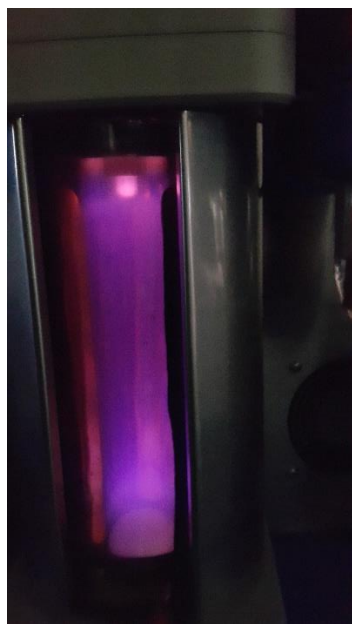


BLUE LAGOON WATER DYSZA VIOLET RAY

Bio-odnowa Organizmu Na najgłębszych poziomach

AmaranthinoCosmetics
Tel. 607 393 495, 500 686 354
Email: adam@amaranthinocosmetics.com



Woda Blue Lagoon jest BARDZO specjalną wodą.

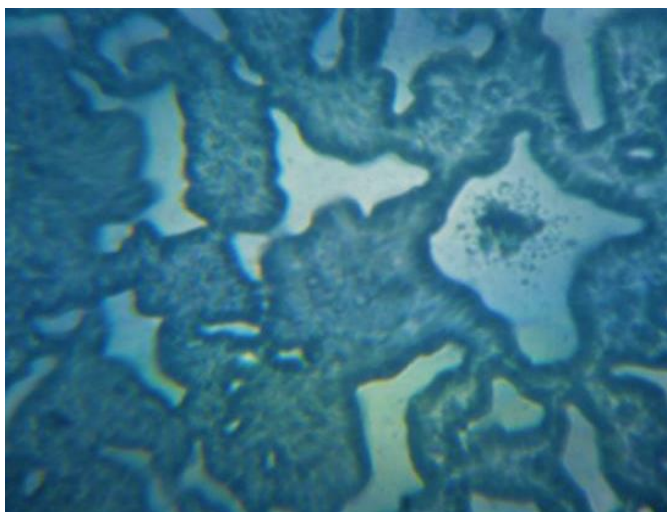
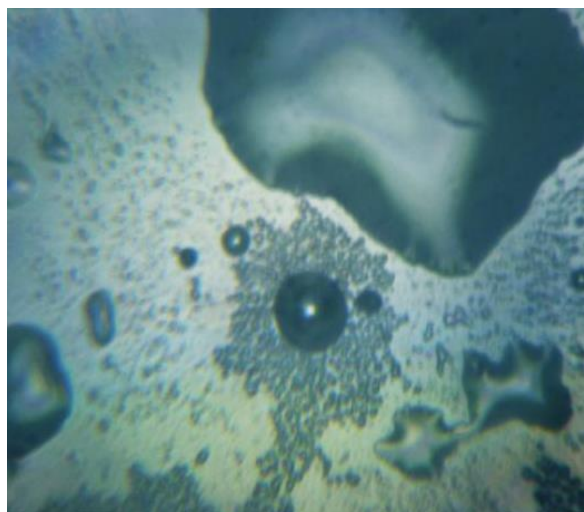
Uzyskuję ją przepuszczając wodę przez Reaktor Wyładowania Jarzeniowego Blue Lagoon, który w ściśle określonej próżni wytwarza niezwykłą „Plazmę” (zdjęcie u góry po lewej).

Wyładowanie to powoduje, że z substancji umieszczonych w środku reaktora: czyste złoto, srebro, miedź, magnez, cynk, potas, selen, bizmut, czarny krzemień, biały krzem odrywają się atomy tych substancji i ich jony zostają zawieszone w wodzie.

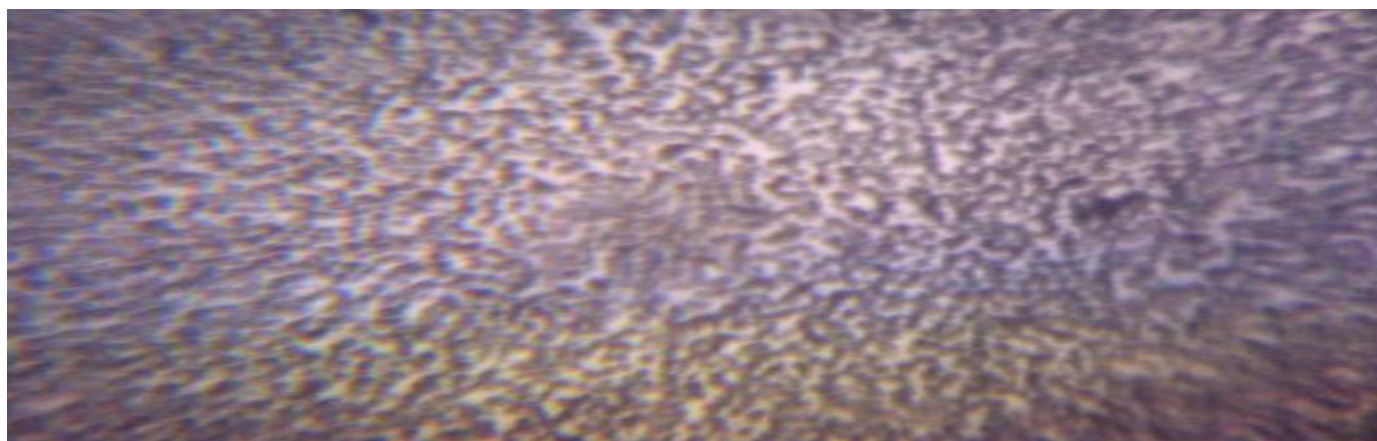
Oprócz tego Wyładowanie Jarzeniowe powoduje rozbitcie wody (każdej ze „zbitków molekuł” (clusters) na poszczególne molekuly o średnicy **1 nanometra!**

Dlatego też wszystko co znajduje się w tej wodzie jest mocno przyswajalne przez organizm i zanoszone daleko w jego głąb.

Dla przykładu, średnica włosa ma 80 000 nanometrów, najmniejsza bakteria 200 nanometrów.



Przykłady typowej wody pitnej



Woda o cząstkach wielkości 1 nanometra z Reaktora Wyładowania Jarzeniowego Blue Lagoon

Woda Blue Lagoon nie ma wolnych rodników.

W wyniku działania Reaktora, wszystkie szkodliwe, promieniotwórcze dla nas izotopy tlenu znajdujące się w wodzie po wielu wybuchach bomb atomowych ok. 3000 testów) i katastrof reaktorów atomowych zostają unieszkodliwione. W ostatnich 30 latach ilość tych promieniotwórczych izotopów tlenu w wodzie (każdej wodzie, w oceanach, w rzekach, w kranie) DRAMATYCZNIE wzrosła. I to właśnie te szkodliwe izotopy tlenu są przyczyną wielu strasznych rzeczy w naszych organizmach.

Dlatego też woda Blue Lagoon ma zdolność przenikania przez błony wszystkich komórek w organizmie człowieka a także przez błony jądra komórek.

Woda Blue Lagoon o strukturze jednocząsteczkowej łatwo i szybko przechodzi przez błony komórkowe oraz przez powłokę jądra. W wypadku kiedy taka woda przedostanie się do jądra uszkodzonej komórki powoduje zniszczenie uszkodzonej matrycy gigaklastra, co prowadzi do eliminacji odcinka DNA a w rezultacie do utraty możliwości replikacji i śmierci komórki.

Niektóre źródła na podstawie badań klinicznych podają, iż:

„Sól fizjologiczna poddana działaniu plazmy eliminuje komórki z uszkodzonym DNA, co pozwala na wyselekcjonowanie komórek zawierających jednolite i prawidłowe DNA, a tym samym poprawę funkcji tkanek i narządów.

Ponadto, wspomaganie efektywnej pracy w komórkach na poziomie struktur wewnątrzkomórkowych, głównie mitochondriów, powoduje utrzymywanie produkcji energii na poziomie wystarczającym dla wszystkich procesów wewnątrzkomórkowych.”

Oraz:

Mechanizmy DZIAŁANIA SOLI FIZJOLOGICZNEJ PODDANEJ DZIAŁANIU „PLAZMY” (hodowle komórkowe – rak jelita, białaczka szpikowa, cytometria przepływowa, test MTT, mikroskop elektronowy):

- Stymulacja procesów apoptozy (programowanej śmierci) w komórkach zmienionych nowotworowo, poprzez aktywację kaspazy 3
- Aktywacja rozpadu jąder komórkowych z fragmentacją DNA w komórkach nowotworowych
- Zahamowanie podziałów komórek nowotworowych i zmniejszenie liczby komórek nowotworowych (zmniejszenie proliferacji)
- Zahamowanie procesów naprawczych uszkodzeń DNA, co może ograniczać przetrwanie i oporność komórek nowotworowych na leki
- Brak wpływu ww. na komórki zdrowe (fibroblasty)

Skutki działania wody Blue Lagoon w organizmie mogą przejawiać się następująco:

- ☐ Znaczne zmniejszenie ilości spożywanego pokarmu, bowiem większa ilość jest absorbowana przez organizm.
- ☐ Znaczne zwiększenie witalności organizmu.
- ☐ Znaczne zwiększenie wydolności całego organizmu.
- ☐ Zwiększone Libido
- ☐ Pomoc w niwelowaniu nieraz bardzo długotrwałych różnych uszkodzeń i problemów w organizmie
- ☐ Nasiona moczone przez kilka minut w tej wodzie dają piękne plony. Podlewanie też.

