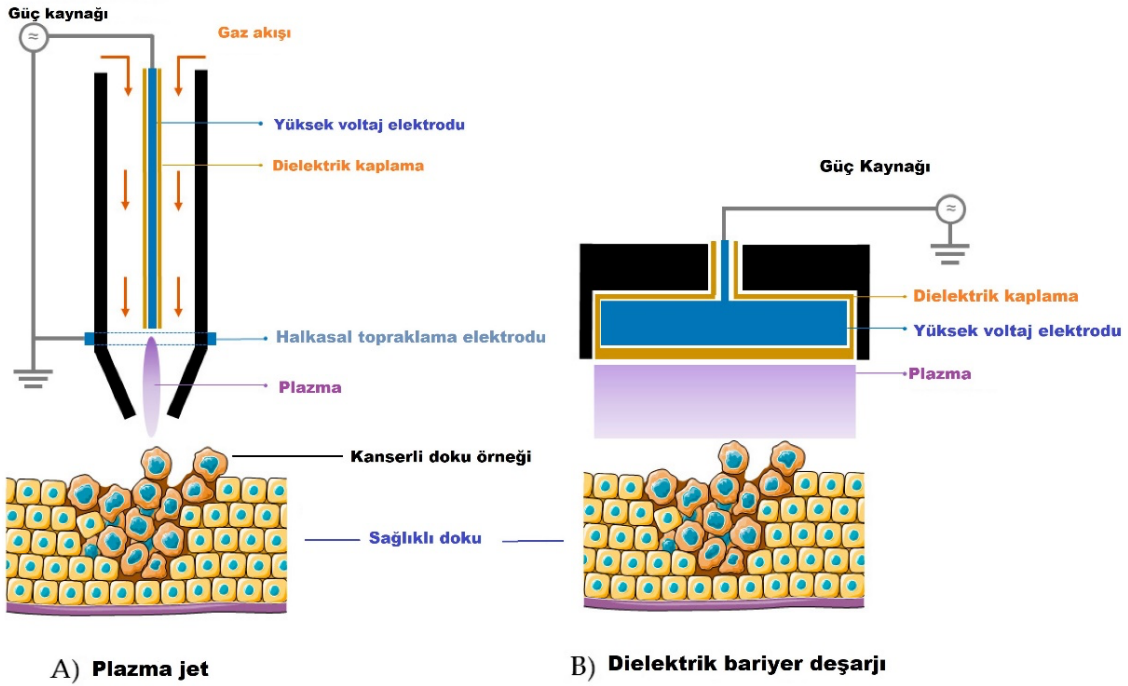
Keywords: Cold atmospheric plasma, cancer, plasma jet, apoptosis

1. Giriş

Plazma, kısmen iyonize olmuş gazlar, fotonlar, reaktif oksijen parçacıklar, reaktif nitrojen parçacıklar ve elektronların karışımından oluşan maddenin dördüncü halidir [1]. Plazma teknolojisi temel olarak sistemden çıkan sıcaklığa ve plazma ürününün termal dengesine bağlı olarak soğuk atmosferik plazma ve termal plazma olarak adlandırılmaktadır [2]. Bu iki plazma türü arasındaki en önemli fark termal plazmada elektronlar arasındaki enerji transferi sonucunda binlerce derecelere çıkan sıcaklık artışı olurken soğuk atmosferik plazmada yüksüz moleküller ve iyonlar daha çok rol oynamaktadır. Soğuk atmosferik plazma voltaj, sıklık, uygulama süresi, maruziyet şekli, gazın çeşidi, gazın akış hızı gibi çeşitli işlem parametrelerden ve çevresel koşullardan etkilenmektedir [3]. Temel olarak plazma sistemi iki iletken elektrot, bu elektrotlar arasına yerleştirilmiş bir gaz girişi ve elektrik voltaj girişinden oluşmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan plazmanın gücü yaklaşık 2W, uygulama sıcaklığı 35-40oC aralığında değişmektedir. Plazma üreticisine bağlı olarak dc/ac voltaj uygulanabilmektedir. Bu sistemlerde voltaj değeri genellikle 1kV ile 100kV aralığında değişmekte olup frekans değeri 1 kHz ile 100 GHz aralığında çalışılacak ise ac voltaj tercih edilmektedir [4].

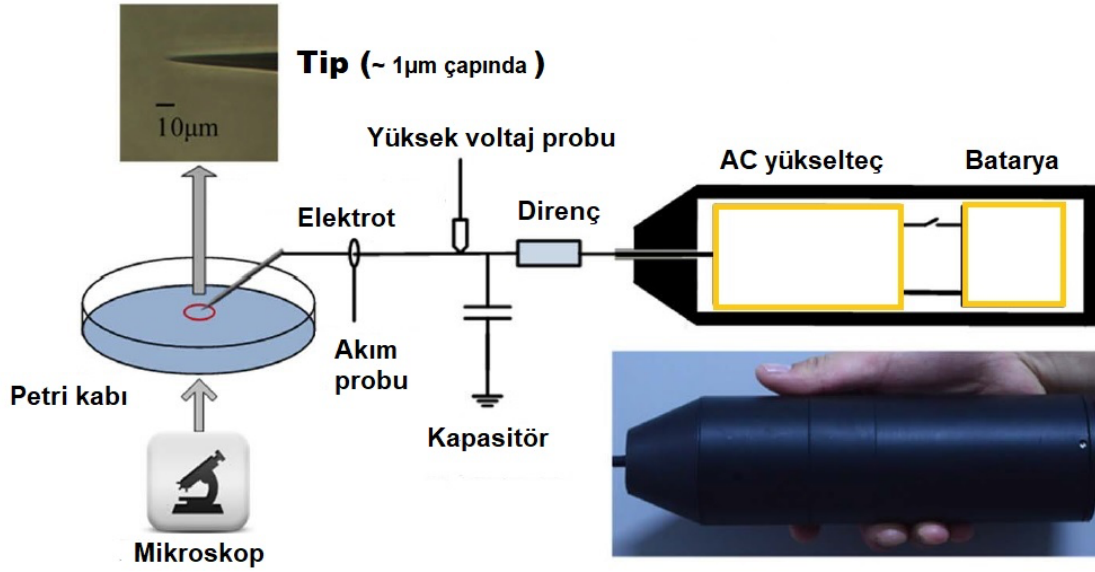
En yaygın kullanılan atmosferik plazma kaynakları atmosferik basınçlı plazma jetleri (ABPJ) ve dielektrik bariyer deşarjı (DBD) dir. Kanseri tedavi uygulamalarında yaygın olarak kullanılan plazma

sistemleri Şekil 1’de yer almaktadır. Birçok konfigürasyonda oluşturulabilen dielektrik bariyer deşarjının tipik düzlemsel üretimi Şekil 2’deki diyagramda gösterilmiştir. Biri yüksek voltaj elektrodu diğeri topraklama elektrodu olan iki elektrodun arasında yer alan yalıtkan dielektrik katman gazın dielektrik yöntemiyle iyonlaşmasını sağlayarak plazma oluşturmaktadır. DBD’ nin geometrik özellikleri nedeniyle silindirik şekilde ayrılmış plakalardan oluşan şekilleri de mevcuttur. Genellikle üretimin alt kısmında plazma oluşumunu engellemek için dielektrik malzeme ile yüksek voltaj elektrodu birbirine yakın olacak şekilde yerleştirilebilir [5]. Plazma üreticisine ait pek çok parametre değiştirilerek amaca uygun plazma üretilebilmesi mümkündür.