WYNIKI BADAŃ WODY BLUE LAGOON WYKONANYCH SPEKTROGRAFEM PÓLTORSYJNYCH

Próbki 8 i 9 (przesłane 1.10.2016) mierzone w butelce

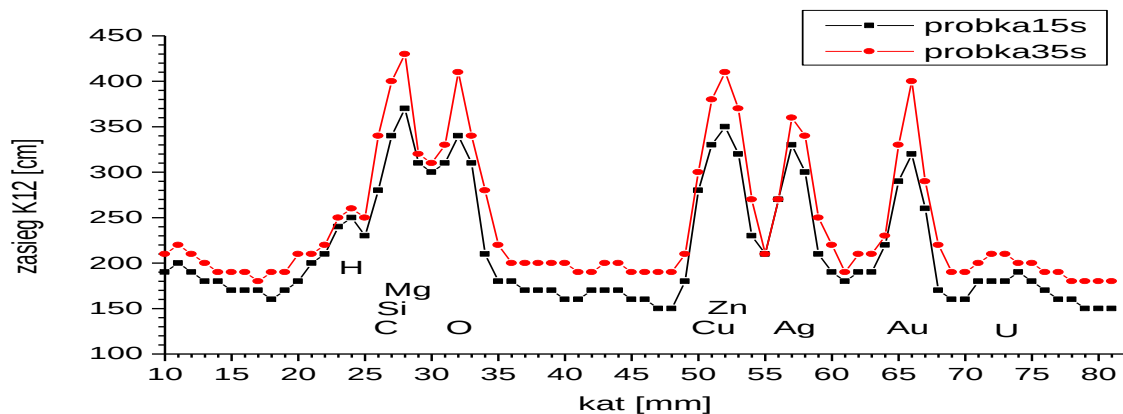
Kategoria	Próbka 8 15s w butelce	Próbka 9 35s w butelce
	zasięg [cm]	zasięg [cm]
K1	220	240
K2	200	220
K3	230	250
K4	250	310
K5	190	190
K6	250	380
K7	200	210
K8	270	330
K9	230	250
K10	230	260
K11	230	250
K12	290	400

Przepływ wody 15 sekund (próbka 8)

Przepływ wody 35 sekund (próbka 9)

kąt		próbka 7 z 23.09.2016 x1x1,1	próbka 8 x1	próbka 8 x1 rezonans	próbka 9 x1	Pierwiastek
[mm]	[stopni -90]	zasięg K8	zasięg K12	zasięg K12	zasięg K12	
10	41,55	190	190		210	
11	42,205	200	200		220	
12	42,86	190	190		210	
13	43,515	180	180		200	
14	44,17	170	180		190	
15	44,825	170	170		190	
16	45,48	170	170		190	
17	46,135	160	170		180	
18	46,79	160	160		190	
19	47,445	160	170		190	
20	48,1	170	180		210	
21	48,755	200	200		210	
22	49,41	290	210		220	
23	50,065	330	240		250	
24	50,72	320	250	+C 260 +HCl 290	260	H
25	51,375	290	230		250	
26	52,03	280	280	+C 320	340	C
27	52,685	220	340	+Si 370	400	Si
28	53,34	240	370	+Mg 470	430	Mg
29	53,995	230	310		320	
30	54,65	240	300		310	
31	55,305	310	310		330	
32	55,96	320	340		410	O
33	56,615	310	310		340	
34	57,27	230	210		280	
35	57,925	180	180		220	
36	58,58	170	180		200	
37	59,235	160	170		200	
38	59,89	170	170		200	
39	60,545	170	170		200	
40	61,2	170	160		200	
41	61,855	160	160		190	
42	62,51	180	170		190	
43	63,165	190	170		200	
44	63,82	180	170		200	
45	64,475	160	160		190	

46	65,13	160	160		190	
47	65,785	160	150		190	
48	66,44	170	150		190	
49	67,095	200	180		210	
50	67,75	280	280		300	
51	68,405	330	330	+Cu 390	380	
52	69,06	350	350	+Zn 420	410	Cu, Zn
53	69,715	310	320		370	
54	70,37	220	230		270	
55	71,025	190	210		210	
56	71,68	250	270		270	
57	72,335	330	330		360	Ag
58	72,99	300	300	+Ag 400	340	
59	73,645	220	210		250	
60	74,3	190	190		220	
61	74,955	190	180		190	
62	75,61	210	190		210	
63	76,265	210	190		210	
64	76,92	220	220		230	
65	77,575	300	290	+Au 360	330	
66	78,23	310	320		400	Au
67	78,885	220	260		290	
68	79,54	170	170		220	
69	80,195	160	160		190	
70	80,85	170	160		190	
71	81,505	180	180		200	
72	82,16	180	180		210	
73	82,815	170	180		210	
74	83,47	180	190		200	
75	84,125	180	180		200	
76	84,78	170	170		190	
77	85,435	160	160		190	
78	86,09	150	160		180	
79	86,745	150	150		180	
80	87,4	150	150		180	
81	88,055	160	150		180	



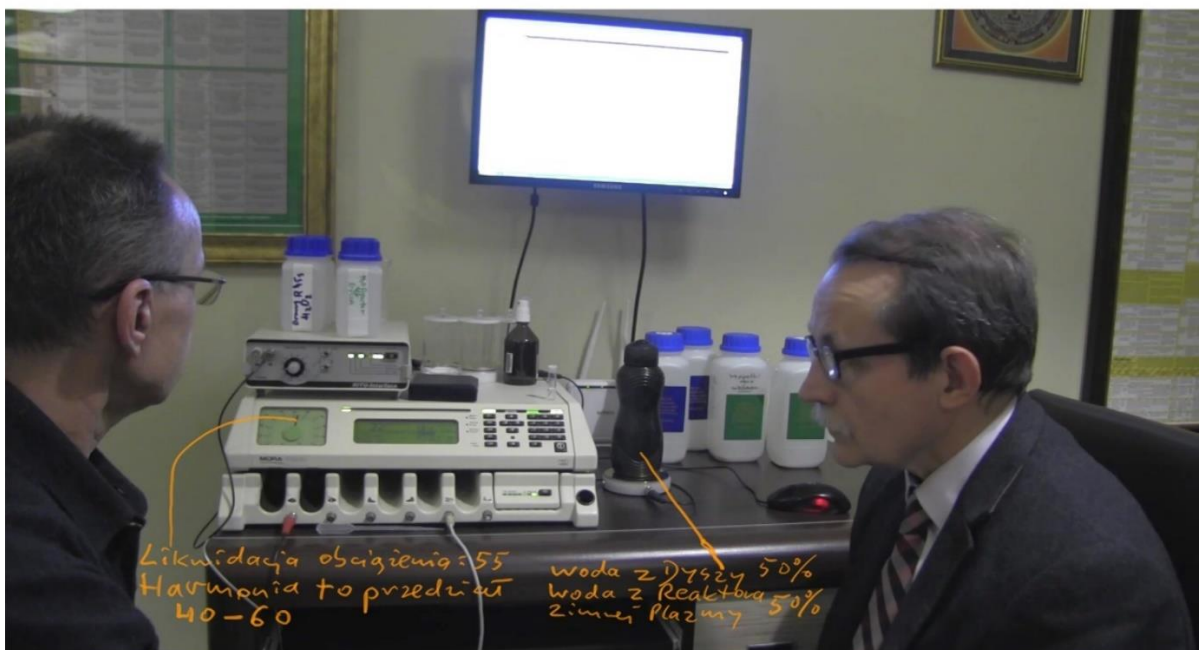
Powyżej widać ilościową zawartość jonów poszczególnych minerałów i metali w wodzie Blue Lagoon.

Poniżej znajdują się fotografie z badań Wody Blue Lagoon, Ormusa i wody z Dyszy Violet Ray. Urządzenie diagnostyczne biorezonansowe znanej na całym świecie niemieckiej firmy MORA. Obciążaliśmy organizm następującymi obciążeniami: guzy złośliwe, trucizna chemiczna, papierosy i badaliśmy wpływ wyżej wymienionych substancji na likwidację tychże obciążeń.

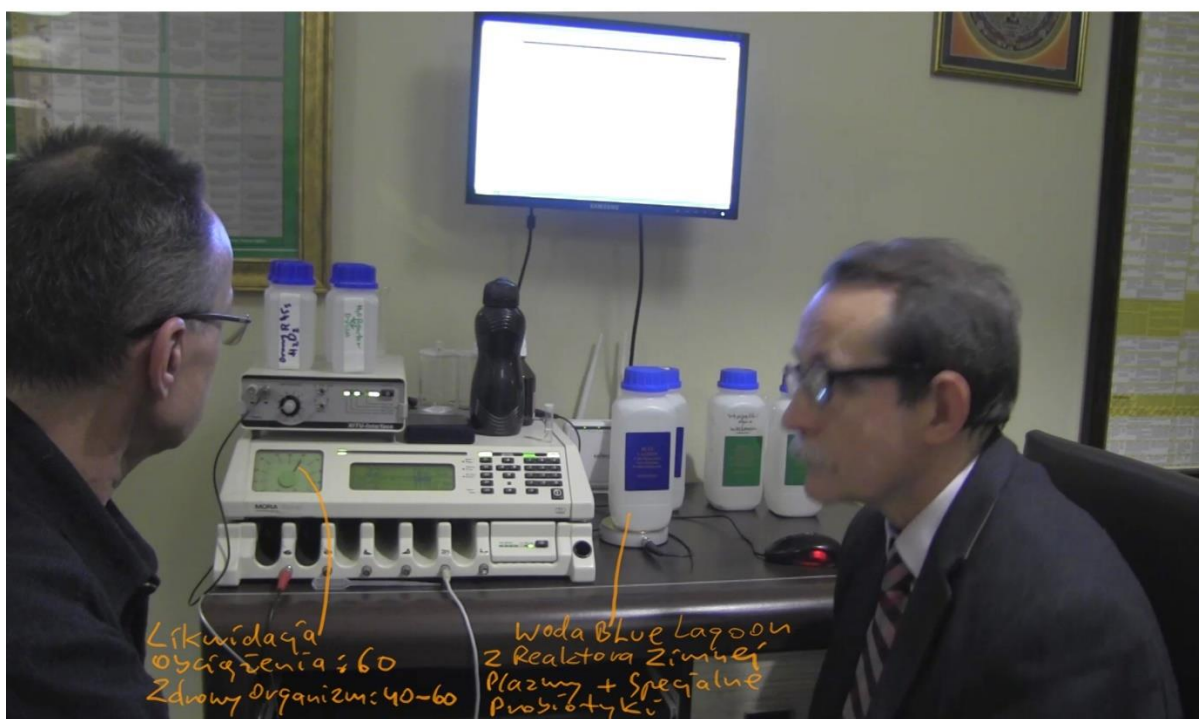
Obciążenie organizmu nowotworem (guzami złośliwymi)



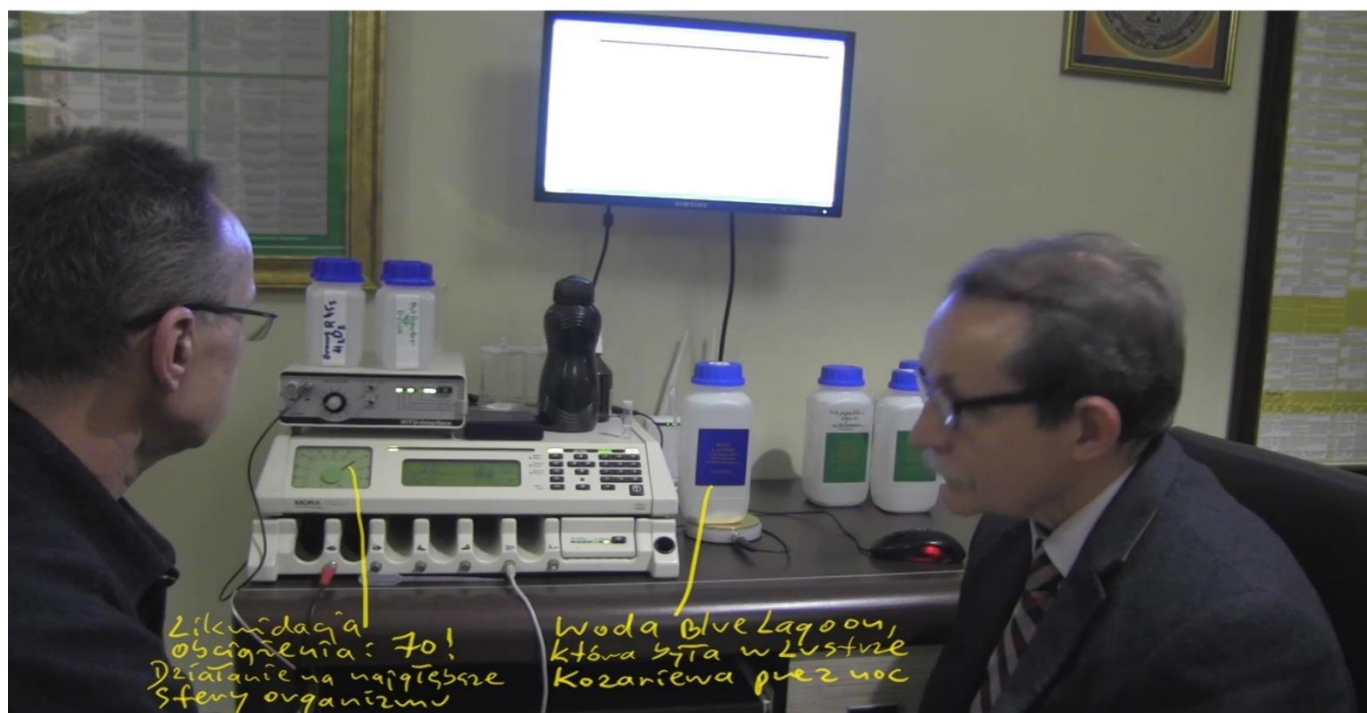
Czarna strzałka na urządzeniu pokazuje ogromne obciążenie organizmu. Załedwie 20 na skali 0-100. Prawidłowy odczyt zdrowej tkanki to przedział 40-60.



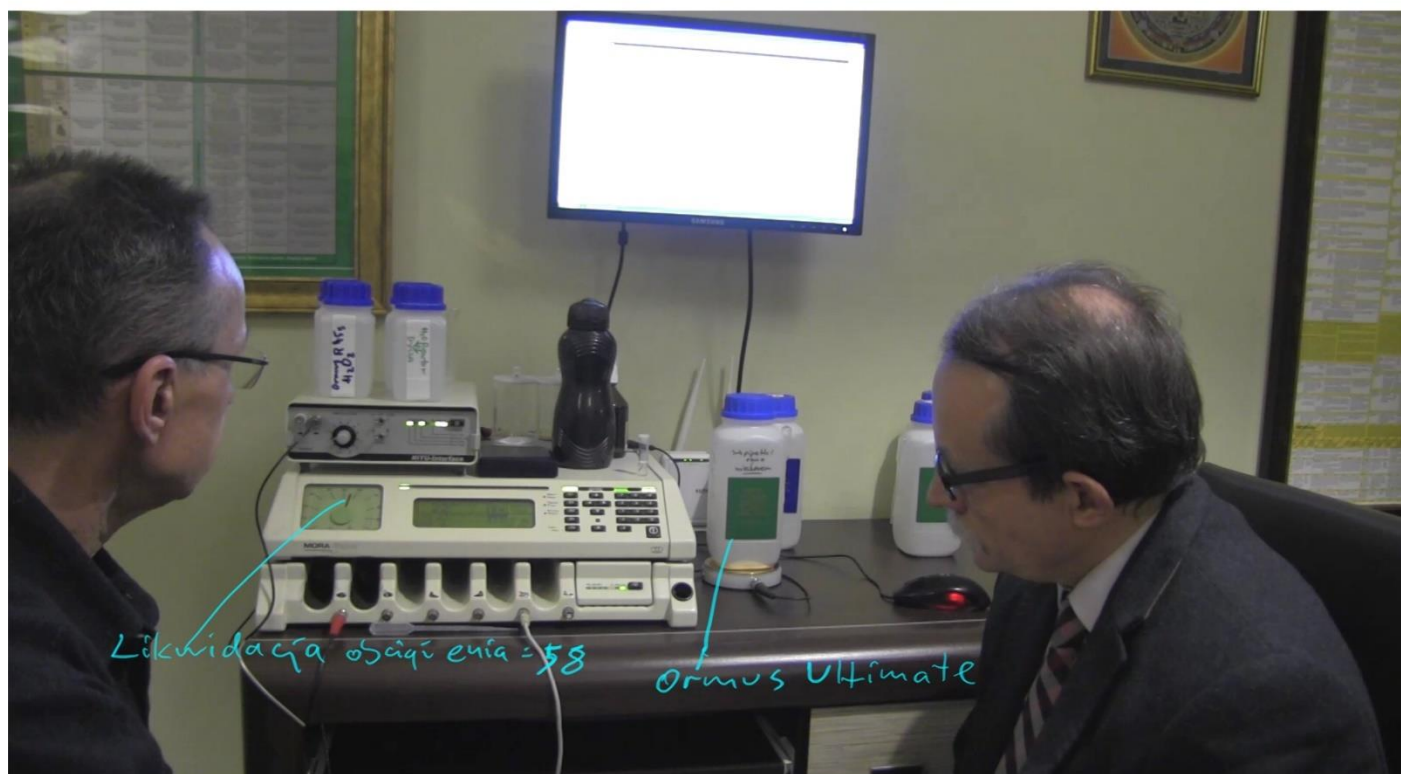
W czarnej butelce znajduje się woda z Reaktora Wyladowania Jarzeniowego Blue Lagoon zmieszana z wodą z Dyszy Violet Ray. Obciążenie zostało usunięte i strzałka pokazuje przedział harmonii 55.