Şekil 1: Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan plazma kaynakları ve kanserli dokuya plazma uygulaması (A) Plazma jet, (B) Dielektrik bariyer deşarjı (DBD). Kaynak [65]’den alınarak tekrar düzenlenmiştir.

Soğuk atmosferik plazmanın yaşam bilimleri alanında gıda sterilizasyonu [6, 7], diş beyazlatma [8], sentetik organik bileşiklerin ve mayaların sudan uzaklaştırılması [1, 9], bakterilerde biyofilm oluşumunun engellenmesi [10, 11], yara ve yanık tedavisi [12], doku yenilenmesi, kan pıhtılaştırma [4, 13] gibi çeşitli uygulamaları yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda plazmanın kanser tedavisinde kullanışlı ve seçici bir teknoloji olarak kullanımına yönelik artan bir ilgi vardır. Plazmanın fiziksel ve biyokimyasal özellikleri sayesinde kanser hücreleri yok edilebilmektedir. Plazmanın kanserin temel moleküler mekanizmaları ve bu hastalığın ilerlemesi üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Tıp alanında kullanılmakta olan SAP sistemleri, korona deşarjı, dielektrik bariyer deşarjı (DBD) ve plazma jetler olmak üzere üç temel başlık altında toplanabilir.



Şekil 2: Mikroplazma jet kurulumunun şematik gösterimi ve biyomedikal bir model üzerinde plazma uygulaması. Kaynak [18]'den alınarak tekrar düzenlenmiştir.

Son yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin doğrudan veya dolaylı olarak (örn; plazma ile aktive edilmiş besiyer, su veya su buharı) plazmaya maruziyetinin, bu hücrelerin büyümesini engellemekte oldukça etkili olduğunu ve sağlıklı hücelere zarar vermediğini göstermektedir [14, 15].

2. Soğuk Atmosferik Plazmanın Kanser Hücreleri Üzerindeki Biyolojik Etkileri

Soğuk atmosferik plazma uygulamaları kanser hücrelerinde adezyon, farklılaşma, hücre göçünü, apoptozis ve ilaç hassasiyeti gibi biyolojik süreçleri etkileyebilmektedir. Bu ilişkileri anlamaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır [16]. Bu bölümde bu süreçler ve plazma arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik çalışmalar incelenecektir.

İn vitro çalışmalar iki türlü yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hücreler belirli bir mesafeden plazmaya maruz bırakılmakta veya hücre besiyerine plazma uygulandıktan sonra hücre ekimi yapılmaktadır. Bu yöntemlerden hangisinin kanser tedavisinde etkili olduğunun test edildiği bir çalışma da melonama hücrelerinin doğrudan maruziyete daha hassas olduğu ve besiyere plazma uygulaması yapılan grup ile karşılaştırıldığında doğrudan plazma uygulamasının hücre bölünmesini engellemede daha etkili olduğu gözlemlenmiştir [17].

Son yapılan araştırmalarda soğuk atmosferik plazma kullanılarak kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemenin ve bu hücrelerde apoptozis mekanizmasının aktive edilmesinin mümkün olabileceği öne sürülmüştür [18]. Plazma jet ve korona tipi plazma deşarj sistemleri kullanılarak tek hücre üzerinde kanser tedavi çalışmaları yapılmıştır. Optik fibere dayalı mikroplazma endoskopisi olarak da açıklanabilecek bir çalışmada in vitro hücre kültürü ortamında hücre çekirdekleri boyanarak plazma uygulanan alan ile uygulanmayan alan arasında ciddi farklılıklar olduğu anlaşılmıştır. Plazma uygulamasının tümör hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu ve uygulama yapılan hücrelerde meydana gelen DNA kırıklarının apoptozis mekanizmasını aktive ettiği açığa çıkarılmıştır [19]. Plazma tedavisinin seçiciliği üzerine yapılan başka bir çalışmada Tan X. ve arkadaşları aynı hücre kültürü ortamında aynı petri kabı üzerinde çoğalttıkları sağlıklı hücreler ile karaciğer kanser hücre hattı HepG2 ve rahim ağzı kanser hattı olan HeLa kanser hücrelerinin plazmaya duyarlılıkları gözlemlenmiştir. Araştırmanın sonucunda birbirine çok yakın olan sağlıklı hücreler plazmadan etkilenmezken tümör hücrelerinde apoptozise bağlı hücre ölümü gerçekleşmiştir [18].

Plazmanın anti-tümör etki göstermesinde en iyi bilinen mekanizma reaktif oksijen parçacıklarının (ROP) oluşumuna bağlı apoptozistir. Özellikle dielektrik bariyer deşarj sistemleri tarafından ozon,

atomik oksijen, hidroksil radikalleri gibi seçici veya seçici olmayan reaktif oksijen parçacıkları oluşturulmaktadır [20]. Normal şartlarda hücrede bulunan superoksit dismutaz and katalaz gibi enzimler ile C, E vitaminleri, β -karoten gibi enzim olmayan diğer bazı moleküller reaktif oksijen ve nitrojen parçacıklarının miktarını dengede tutar. [21, 22]. Hücrede oksidatif stres olarak da bilinen ROS artışı membran lipid peroksidasyonu [23], DNA baz modifikasyonu [24], veya protein karbonilasyonu [25] süreçlerinin başlamasına yol açabilmektedir. Kanser hücrelerinde Warburg etkisi olarak da bilinen metabolik aktivitenin değişmesine bağlı olarak ROS miktarının sağlıklı hücrelerden daha fazla olduğu bilinmektedir.[26] Bu artışın başlıca nedeni kanser hücrelerinde reaktif parçacıklara karşı savunma sağlayan antioksidatif sistemin genetik instabiliteye bağlı olarak düzgün çalışmamasıdır.[27] Soğuk atmosferik plazmanın ROS üretim mekanizması insan epidermal hücreleri olan keratinositler üzerinde araştırılmıştır. Yapılan epigenetik çalışmalarında dielektrik deşarj kullanılarak oluşturulan plazmanın hücrelerde DNA ve histon modifikasyonları yoluyla NOX / DUOX NADPH ailesine ait reaktif oksijen parçacıkların kaynağını kontrol eden enzimlerin [28] ifadenmesinde artışa yol açtığı gözlemlenmiştir [29]. Plazma tarafından oluşturulan bu reaktif parçacıkların p53 mutasyonuna sahip kanser hücrelerinde,[30] baş ve boyun kanserinde [31, 32] ve farelerin melanositik tümörlerinde apoptozise yol açarak kanser hücresi ölümüne neden olduğu bilinmektedir [33].

Plazma zarı gözeneklerinin oluşumunda ve tümör oluşumunun baskılanmasında [34] görev alan Gasdermin E (GSDME) proteini kemotöropetik ilaçlara karşı dirençli kanser türlerinde (örn; HeLa hücreleri, H1299 hücrelerinde) daha az üretilmektedir [35]. Yang ve arkadaşlarının 15 farklı insan kanser hücresi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada bu proteinin ifadenme miktarı ile kanser hücrelerinin SAP uygulamasına olan hassasiyeti arasında zamana ve doza bağlı olarak doğrusal bir ilişki olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalar SAP'ın kanda koagülasyona neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Fridman G. ve arkadaşları DBD plazmanın kan pıhtılaşması üzerindeki olası etkilerini incelemiştir. Plazma kanın pıhtılaşması sırasında doğal olarak fonksiyon gösteren çeşitli ajanları aktive ederek kanın pıhtılaşmasını hızlandırabildiği gözlemlenmiştir [13].