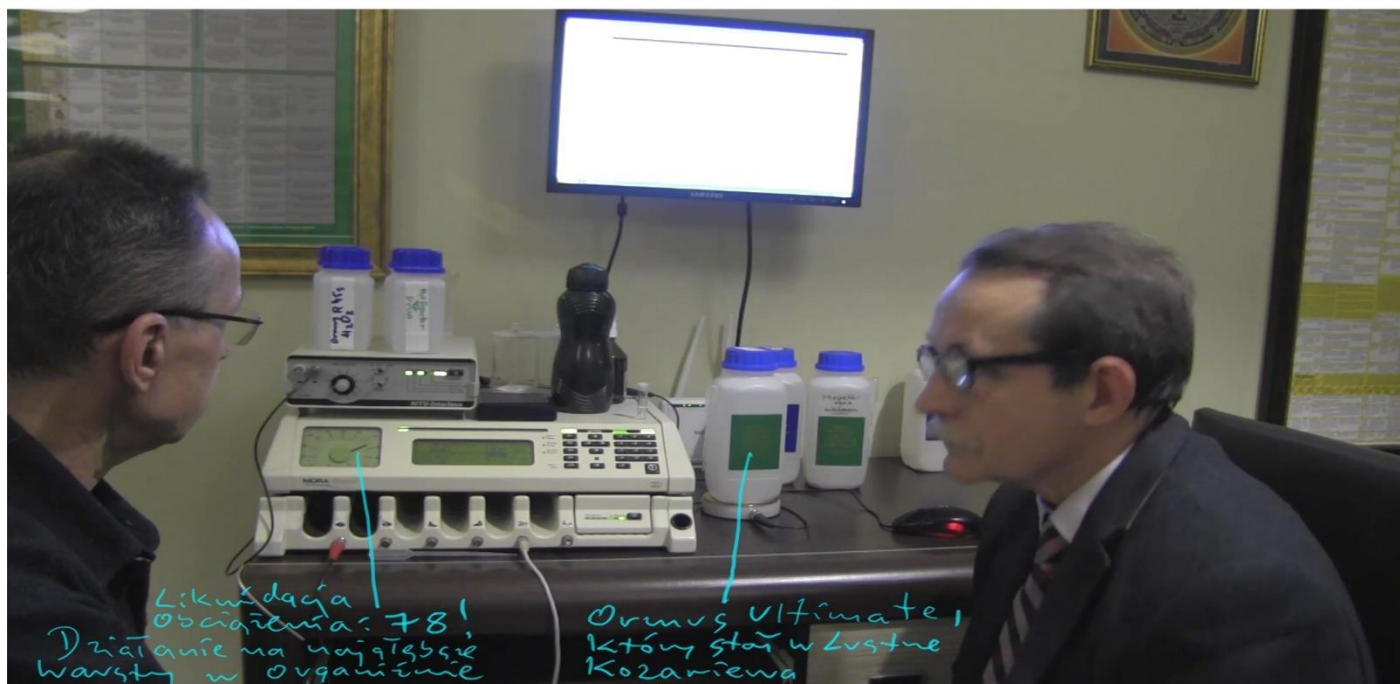
Teraz w urządzeniu znajduje się tylko woda z Reaktora Blue Lagoon ze specjalnymi probiotykami. Obciążenie zostało usunięte i strzałka pokazuje przedział harmonii 60 maximum zdrowia.



Teraz w urządzeniu znajduje się tylko woda z Reaktora Blue Lagoon ze specjalnymi probiotykami, która znajdowała się przez noc w Łustrze Kozariewa. Obciążenie zostało usunięte i strzałka pokazuje przedział harmonii 70 ! Jest to działanie na najgłębsze warstwy organizmu. Niespotykane!

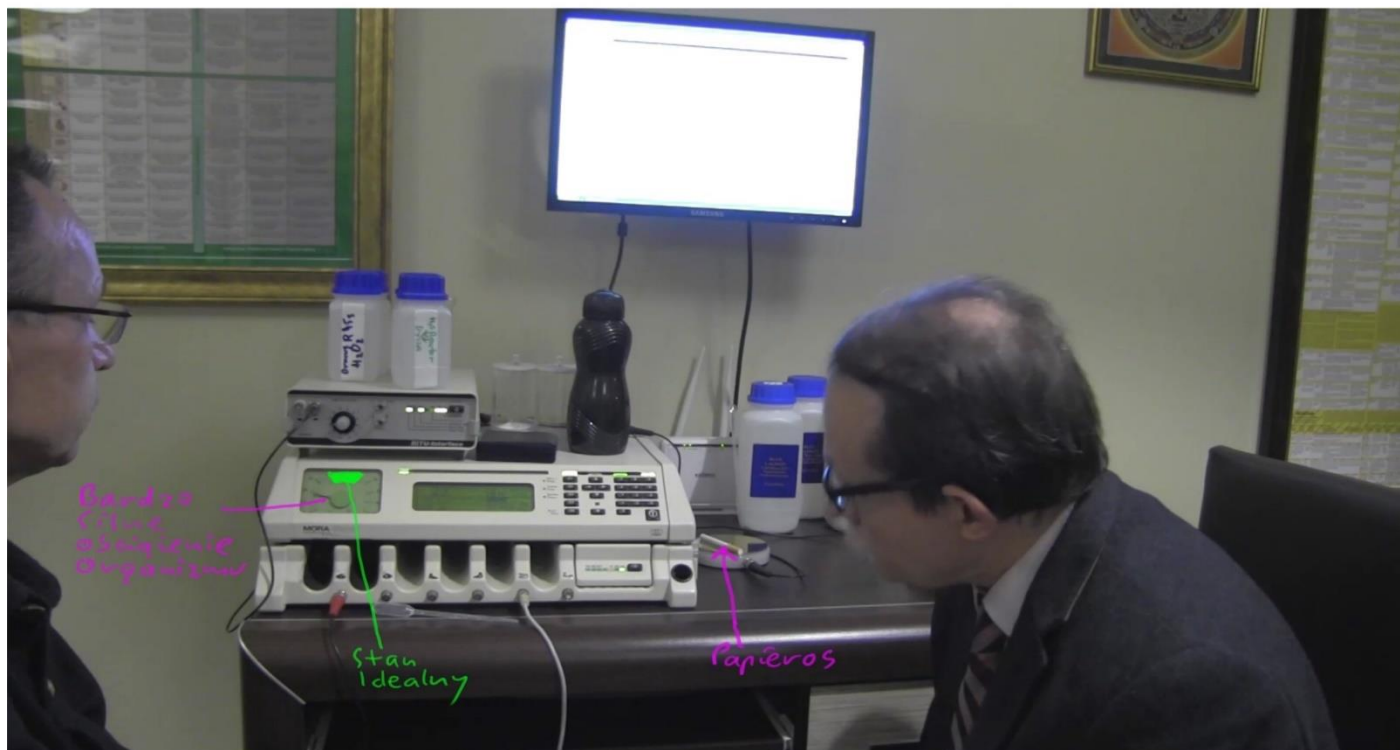


Teraz w urządzeniu znajduje się tylko woda z Ormus Ultimate składający się z Ormusa Extreme (mieszanka 5 rodzajów Ormusa), wody z Reaktora Blue Lagoon wraz ze specjalnymi probiotykami. Obciążenie zostało usunięte i strzałka pokazuje przedział harmonii 58 - maximum zdrowia.



Teraz w urządzeniu znajduje się tylko woda z Ormus Ultimate składający się z Ormusa Extreme (mieszanka 5 rodzajów Ormusa), wody z Reaktora Zimnej Blue Lagoon wraz ze specjalnymi probiotykami, który był w Lustrze Kozariewa. Obciążenie zostało usunięte i strzałka pokazuje przedział harmonii 78!! Niespotykane oddziaływanie na najgłębsze warstwy organizmu.