Plazmanın DNA hasarına neden olmasındaki diğer önemli biyolojik süreç mitokondriyal yollar yoluyla olup Bcl2 ailesi rol almaktadır [36, 37]. Bu ailenin üyeleri mitokondriyal dış membran bütünlüğünü sağlayarak anti-apoptotik etki oluşturur. Plazmaya maruz bırakılan hücre besiyerinde hidrojen peroksit asıl bileşen olup bu moleküller hücre içine diffüz edebilir [36]. Ayrıca besiyerde hidroksi radikalleri, peroksitler gibi diğer serbest radikaller de oluşmaktadır. Bu parçacıklar Bcl2/Bax ifadenmesini değiştirerek mitokondri membran potansiyelinin düşmesine neden olur. Ayrıca plazma yan ürünleri tarafından hücre endoplazmik retikulumu üzerinde oluşturulan stres depolanmış olan Ca^{++} iyonlarının açığa çıkmasına ve hücre dışına Ca^{++} salınmasına yol açar. Bu süreç hücre zarının geçirgenliğini artırarak serbest radikallerin hücre içine girişini kolaylaştırmaktadır. Mitokondri hasarı ile meydana gelen bu biyolojik süreç reaktif oksijen parçacıkları (ROP) tarafından DNA kırıkları ve DNA zincirinde çapraz bağların oluşmasına yol açmaktadır [38].

Plazma tarafından oluşturulan bir diğer bileşen olan hidrojen peroksit (H_2O_2) oldukça stabil yapıya sahip olup biyomakromoleküllere zarar verebilmekte ve apoptozis veya nekrozis yoluyla hücre ölümüne neden olabilmektedir [39].

Bu çalışmalar plazma teknolojisinin yeni nesil mikrop plazma cerrahiye dayalı kanser tedavisi için umut vermektedir

3. Soğuk Atmosferik Plazmanın Kanser Tedavi Uygulamaları

3.1 Meme Kanseri

Dünya geneline bakıldığında kadınlar arasındaki en yaygın kanser türü meme kanseridir [40]. Kanser tedavisinde en ciddi problemlerden biri kanserin ilaca dirençli olmasıdır. Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan Tamoksifene dirençli MCF-7 meme kanseri hücre hattına SAP uygulamasının etkileri incelendiğinde plazma uygulanan grupta ilaca hassasiyetin yüzde elli arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedenini moleküler düzeyde açıklamak için gerçekleştirilen çalışmalarda plazmaya maruz

birakılan hücrelerde RoP miktarının yaklaşık iki kat arttığı, ilaç direncine neden olan MX1 (interferon kaynaklı GTP bağlayıcı proteini kodlayan gen) ve HOXC6 (meme bezi gelişimi ile ilişkili Homeobox geni) gibi çeşitli genlerinin ekspresyonunun değiştiği anlaşılmıştır [41].

Dört farklı meme kanseri hücresi (BT-474 insan duktal karsinoma, SK-BR-3 meme adenokarsinoma, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri) üzerinde plazmanın seçiciliği ve etki mekanizması farklı dozlar da uygulanarak incelenmiştir. Uygulamadan 12 saat sonra DNA tamir mekanizmasına ait genlerin ifadenmesinde artış olmuştur. Ayrıca hücre döngüsünün erken sentez safhasında yer alan kromatinin stabilizasyonunda görevli histon mRNA'nın oksidasyonu ve bozunmaya uğraması tümör hücrelerinin ölümüne neden olmuştur [40]. Araştırmada kullanılan tüm kanser hücrelerinde benzer sonuçlar gözlemlenirken sağlıklı hücreler plazmadan etkilenmemiştir. SK-BR-3 hücrelerine düşük dozda 3 dk plazma uygulandıktan 6 saat sonra çekirdekte gözle görülebilir hasar oluşurken diğer hücrelerde en yüksek dozda 5 dk plazma uygulamasından 24 saat sonra benzer sonuçlar gözlenmiştir.

3.2 Melanoma

Kanser hücreleri doğrudan plazma ile etkileşime bırakılabildiği gibi hücrelerin besiyerine plazma uygulanarak olası etkiler gözlemlenebilmektedir. Schmidt ve arkadaşları plazma ve kanser hücreleri arasındaki ilişkiyi farklı bir açıdan inceleyerek plazmanın hücre iskeleti, hücre hareketliliği ve kanser hücre göçünde görevli genlerin ekspresyonuna etkisini ortaya çıkarmıştır [42]. İki saatlik plazma uygulamasının ardından hücrelerden tüm genom analizi yapılmıştır. SK-Mel-147 melanoma kanser hücreleri (cilt kanserinin en agresif formu) ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında incelenen 1470 genden 900'ünün ekspresyonu artarken 500'ünün ifadenmesinde azalma saptanmıştır. Plazma uygulamasından etkilenen genler gruplandırıldığında apoptoziste görevli genlerden ziyade hücrenin yapısal (örn; COL6A3 ve COL9A1 genleri), adhezyon (örn; CNTN1/2/3, CNTNAP3B genleri) ve bağlantılarından sorumlu integrin, cadherin gibi moleküllere ait yolaklarda görev alan genler olduğu açığa çıkarılmıştır.

Binenbaum ve arkadaşlarının geliştirdiği düşük elektrik akımında çalışabilen esnek SAP üreticinin kanser tedavi uygulamalarında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Pankreas kanseri, kolon kanseri, skuamöz hücreli karsinoma, melanoma ve farinks kanseri hücreleri 10, 30, 60 ve 90 saniye süreyle SAP' ya maruz bırakıldıklarında hücre bölünmesinde melanoma hücre bölünmesinin diğer kanser türlerinden daha fazla etkilendiği ve ciddi düşüş gösterdiği gözlenmiştir [17]. Oluşturulan in vivo kanser modelinde plazmanın tek doz veya bölünmüş olarak uygulanmasının nekrotik doku oluşumuna etkisi incelendiğinde ciddi bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmada kanser tedavisinin nekroz yoluyla değil apoptozis ile gerçekleşmesi sağlanmıştır.

3.3 Glioblastoma

Glioblastoma yüksek çoğalabilme kapasitesine sahip ve pek çok tedavi yöntemine dirençli bir kanser türüdür. Tedavi amacıyla kullanılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler genellikle birlikte uygulanmaktadır.

Son yıllarda SAP' nın beyin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Manish ve arkadaşları çeşitli nanoparçacıkların ve SAP'nın glioblastomalar üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmaları derlemiştir. Bu çalışmalardan anlaşılmıştır; kanser tedavisinin başarılı olabilmesi için nanoparçacıkların konsantrasyonunun ve SAP'a dozunun optimize edilmesi, kanser tedavisinin başarısında önemli bir etkidir [43].