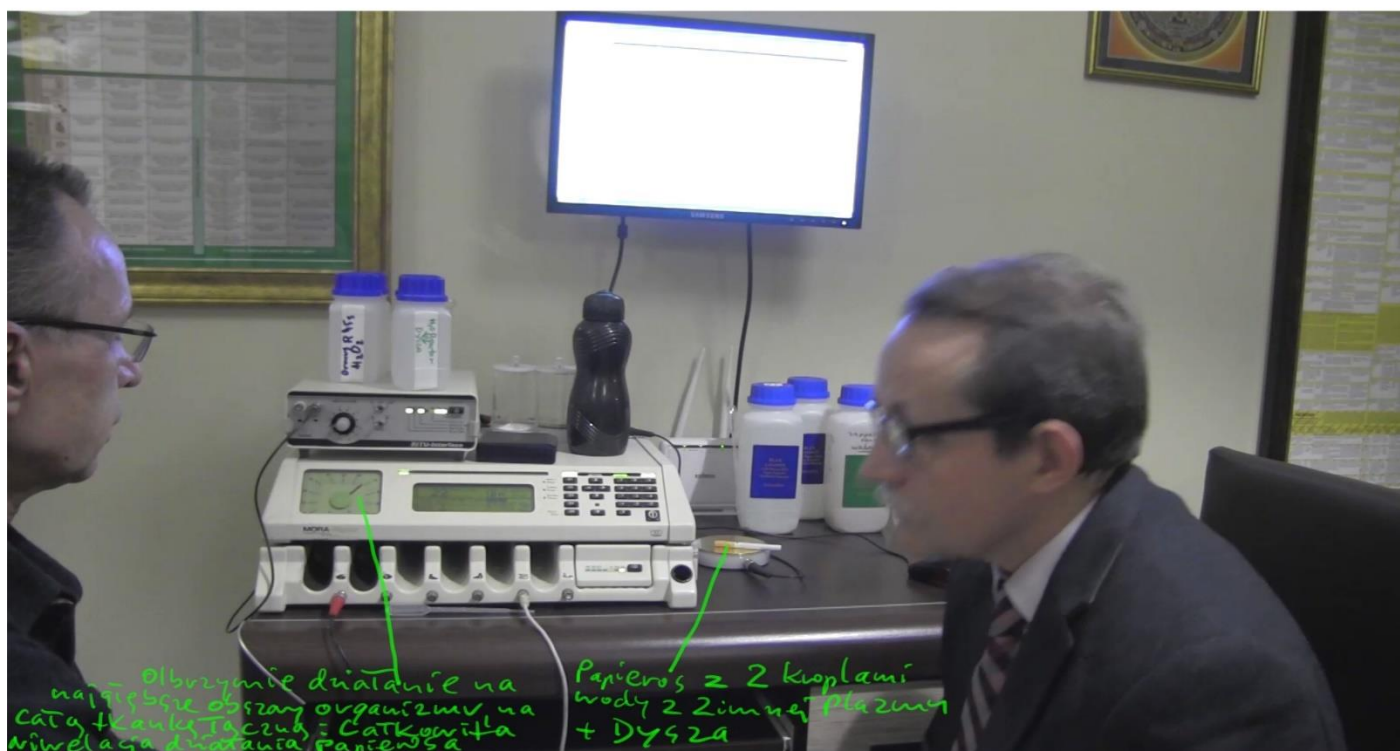
Ociążenie organizmu papierosem:



W urządzeniu znajduje papieros z ustnikiem znanej firmy amerykańskiej. Jak widać obciążenie organizmu jest porównywalne do obciążenia nowotworem. Strzałka jest na cyfrze 20.



Dodajemy 2 krople wody Blue Lagoon do ustnika i kładziemy z powrotem do urządzenia.

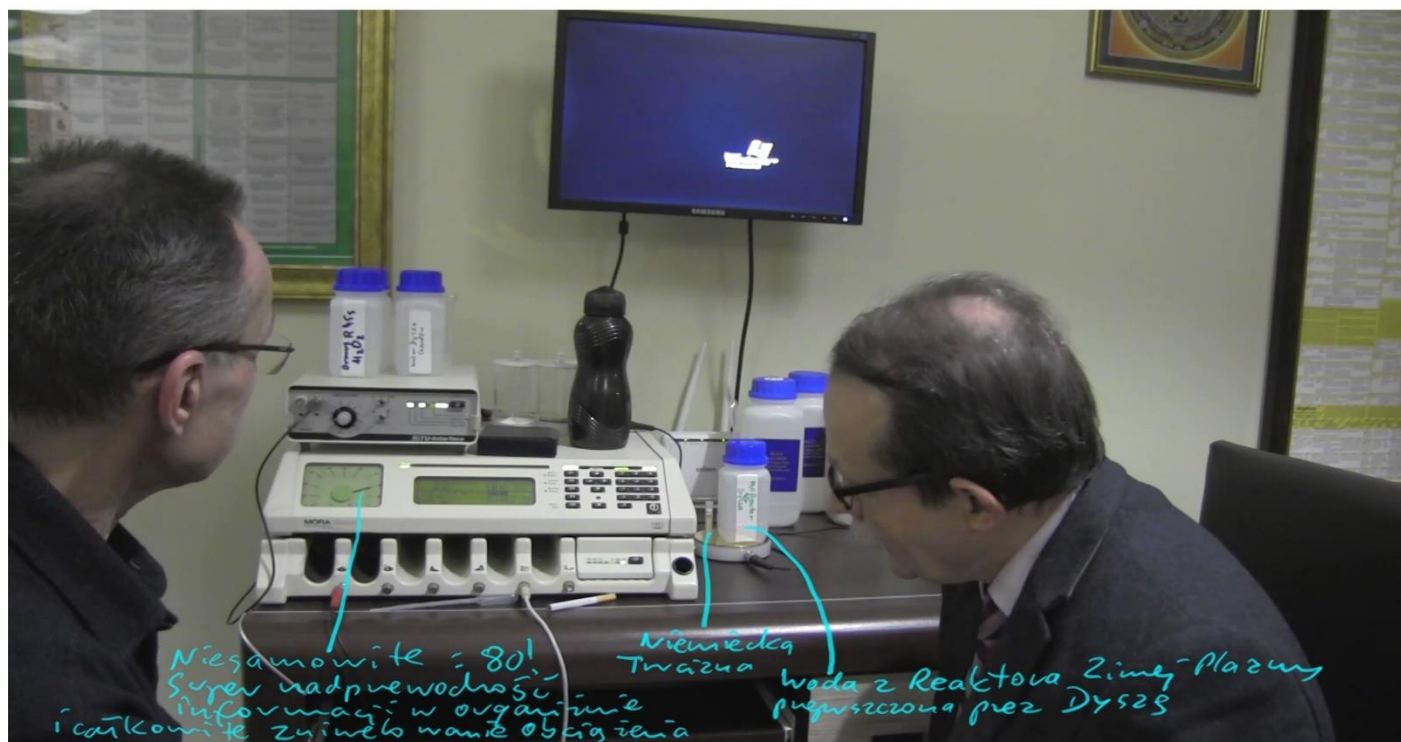


Jak widać na zdjęciu, NATYCHMIAST obciążenie zostało zniwelowane a strzałka pokazuje 68! Działanie na najgłębsze sfery organizmu. Częściowe spalenie papierosa – brązowy ustnik i jeszcze dodatkowe substancje trujące nie zmieniło odczytu, dalej 68!

Obciążenie silną, niemiecką trucizną chemiczną.