Cheng ve arkadaşlarını gerçekleştirdikleri çalışmada soğuk atmosferik plazmanın U87 glioblastoma kanser hücrelerine etki mekanizması ve plazma uygulama süresi, voltaj, sistemi besleyen gazların oranı gibi değişkenlerin kanser tedavisi üzerindeki etkilerini incelenmiştir. [44] Plazmanın kansere özgü etkisini karşılaştırabilmek amacıyla sağlıklı insan astrosit (E6/E7) hücreleri kullanılmış ve plazmanın 30 saniye uygulandığı örneklerde 3 kat fark gözlemlenmiştir. Hazırlanan deneysel düzenekler ile plazma dozu olarak adlandırılan ve sistemi oluşturan bileşenlerin (voltaj, besleyici gaz gibi) değiştirilmesiyle kanser hücre ölümleri arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Elde edilen verilere göre plazma dozu arttıkça kanserli hücrelerde ölüm oranı da artmaktadır. Plazma dozunu belirleyen en önemli faktörler uygulanan

voltaj miktarı, helyum gazı oranı ve plazma uygulama süresidir. Oksijen ve helyum gazı karıştırılarak uygulanan plazma yalnız helyum uygulanan örneklerden daha az antikanser özellik göstermiştir. Bunun nedeni daha az peroksinitrit oluşumu olabileceği gibi oluşturulan oksijene bağlı plazma yoğunluğundaki azalma da olabilir.

U87 glioblastoma hücreleri ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada 30, 60 ve 180 saniye plazma uygulanmış ve plazma uygulanmayan grup ile karşılaştırıldığında ciddi morfolojik değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubunun hücre gövdesi ve şekli belirgin ve yayılmış iken plazma uygulanan grupta yer alan hücreler küçülerek dairesel şekil alma eğilimi göstermiştir. Bu değişimin hücrenin metabolik faaliyetlerini etkilediği düşünülmektedir [45]. Plazmanın glioma üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik yapılan bir çalışmada plazma uygulaması sonrasında kanser hücrelerinde çeşitli veziküllerin olduğu gözlemlenmiştir. Kullanılan hücresel boyama teknikleri ve görüntülemeler sonrasında bu veziküllerin lizozom olduğu anlaşılmıştır. Kanser hücrelerinde çok fazla çoğalan bu asidik veziküller, hücrenin geçirgenliğini ve mitokondri membran depolarizasyon mekanizmasını etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır [46].

3.4 Mesane Kanseri

Mesane kanseri tedavisinin zor olması ve tedavide kullanılan yöntemlerin ve ajanların olumsuz yan etkileri nedeniyle ölüm oranı yüksek kanser türlerinden biridir. Soğuk atmosferik plazma yönteminin mesane kanserinde uygulanan mevcut tedavi yöntemlerine alternatif oluşturup oluşturmayacağını anlamak için gerçekleştirilen bir çalışmada iki farklı mesane kanser hücre hattı farklı sürelerde plazmaya maruz bırakılmıştır. Bu deneysel çalışmada hücre döngüsünün sentez (S) fazında durduğu ve kanser hücrelerinin çoğalamadığı belirlenmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli incelendiğinde azalma olması apoptozis ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca süperoksit, nitrik oksit ve peroksit içeriğindeki azalmalar, plazma uygulamasına bağlı metabolik aktivitenin azaldığına işaret etmektedir. HT-1376 (seviye III) ve TCCSUP (seviye IV) mesane kanser hücre hatları, SAP tedavisine genel olarak benzer cevaplar vermesine rağmen plazmanın TCCSUP hücreleri üzerinde daha fazla anti-tümör etki gösterdiği düşünülmektedir.[47]

Farklı tedavi stratejilerinin birlikte kullanılmasıyla klasik tedavi yöntemlerine kıyasla daha etkili sonuçlar alınabileceğini gösteren bir çalışma insan mesane tümör sferoidleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ortamında oluşturulan sferoid modeline hipertermi ve SAP uygulanmış besiyer ayrı ayrı ve birlikte uygulanarak anti-tümör etkileri karşılaştırılmıştır. Mesane kanseri hücreleri 43°C sıcaklıkta 3 saat hipertermi ile tedavi edildiğinde hücrelere canlılığında %3,3 azalma olurken, plazma uygulanmış besiyerde bırakılan hücrelerin canlılığında yaklaşık %8 oranında azalma gözlenmiştir. Bu iki tedavi birlikte uygulandığında %44 canlılıkta azalma sağlanmıştır. Bu da hipertermi ve plazma uygulamasının kanser tedavisinde sinerjistik etki sağladığını göstermektedir [48].

3.5 Lenfoma

Kan kanseri bilinen en tehlikeli kanser türlerinden biridir. Lenfoma bu kanser türünden biri olup kemik iliğinde beyaz kan hücrelerinin kontrolsüz şekilde fazlaca üretilmesiyle açığa çıkmaktadır. Anormal biçimde oluşmuş olan bu hücreler savunma sisteminde görev alamadıkları gibi kemik iliğinden kırmızı kan hücreleri ve kan pulcuklarının üretimini de kısıtlamaktadır. U937 lenfoma hücrelerine soğuk atmosferik plazmanın etkilerinin incelendiği bir çalışmada normal bir yetişkinden izole edilen mononükleer kan hücresi ile lenfoma hücreleri DBD plazmaya maruz bırakılmıştır [49]. Uygulamaya bağlı olarak kanser hücrelerinde aşırı artan ROS and H₂O₂ miktarının antioksidan sistem tarafından dengelenememesinin nedenlerinden birinin indirgenmiş glutatyon (GSH) ve NADPH miktarındaki azalma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında lenfoma hücrelerinin plazmanın etkisiyle hücre döngüsünün G1 ön fazında artış göstermiştir. Bu ise apoptozise bağlı kanserli hücre ölümünü desteklemektedir.

3.6 Akciğer Kanseri

H460 and HCC1588 insan akciğer kanser hücreleri ve sağlıklı insan akciğer hücrelerinin plazma uygulamasına oluşturdukları hücrel cevapların karşılaştırıldığı çalışmada H460 hücrelerinin plazma tarafından oluşturulan reaktif parçacıklara daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Plazma akciğer kanser hücrelerinin mitokondrilerini morfolojik olarak değiştirmekte, mitokondriyal enzimlerin çalışmasını engellemekte ve membran potansiyelinde azalmaya neden olmaktadır [50].

Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen deneylerde manyetik nanoparçacıkların SAP'ın tümöre özgü tedavi ediciliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. Tümör dokusunda yer alan lizozomlarda birikim gösteren demir nanoparçacıklar, hidrojen preoksit varlığında Fenton proses olarak bilinen bir reaksiyona girerek hidroksi radikallerinin oluşmasını tetiklemiş, bu radikallerin artmasıyla birlikte mitokondriyal kaspaz-2 üzerinden apoptozis aktive edilmiştir. Ayrıca DNA çift zincir kırıkları oluşarak malignant kanser hücrelerinde aşırı ifadelenme gösteren epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) bloke etmiştir [51]. Bu çalışma, SAP'ın nanoteknolojik ajanlarla birlikte kullanılmasıyla geliştirilecek tedavi yöntemlerinin potansiyelini göstermektedir.

3.7 Nöroblastoma

Walk ve arkadaşları helyum gazı ile aktive edilmiş soğuk atmosferik plazma sisteminin sinir dokusunda meydana gelen kanser üzerine etkilerini in vitro ve in vivo olarak incelemiştir. Plazma uygulamasının reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu tetiklediği ve bu parçacıkların sinir dokusundaki tümör büyümesini yavaşlatabildiği anlaşılmıştır [52].

Soğuk atmosferik plazma teknolojisinin kullanıldığı kanser çalışmaları özet olarak Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1: Soğuk atmosferik plazma teknolojisinin kullanıldığı bazı kanser çalışmaları

Kanser türü	Plazma teknoloji	Parametreler	<i>İn vitro</i> model	<i>İn vivo</i> model	Sonuç	Kaynaklar
Nöroblastoma	SAP	4 kV, 41/dk He gaz akışı	Neuro2a hücreleri	A/J farelere Neuro2a enjeksiyonu	Metabolik aktivitede azalma, apoptoziste artış	[52]
	SAP	10 kV, He/O ₂ beslemeli	U87 ve E6/E7 hücreleri	Belirtilmemiş	Plazma dozuna bağlı kanser hücre ölümlerinde artış	[44]
Mesane kanseri	APJ	15, 30, 60, 90, ve 120 s doğrudan maruziyet	HT-1376 ve TCCSUP hücreleri	Belirtilmemiş	Protein içeriği, metabolik aktivite ve kanser hücresi sağkalımında azalma	[47]
	DBD	10 kHz	T24 insan mesane kanseri hücreleri	Belirtilmemiş	Plazma uygulanmış besiyer ile hipertermi tedavisinin birlikte uygulanmasıyla anti-tümör etkide artış	[48]
Melanoma	APJ	20s-180s dolaylı maruziyet, Ar	SK-Mel-147 tümör hücreleri	Belirtilmemiş	Hücre hareketliliğinde ve koloni oluşumunda azalma	[42]
	APJ	25 kHz AC güç kaynağı, 5 kV, He, 0, 2, 4 ve 6 dk doğrudan ve dolaylı maruziyet	B16F10 metastatik melanoma hücreleri	C57BL/6 farelere B16F10 enjeksiyonu	Plazma ve kemoterapi tedavisinin birlikte uygulanmasına bağlı anti-kanser etkide artış	[53]
	APJ	<1,2 kV, 98%Ne+2%Ar, 0.3–3 L/dk gaz akışı	Skuamöz hücreli karsinoma (SCC7), kolon kanseri (DLD1) ve melanoma (B16) hücreleri	C57/bl farelerine melanoma hücre enjeksiyonu	ROS'a bağlı DNA hasarı ve apoptozis	[17]
Glioblastoma	APJ	1 L/dk hava akışı	T98G hücreleri	Belirtilmemiş	Koloni oluşumu ve hücre büyümesinin engellenmesi	[54]
	DBD	75 kV, 50 Hz, 0-180 s maruziyet	U373MG-CD14 insan glioblastoma hücreleri	Belirtilmemiş	Plazmaya bağlı lizozom sayısında artış ve hücre membran hasarına bağlı kanserli hücre ölümü	[46]
	APJ	30, 60, ve 180 s maruziyet, hava beslemeli	U87 MG beyin kanseri hücreleri	Belirtilmemiş	Plazmanın dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemesi ve apoptozisi tetiklemesi	[45]
Hepatosellüler karsinoma ve servikal kanser	Korona tipi DBD	10–15s oda sıcaklığında maruziyet	HepG2, HeLa hücreleri	Belirtilmemiş	Plazma uygulamasına bağlı hücre apoptoziste artış	[18]
Lenfoma	DBD	30–480s maruziyet, 600V, 0.01A	U937 hücreleri	Belirtilmemiş	Hücre döngüsünü durdurma, apoptozis ve antioksidant sistemin inaktivasyonu	[49]

Lenfoma	DBD	80V, 5,7W	H460 ve HCC1588 kanser hücreleri ile MRC5 ve L132 sağlıklı akciğer hücreleri	Belirtilmemiş	Mitokondriyal enzim aktivitesinde azalma, apoptotic hücre ölümü, mitokondriyal disfonksiyon	[50]
	APJ	8 kV, 25 kHz frekans, 4 L/dk He gaz akışı	A549 hücreleri	BALB/c farelere A549 enjeksiyonu	Kanser hücre canlılığı ve çoğalmasında azalma, apoptozis	[51]
Meme kanseri	DBD	30s X 10, 0.46 kV, 1.5 L/dk argon gaz akışı	MCF-7/TamR hücreleri	Belirtilmemiş	ROS artışı, gen ifadenmesinde değişim	[41]
	Canady Helios soğuk plazma sistemi®	3 L/dk He akışı, 7 W, 22.3 W ve 28.7 W	BT-474, SK-BR-3, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri	Belirtilmemiş	Hücre döngüsünün erken sentez safhasında kromatin yapısındaki bozulmaya bağlı hücre ölümü	[40]
	APJ	3.28-3.68 kV, 3000-3700 Ω , He 0, 30, 60 ve 90 s maruziyet	MDA-MB-231 BrCa hücreleri ve MKH	Belirtilmemiş	Kanser hücresi yayılımında azalma ve hücre ölümü	[55]
Pankreas kanseri	APJ	Ar, 14 kV, 40 mA, 20 kHz, 3dk'lık döngüler	MCF-7 hücreleri	Belirtilmemiş	Su buharına uygulanan plazmaya maruz bırakılan kanser hücrelerinde anti-kanser etki artışı	[15]
	Atmosferik deşarj	2, 4, 6, 8 ve 10 mm mesafeden maruziyet	BxPC-3 kanser hücreleri ve H6c7 sağlıklı pankreas hücreleri	Belirtilmemiş	Plazma ile aktive edilmiş tuz solusyonu uygulanan kanserli ve sağlıklı hücrelerde seçici etki, reaktif nitrojen ve oksijen parçacıklarına bağlı kanser hücresi ölümü	[56]
	kINPen®IND plazma jet	2,5 kHz, Ar gazı, 45-50°C sıcaklık, 10 mm mesafeden 3, 5 ve 10 dk plazma uygulanan sıvılar ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon	MiaPaca-2, BxPc3 pankreas duktal adenokarsinoma ve hPSC128-SV hücreleri	Belirtilmemiş	Oksidatif strese bağlı kanser hücresi ölümü	[57]
Kalın bağırsak kanseri	APJ	1,1-1,8 kV, 230-270 kHz frekans, 2 L/dk He gaz akışı	HT29 ve HCT116 kolon kanser hattı hücreleri	Belirtilmemiş	Kanser hücrelerinde apoptozis	[58]

Kısaltmalar: SAP - Soğuk Atmosferik Plazma, DBD - Dielektrik Bariyer Deşarjı, APJ - Atmosferik Plazma Jet, s - Saniye, L - Litre, dk - Dakika V - Voltaj, A – Amper, W – Watt, Ω - Ohm, He – helyum, Ar – argon, O₂, oksijen, MKH - mezenkimal kök hücre.

4. Tartışma

Klasik kanser tedavi yöntemleri kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücelere de zarar verebilmekte ve sistemik bazı yan etkilere yol açabilmektedir. Ayrıca bazı kanser türleri radyasyon tedavisi ve kemoterapiye karşı direnç gösterebilmektedir [59]. Soğuk atmosferik plazma klasik onkolojik tedavi yaklaşımlarına göre yenilikçi, güvenli ve kontrol edilebilir, alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Soğuk atmosferik plazma cihazlarının en önemli avantajı diğer plazma türlerinden farklı olarak vakum gerektirmeden ortamdaki havayı kullanarak çalışabilmesidir.