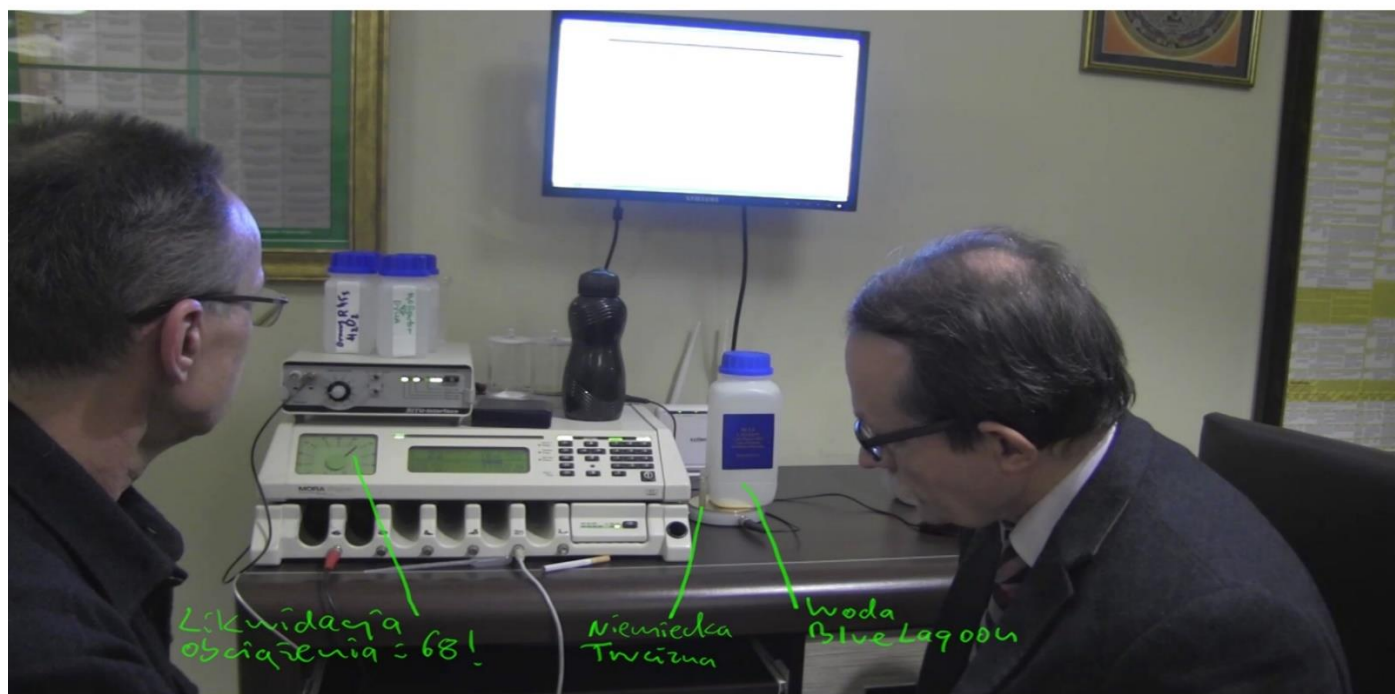


Czarna strzałka na urządzeniu pokazuje ogromne obciążenie organizmu. Zaledwie 25 na skali 0-100. Prawidłowy odczyt zdrowej tkanki to przedział 40-60.

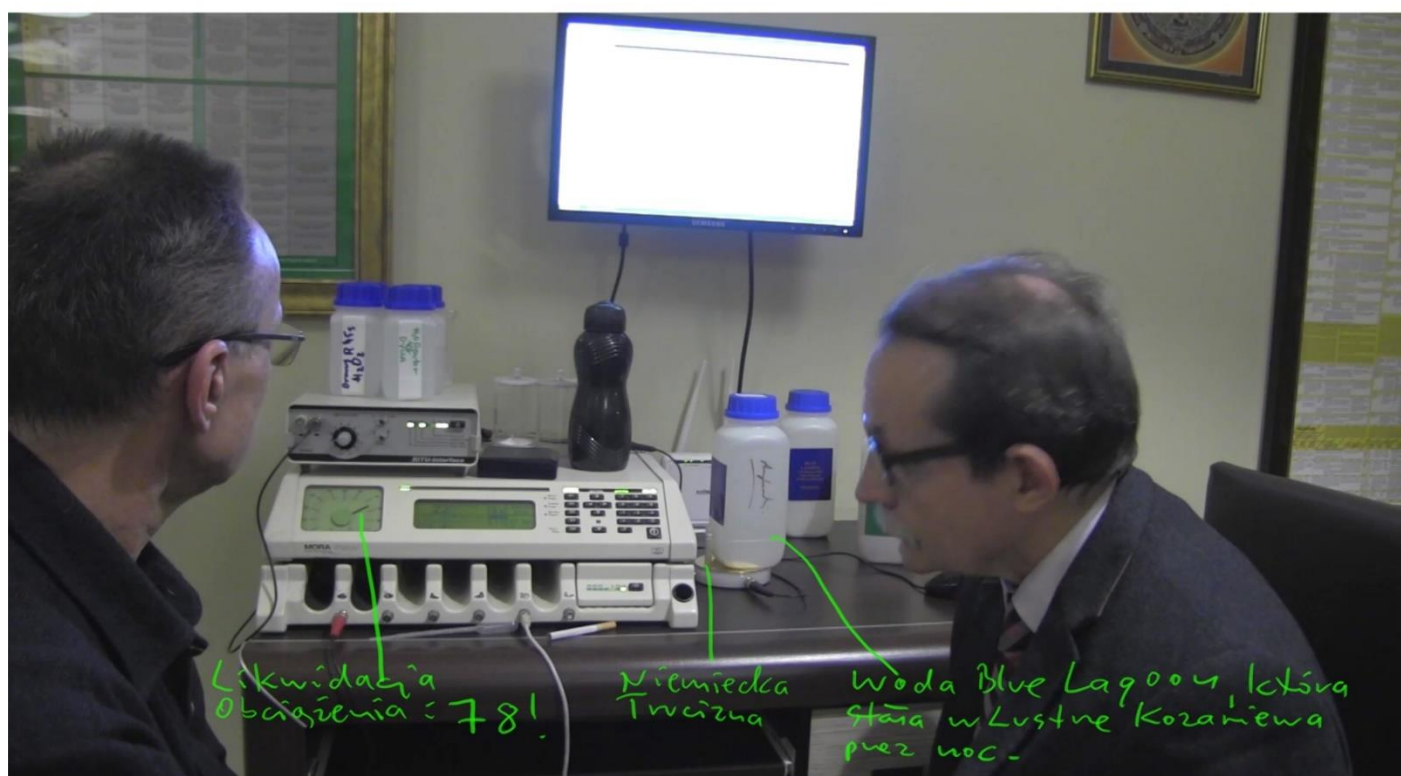


Teraz w urządzeniu znajduje się woda Blue Lagoon z Reaktora Blue Lagoon dodatkowo przepuszczona przez Dyszę Violet Ray. Niesamowite wskazanie 80!!!.

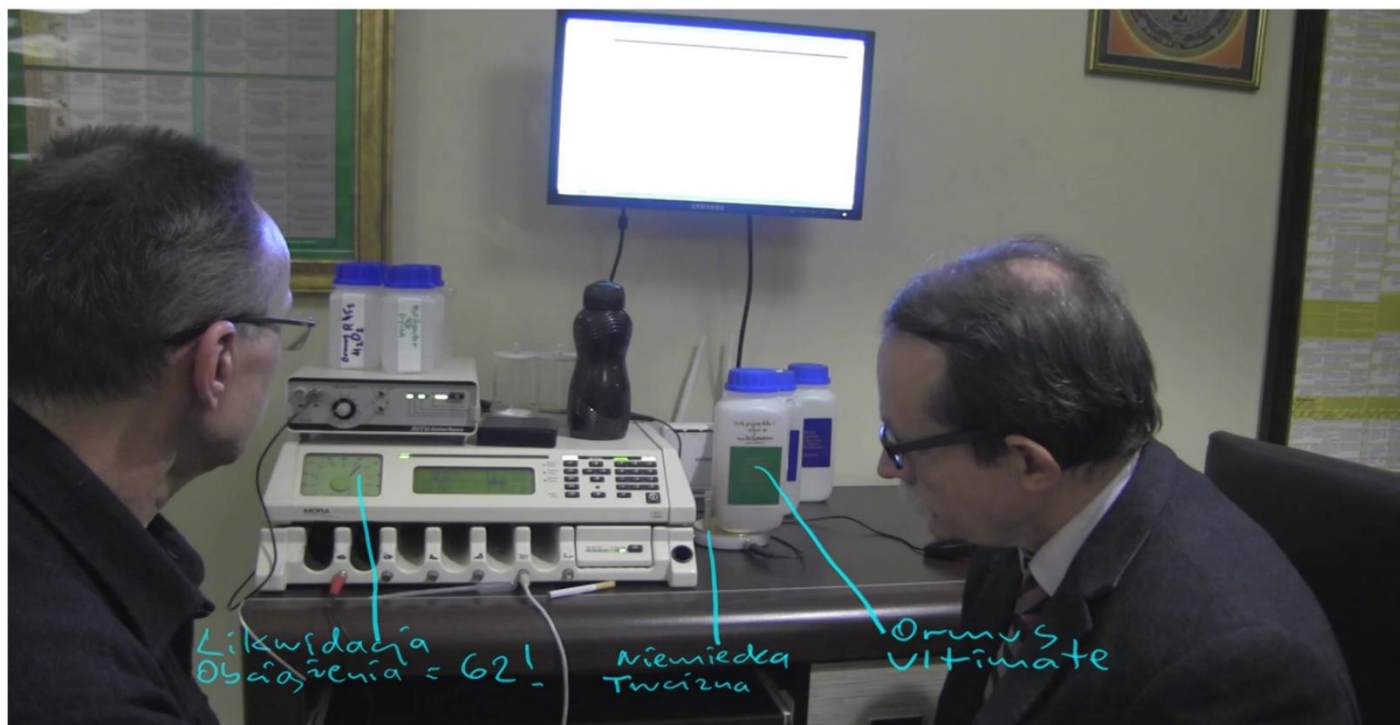
Całkowita niwelacja obciążenia oraz działanie na najgłębsze obszary organizmu, na całą przestrzeń międzykomórkową organizmu.