İnsan sağlığı ve yaşayan dokular söz konusu olduğunda ilk düşünülmesi gereken konulardan biri DBD plazma sisteminin elektriksel güvenliğidir. Genellikle bu gibi durumlarda doku hasarı olup olmadığı ilgili örneğin görsel ve mikroskopik özellikler açısından incelenmesi ile anlaşılmaktadır. Plazma sisteminin uç kısmında meydana gelen elektriksel alan hücre zarının yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle hücre yüzeyinde oluşturulacak elektriksel alan ve tipin hücre yüzeyindeki pozisyonu çok iyi kontrol edilmelidir [60].

Soğuk atmosferik plazmayı karakterize eden plazma yoğunluğu, iyonizasyon miktarı, plazma sıcaklığı gibi parametreleri bilmek ve bunları istenilen aralıkta tutmak bu yöntemin canlı doku ve hücrelerdeki tedavi edici etkisini sağlamada önem arz etmektedir. İlerleyen teknolojik imkanlar farklı plazma üretim araçlarını da beraberinde getirmiştir. Özellikle kullanılan sistemin gaz deşarj türü, varsa farklı gazların karışımları ve gaz akış hızları gibi parametreler farklılık gösterebilmektedir. Plazma içeriği nedeniyle uygulandığı alanda termal etki, elektriksel etki, UV etkisi ya da radikal veya uyarılmış atom veya moleküller nedeniyle kimyasal etki oluşturabilmektedir. Bu derlemede incelenen pek çok çalışmada kanser tedavisi amacıyla kullanılan SAP sistemlerinin tümör hücrelerinde kimyasal süreçleri etkileyerek hücresel cevap oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu cevabın nekrotik, apoptotik veya genetik bir süreç olması uygulanan plazmanın türü, enerjisi, uygulama şekli ve süresi ile doğrudan ilişkilidir.

Dolaylı uygulamalarda besiyerdeki ROP ve reaktif nitrojen parçacıkları (RNP) besiyerin kompozisyonunu değiştirebilmektedir [61]. Ayrıca doğrudan uygulanan plazma tedavisinde plazma jet sisteminin ucu ile kanserli doku arasındaki mesafe azaldıkça ve uygulanan voltaj arttıkça plazma tarafından üretilen ROP miktarı da artmaktadır [62]. Bu nedenle güvenilir bir soğuk plazma kanser tedavisi için hücre içerisindeki ve yüzeyindeki ROP ve RNP miktarının ve aktivitesinin iyi kontrol edilmesi gerekmektedir.

Soğuk atmosferik plazma teknolojisi alanındaki önemli gelişmelere rağmen onkoloji tedavi sürecinde kullanılacak plazma üreteçlerine ait parametrelerin her kanser türü için optimize edilmesi ciddi bir güçlük teşkil etmektedir. Literatür incelemesi soğuk atmosferik plazmanın onkolojik tedavi amacıyla kullanımına yönelik araştırmaların daha çok klinik öncesi çalışmaları içerdiğini göstermektedir. Plazma teknolojisinin kanser hayvan modelleri üzerindeki olası etkilerinin daha iyi araştırılması ve bu alanda yapılacak olan yeni çalışmalar klinik çalışmalara geçilmesini hızlandıracaktır. Ayrıca SAP teknolojileri ile klasik tedavi yöntemlerinin birleştirilmesi veya nanoparçacık [43, 63], dendimer, lipozom [64] gibi yenilikçi biyomalzemelerin SAP ile birlikte uygulanması gelecekte daha etkin onkolojik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1] M. Ansari, M. Sharifian, M. H. Ehrampoush, A. H. Mahvi, M. H. Salmani, and H. Fallahzadeh, "Dielectric barrier discharge plasma with photocatalysts as a hybrid emerging technology for degradation of synthetic organic compounds in aqueous environments: A critical review," *Chemosphere*, vol. 263, Jan 2021, Art no. 128065, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128065.
- [2] A. Bogaerts, E. Neyts, R. Gijbels, and J. van der Mullen, "Gas discharge plasmas and their applications," (in English), *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, Review vol. 57, no. 4, pp. 609-658, Apr 2002, Art no. Pii s0584-8547(01)00406-2, doi: 10.1016/s0584-8547(01)00406-2.
- [3] E. Feizollahi, N. N. Misra, and M. S. Roopesh, "Factors influencing the antimicrobial efficacy of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Atmospheric Cold Plasma (ACP) in food processing applications," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 4, pp. 666-689, Feb 21 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1743967.
- [4] N. Xu, X. L. Cui, Z. Fang, Y. W. Shi, and R. Y. Zhou, "A Two-Mode Portable Atmospheric Pressure Air Plasma Jet Device for Biomedical Applications," (in English), *Ieee Transactions on Plasma Science*, Article vol. 46, no. 4, pp. 947-953, Apr 2018, doi: 10.1109/tps.2018.2810142.
- [5] F. Rezaei, B. Shokri, and M. Sharifian, "Atmospheric-pressure DBD plasma-assisted surface modification of polymethyl methacrylate: A study on cell growth/proliferation and antibacterial properties," *Applied Surface Science*, vol. 360, pp. 641-651, Jan 1 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.11.036.
- [6] S. A. Mir, M. A. Shah, and M. M. Mir, "Understanding the Role of Plasma Technology in Food Industry," (in English), *Food and Bioprocess Technology*, Review vol. 9, no. 5, pp. 734-750, May 2016, doi: 10.1007/s11947-016-1699-9.
- [7] S. Siadati, M. Pet'kova, A. J. Kenari, S. Kyzek, E. Galova, and A. Zahoranova, "Effect of a non-thermal atmospheric pressure plasma jet on four different yeasts," *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 54, no. 2, Jan 14 2021, Art no. 025204, doi: 10.1088/1361-6463/abb624.
- [8] H. W. Lee, S. H. Nam, A. A. H. Mohamed, G. C. Kim, and J. K. Lee, "Atmospheric Pressure Plasma Jet Composed of Three Electrodes: Application to Tooth Bleaching," (in English), *Plasma Processes and Polymers*, Article vol. 7, no. 3-4, pp. 274-280, Mar 2010, doi: 10.1002/ppap.200900083.
- [9] Y. Wang, Z. Wang, H. Yang, and X. Zhu, "Gas phase surface discharge plasma model for yeast inactivation in water," *Journal of Food Engineering*, vol. 286, Dec 2020, Art no. 110117, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110117.
- [10] N. Abramzon, J. C. Joaquin, J. Bray, and G. Brelles-Marino, "Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet," *Ieee Transactions on Plasma Science*, vol. 34, no. 4, pp. 1304-1309, Aug 2006, doi: 10.1109/tps.2006.877515.
- [11] M. S. I. Khan, E.-J. Lee, and Y.-J. Kim, "A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157: H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*," *Scientific Reports*, vol. 6, Nov 15 2016, Art no. 37072, doi: 10.1038/srep37072.
- [12] P. Guo *et al.*, "A novel atmospheric-pressure air plasma jet for wound healing," (in English), *International Wound Journal*, Article; Early Access p. 15, Jul 2021, doi: 10.1111/iwj.13652.
- [13] G. Fridman *et al.*, "Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air," (in English), *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, Article vol. 26, no. 4, pp. 425-442, Aug 2006, doi: 10.1007/s11090-006-9024-4.
- [14] P. S. G. Subramanian, A. Jain, A. M. Shivapuji, N. R. Sundaresan, S. Dasappa, and L. H. Rao, "Plasma-activated water from a dielectric barrier discharge plasma source for the selective treatment of cancer cells," (in English), *Plasma Processes and Polymers*, Article vol. 17, no. 8, p. 13, Aug 2020, Art no. e1900260, doi: 10.1002/ppap.201900260.
- [15] M. El Shaer, A. Zaki, A. M. Reda, M. Adel, M. Mobasher, and S. Ali, "Effect of Plasma Activated Mist on Breast Cancer Cells," (in English), *Ieee Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, Article vol. 2, no. 2, pp. 103-108, Mar 2018, doi: 10.1109/trpms.2017.2754580.
- [16] D. H. Xu *et al.*, "The effects of cold atmospheric plasma on cell adhesion, differentiation, migration, apoptosis and drug sensitivity of multiple myeloma," (in English), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Article vol. 473, no. 4, pp. 1125-1132, May 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.027.
- [17] Y. Binenbaum *et al.*, "Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma," (in English), *Plos One*, Article vol. 12, no. 1, p. 15, Jan 2017, Art no. e0169457, doi: 10.1371/journal.pone.0169457.
- [18] X. Tan, S. S. Zhao, Q. Lei, X. P. Lu, G. Y. He, and K. Ostrikov, "Single-Cell-Precision Microplasma-Induced Cancer Cell Apoptosis," (in English), *Plos One*, Article vol. 9, no. 6, p. 10, Jun 2014, Art no. e101299, doi: 10.1371/journal.pone.0101299.
- [19] Kim *et al.*, "Cancer Therapy: Single-Cell-Level Microplasma Cancer Therapy (Small 16/2011)," *Small*, vol. 7, no. 16, pp. 2290-2290, Aug. 2011 2011, doi: doi: 10.1002/smll.201190059.
- [20] E. S. M. Mouele, O. O. Fatoba, O. Babajide, K. O. Badmus, and L. F. Petrik, "U Review of the methods for determination of reactive oxygen species and suggestion for their application in advanced oxidation induced by dielectric barrier discharges," (in English), *Environmental Science and Pollution Research*, Review vol. 25, no. 10, pp. 9265-9282, Apr 2018, doi: 10.1007/s11356-018-1392-9.
- [21] A. Rahal *et al.*, "Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay," (in English), *Biomed Research International*, Review vol. 2014, p. 19, 2014, Art no. 761264, doi: 10.1155/2014/761264.
- [22] A. Tovmasyan *et al.*, "A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics," (in English), *Free Radical Biology and Medicine*, Article vol. 86, pp. 308-321, Sep 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.018.

- [23] L. J. Su *et al.*, "Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis," (in English), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Review vol. 2019, p. 13, Oct 2019, Art no. 5080843, doi: 10.1155/2019/5080843.
- [24] B. T. Ashok, J. Ahmad, A. Qadri, and R. Ali, "Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage," (in English), *Biochemistry and Molecular Biology International*, Article vol. 43, no. 6, pp. 1219-1229, Dec 1997, doi:10.1080/15216549700205051..
- [25] B. Aryal and V. A. Rao, "Specific protein carbonylation in human breast cancer tissue compared to adjacent healthy epithelial tissue," (in English), *Plos One*, Article vol. 13, no. 3, p. 14, Mar 2018, Art no. e0194164, doi: 10.1371/journal.pone.0194164.
- [26] A. Privat-Maldonado *et al.*, "ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy," (in English), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Review vol. 2019, p. 29, Oct 2019, Art no. 9062098, doi: 10.1155/2019/9062098.
- [27] P. T. Schumacker, "Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword," (in English), *Cancer Cell*, Editorial Material vol. 10, no. 3, pp. 175-176, Sep 2006, doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.015.
- [28] G. Sirokmany, A. Donko, and M. Geiszt, "Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models," (in English), *Trends in Pharmacological Sciences*, Review vol. 37, no. 4, pp. 318-327, Apr 2016, doi: 10.1016/j.tips.2016.01.006.
- [29] K. A. Kang *et al.*, "Non-thermal dielectric-barrier discharge plasma induces reactive oxygen species by epigenetically modifying the expression of NADPH oxidase family genes in keratinocytes," (in English), *Redox Biology*, Article vol. 37, p. 11, Oct 2020, Art no. 101698, doi: 10.1016/j.redox.2020.101698.
- [30] Y. H. Ma *et al.*, "Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Preferentially Induces Apoptosis in p53-Mutated Cancer Cells by Activating ROS Stress-Response Pathways," (in English), *Plos One*, Article vol. 9, no. 4, p. 14, Apr 2014, Art no. e91947, doi: 10.1371/journal.pone.0091947.
- [31] S. U. Kang *et al.*, "Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species," (in English), *Cell Death & Disease*, Article vol. 5, p. 10, Feb 2014, Art no. e1056, doi: 10.1038/cddis.2014.33.
- [32] M. Schuster *et al.*, "Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer," (in English), *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, Article vol. 44, no. 9, pp. 1445-1452, Sep 2016, doi: 10.1016/j.jcms.2016.07.001.
- [33] I. Yajima *et al.*, "Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expressions in melanocytic tumors of RET-transgenic mice," (in English), *Experimental Dermatology*, Article vol. 23, no. 6, pp. 424-425, Jun 2014, doi: 10.1111/exd.12415.
- [34] Z. B. Zhang *et al.*, "Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity," (in English), *Nature*, Article vol. 579, no. 7799, pp. 415-+, Mar 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2071-9.
- [35] X. R. Yang *et al.*, "Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells," (in English), *Cell Death & Disease*, Article vol. 11, no. 4, p. 11, Apr 2020, doi: 10.1038/s41419-020-2459-3.
- [36] L. V. Yuzefovych, S. P. LeDoux, G. L. Wilson, and L. I. Rachek, "Mitochondrial DNA Damage via Augmented Oxidative Stress Regulates Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy: Crosstalk, Links and Signaling," (in English), *Plos One*, Article vol. 8, no. 12, p. 5, Dec 2013, Art no. e83349, doi: 10.1371/journal.pone.0083349.
- [37] T. J. Fan, L. H. Han, R. S. Cong, and J. Liang, "Caspase family proteases and apoptosis," (in English), *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, Review vol. 37, no. 11, pp. 719-727, Nov 2005, doi: 10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.
- [38] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. Kondo, and M. Hod, "Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network," (in English), *Free Radical Biology and Medicine*, Article vol. 79, pp. 28-44, Feb 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.014.
- [39] A. Troyano, P. Sancho, C. Fernandez, E. de Blas, P. Bernardi, and P. Aller, "The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 8, pp. 889-898, Aug 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401249.
- [40] X. Q. Cheng *et al.*, "Canady Helios Cold Plasma Induces Breast Cancer Cell Death by Oxidation of Histone mRNA," (in English), *International Journal of Molecular Sciences*, Article vol. 22, no. 17, p. 22, Sep 2021, Art no. 9578, doi: 10.3390/ijms22179578.
- [41] S. Lee *et al.*, "Cold atmospheric plasma restores tamoxifen sensitivity in resistant MCF-7 breast cancer cell," (in English), *Free Radical Biology and Medicine*, Article vol. 110, pp. 280-290, Sep 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.017.
- [42] A. Schmidt, S. Bekeschus, T. von Woedtke, and S. Hasse, "Cell migration and adhesion of a human melanoma cell line is decreased by cold plasma treatment," (in English), *Clinical Plasma Medicine*, Article vol. 3, no. 1, pp. 24-31, Jun 2015, doi: 10.1016/j.cpme.2015.05.003.
- [43] M. Adhikari *et al.*, "Cold Atmospheric Plasma as a Novel Therapeutic Tool for the Treatment of Brain Cancer," (in English), *Current Pharmaceutical Design*, Review vol. 26, no. 19, pp. 2195-2206, 2020, doi: 10.2174/1381612826666200302105715.
- [44] X. Q. Cheng, J. Sherman, W. Murphy, E. Ratovitski, J. Canady, and M. Keidar, "The Effect of Tuning Cold Plasma Composition on Glioblastoma Cell Viability," (in English), *Plos One*, Article vol. 9, no. 5, p. 9, May 2014, Art no. e98652, doi: 10.1371/journal.pone.0098652.