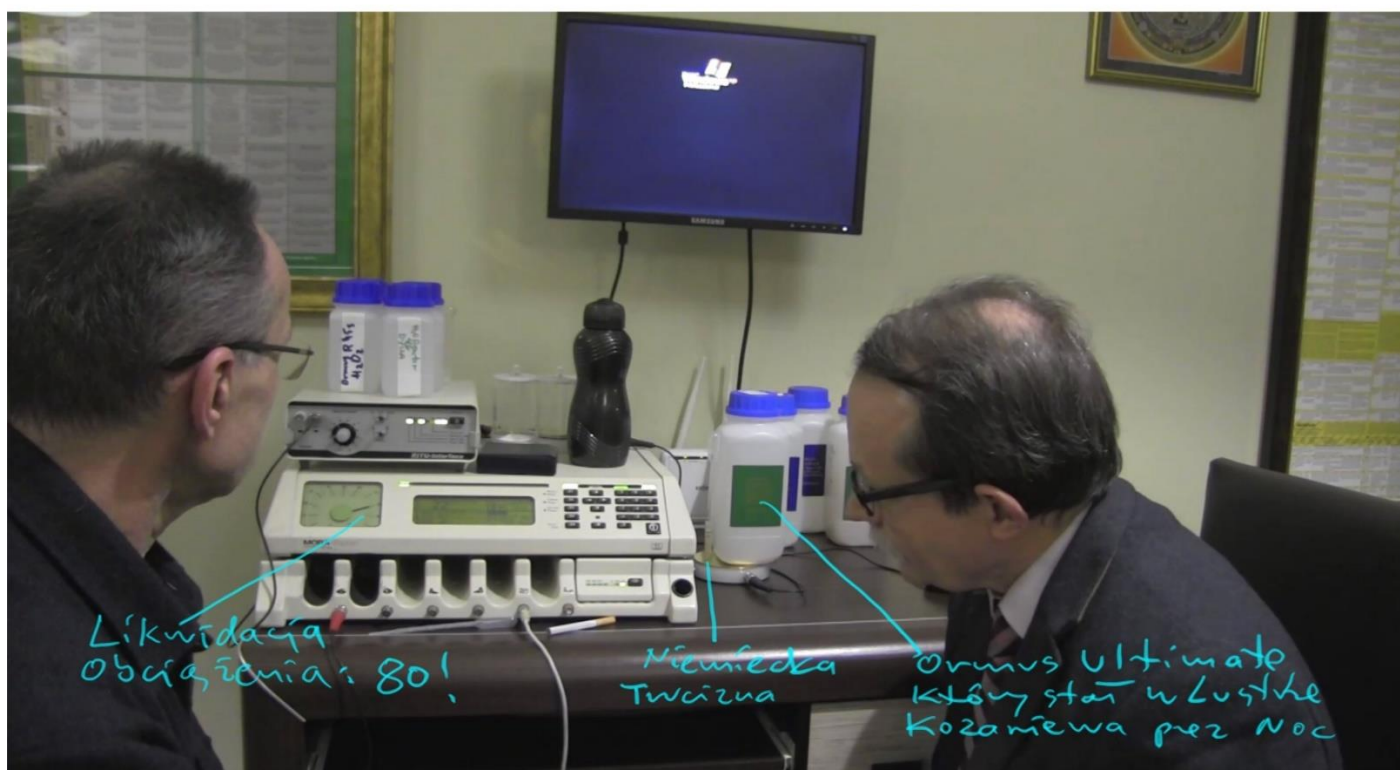
Teraz w urządzeniu znajduje się woda Blue Lagoon z Reaktora Blue Lagoon. Wskazanie 68!
Całkowita niwelacja silnego obciążenia ! Silne działanie na całą przestrzeń międzykomórkową.



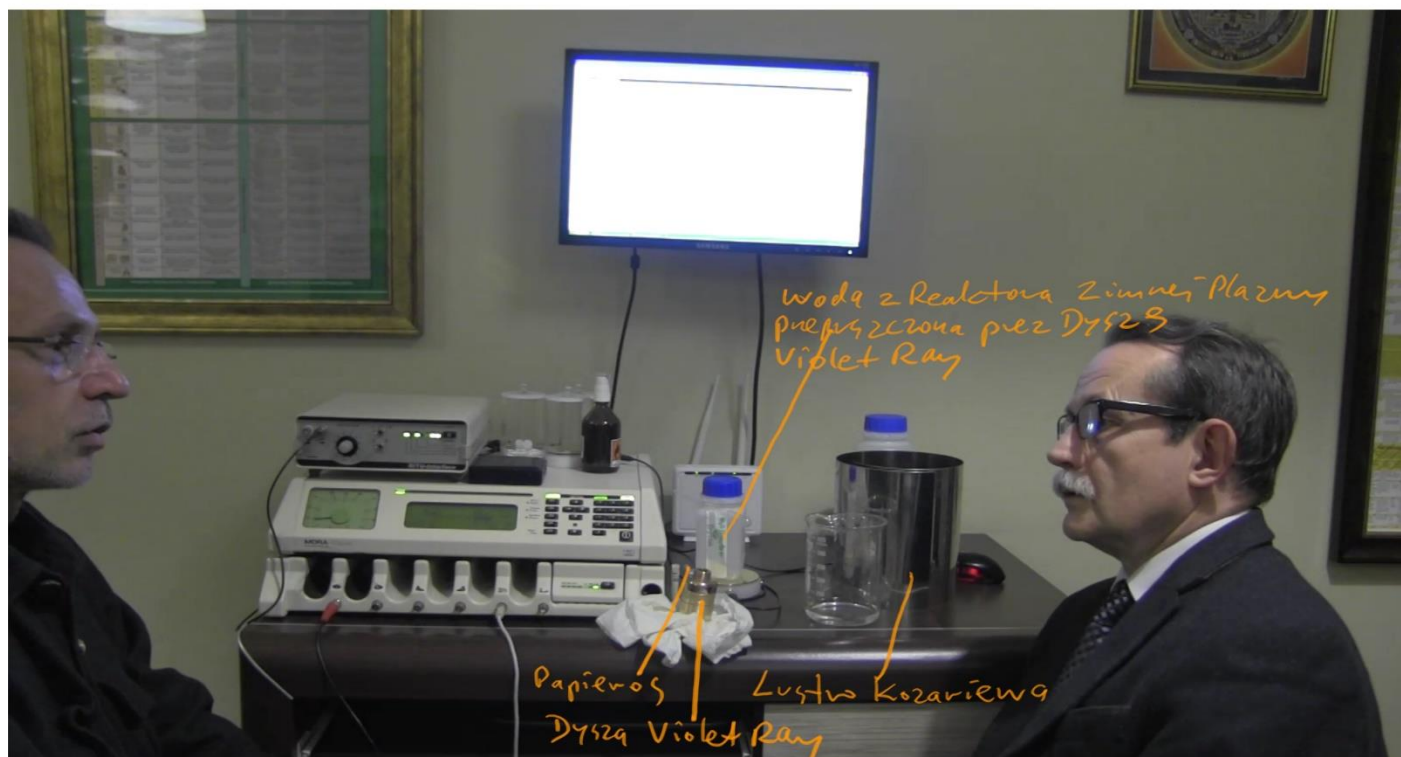
Teraz w urządzeniu znajduje się woda Blue Lagoon z Reaktora Blue Lagoon, która stała przez noc w **Lustrze Kozariewa**. Wskazanie 78!!! Całkowita niwelacja silnego obciążenia ! Silne działanie na całą przestrzeń międzykomórkową.