- [45] M. Akter, A. Jangra, S. A. Choi, E. H. Choi, and I. Han, "Non-Thermal Atmospheric Pressure Bio-Compatible Plasma Stimulates Apoptosis via p38/MAPK Mechanism in U87 Malignant Glioblastoma," *Cancers*, vol. 12, no. 1, Jan 2020, Art no. 245, doi: 10.3390/cancers12010245.
- [46] G. E. Conway *et al.*, "Cold Atmospheric Plasma induces accumulation of lysosomes and caspase-independent cell death in U373MG glioblastoma multiforme cells," (in English), *Scientific Reports*, Article vol. 9, p. 12, Sep 2019, Art no. 12891, doi: 10.1038/s41598-019-49013-3.
- [47] E. Tavares-da-Silva *et al.*, "Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line," (in English), *Biology-Basel*, Article vol. 10, no. 1, p. 19, Jan 2021, Art no. 41, doi: 10.3390/biology10010041.
- [48] H. Zhang *et al.*, "Antitumor effects of hyperthermia with plasma-treated solutions on 3D bladder tumor spheroids," (in English), *Plasma Processes and Polymers*, Article vol. 18, no. 10, p. 8, Oct 2021, Art no. e2100070, doi: 10.1002/ppap.202100070.
- [49] N. Kaushik, N. Kumar, C. H. Kim, N. K. Kaushik, and E. H. Choi, "Dielectric Barrier Discharge Plasma Efficiently Delivers an Apoptotic Response in Human Monocytic Lymphoma," (in English), *Plasma Processes and Polymers*, Article vol. 11, no. 12, pp. 1175-1187, Dec 2014, doi: 10.1002/ppap.201400102.
- [50] K. Panngom, K. Y. Baik, M. K. Nam, J. H. Han, H. Rhim, and E. H. Choi, "Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma," (in English), *Cell Death & Disease*, Article vol. 4, p. 8, May 2013, Art no. e642, doi: 10.1038/cddis.2013.168.
- [51] W. T. Li *et al.*, "Cold atmospheric plasma and iron oxide-based magnetic nanoparticles for synergetic lung cancer therapy," (in English), *Free Radical Biology and Medicine*, Article vol. 130, pp. 71-81, Jan 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.429.
- [52] R. M. Walk *et al.*, "Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 48, no. 1, pp. 67-73, Jan 2013, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.10.020.
- [53] F. Saadati, H. Mahdikia, H. A. Abbaszadeh, M. A. Abdollahifar, M. S. Khoramgah, and B. Shokri, "Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment," (in English), *Scientific Reports*, Article vol. 8, p. 15, May 2018, Art no. 7689, doi: 10.1038/s41598-018-25990-9.
- [54] N. K. Kaushik, Y. H. Kim, Y. G. Han, and E. H. Choi, "Effect of jet plasma on T98G human brain cancer cells," (in English), *Current Applied Physics*, Article vol. 13, no. 1, pp. 176-180, Jan 2013, doi: 10.1016/j.cap.2012.07.002.
- [55] M. Wang, B. Holmes, X. Q. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, and L. G. Zhang, "Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells," (in English), *Plos One*, Article vol. 8, no. 9, p. 11, Sep 2013, Art no. e73741, doi: 10.1371/journal.pone.0073741.
- [56] Z. T. Chen, L. Lin, E. Gjika, X. Q. Cheng, J. Canady, and M. Keidar, "Selective Treatment of Pancreatic Cancer Cells by Plasma-Activated Saline Solutions," (in English), *Ieee Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, Article vol. 2, no. 2, pp. 116-120, Mar 2018, doi: 10.1109/trpms.2017.2761192.
- [57] N. Kumar, P. Attri, S. Dewilde, and A. Bogaerts, "Inactivation of human pancreatic ductal adenocarcinoma with atmospheric plasma treated media and water: a comparative study," (in English), *Journal of Physics D-Applied Physics*, Article vol. 51, no. 25, p. 10, Jun 2018, Art no. 255401, doi: 10.1088/1361-6463/aac571.
- [58] M. Ishaq, Z. J. Han, S. Kumar, M. D. M. Evans, and K. Ostrikov, "Atmospheric-Pressure Plasma- and TRAIL-Induced Apoptosis in TRAIL-Resistant Colorectal Cancer Cells," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 12, no. 6, pp. 574-582, Jun 2015, doi: 10.1002/ppap.201400207.
- [59] Y. S. Ko *et al.*, "Radioresistant breast cancer cells exhibit increased resistance to chemotherapy and enhanced invasive properties due to cancer stem cells," (in English), *Oncology Reports*, Article vol. 40, no. 6, pp. 3752-3762, Dec 2018, doi: 10.3892/or.2018.6714.
- [60] P. T. Vernier, Y. H. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, and M. A. Gundersen, "Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation," (in English), *Biophysical Journal*, Article vol. 86, no. 6, pp. 4040-4048, Jun 2004, doi: 10.1529/biophysj.103.037945.
- [61] K. K. Pai, K. Singarapu, J. D. Jacob, and S. V. Madihally, "Dose Dependent Selectivity and Response of Different Types of Mammalian Cells to Surface Dielectric Barrier Discharge (SDBD) Plasma," (in English), *Plasma Processes and Polymers*, Article vol. 12, no. 7, pp. 666-677, Jul 2015, doi: 10.1002/ppap.201400134.
- [62] J. He and Y. T. Zhang, "Generation of Reactive Oxygen Species in Helium-Oxygen Radio-Frequency Discharges at Atmospheric Pressure," (in English), *Ieee Transactions on Plasma Science*, Article vol. 41, no. 10, pp. 2979-2986, Oct 2013, doi: 10.1109/tps.2013.2279678.
- [63] E. Manaloto *et al.*, "Cold atmospheric plasma induces silver nanoparticle uptake, oxidative dissolution and enhanced cytotoxicity in glioblastoma multiforme cells," (in English), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Article vol. 689, p. 12, Aug 2020, Art no. 108462, doi: 10.1016/j.abb.2020.108462.
- [64] K. Pefani-Antimisiari *et al.*, "Synergistic effect of cold atmospheric pressure plasma and free or liposomal doxorubicin on melanoma cells," (in English), *Scientific Reports*, Article vol. 11, no. 1, p. 15, Jul 2021, Art no. 14788, doi: 10.1038/s41598-021-94130-7.
- [65] R. Verloy, A. Privat-Maldonado, E. Smits, and A. Bogaerts, "Cold Atmospheric Plasma Treatment for Pancreatic Cancer-The Importance of Pancreatic Stellate Cells," (in English), *Cancers*, Review vol. 12, no. 10, p. 21, Oct 2020, Art no. 2782, doi: 10.3390/cancers12102782.