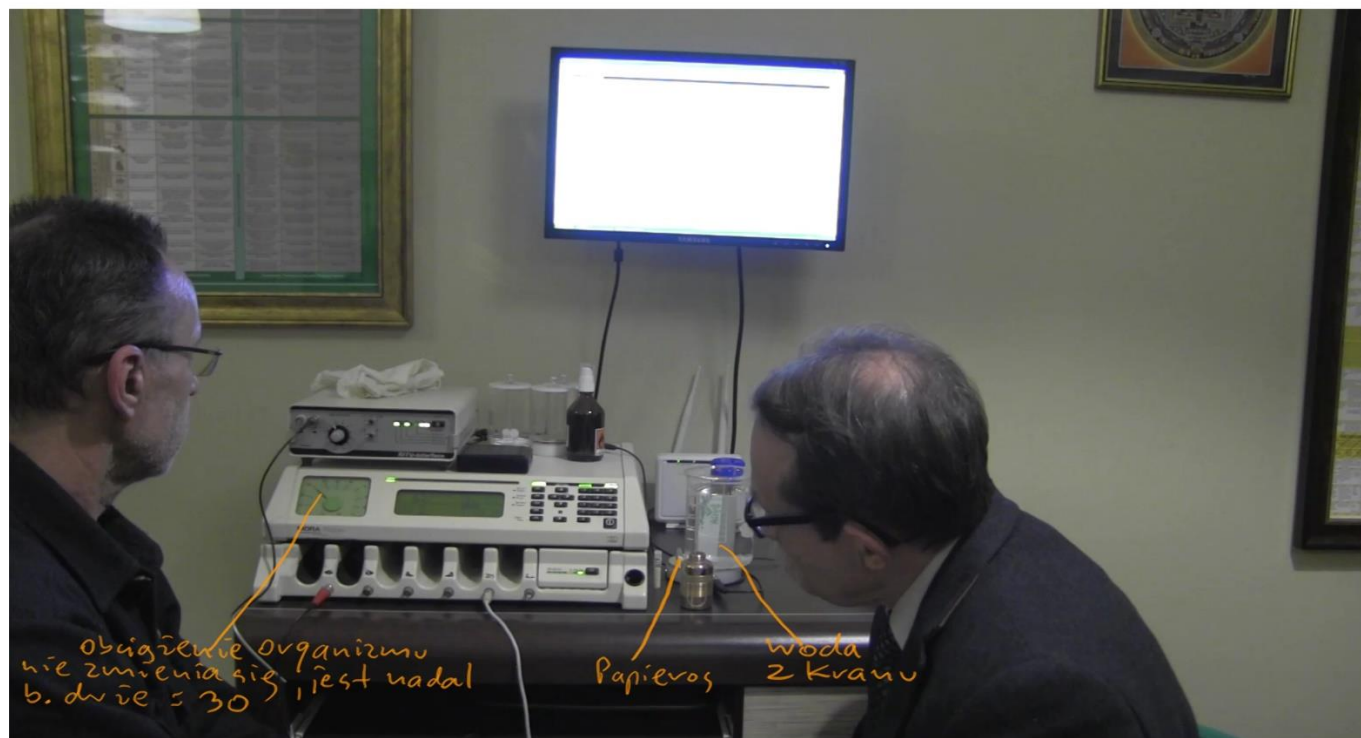
Teraz w urządzeniu znajduje się Ormus Ultimate wodą z Reaktora Blue Lagoon. Wskazanie 62!
Całkowita niwelacja silnego obciążenia ! Silne działanie na całą przestrzeń międzykomórkową.



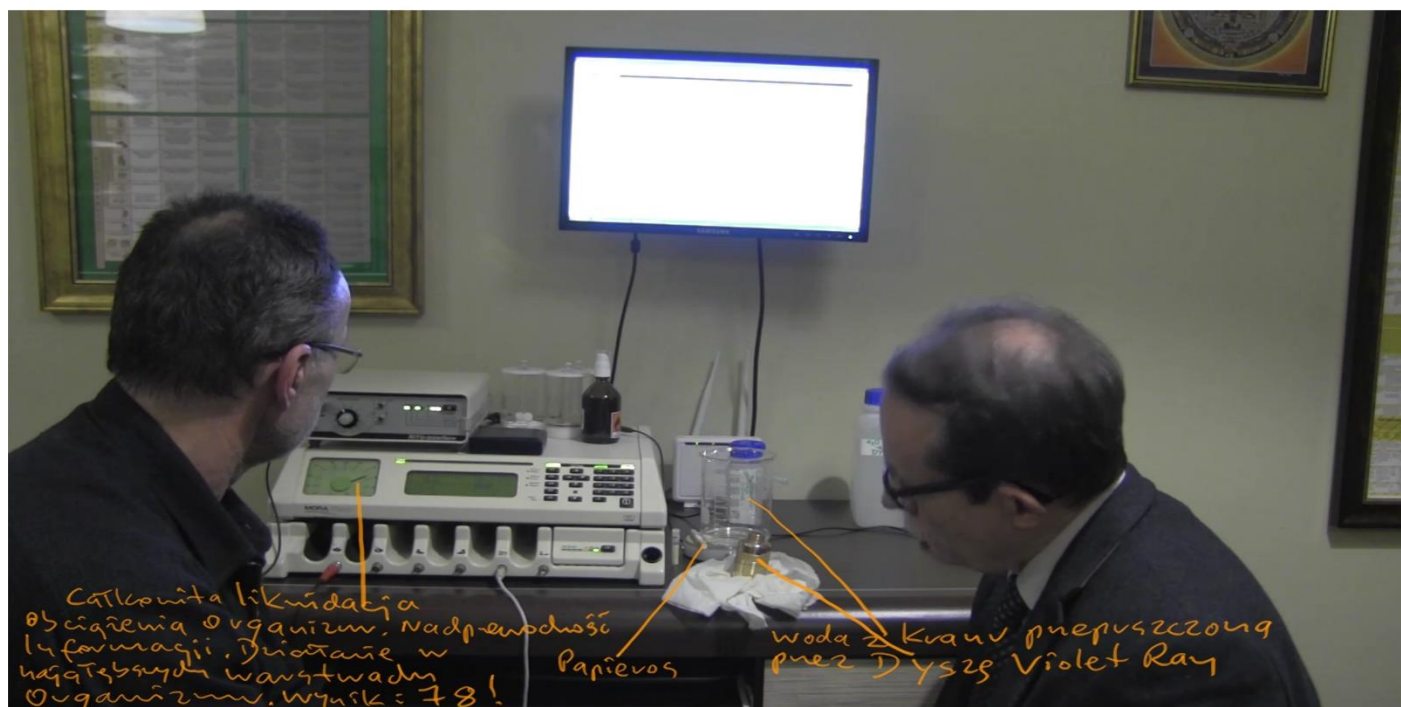
Teraz w urządzeniu znajduje się Ormus Ultimate wodą z Reaktora Blue Lagoon, który stał przez noc w **Lustrze Kozariewa**. Wskazanie 80!!! Całkowita niwelacja silnego obciążenia ! Silne działanie na całą przestrzeń międzykomórkową.



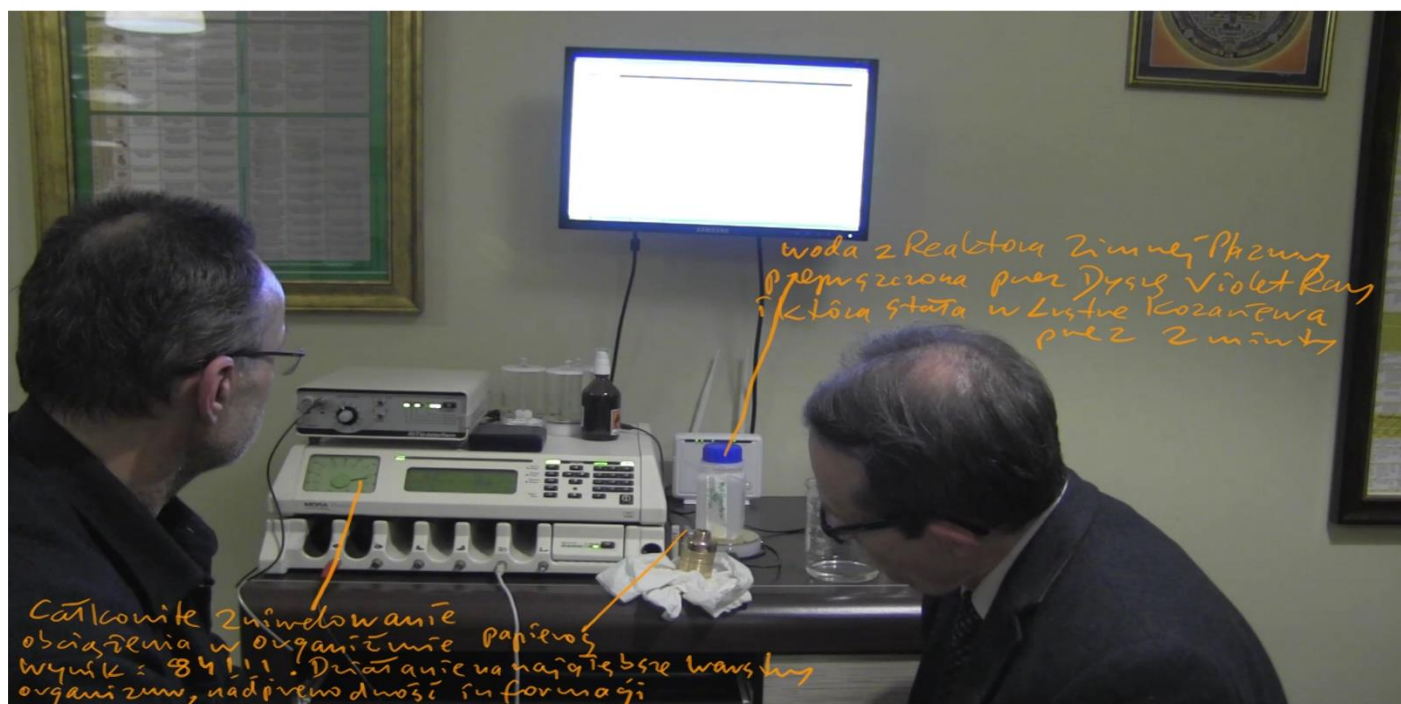
Przyrządy i rzeczy używane do badań: niemieckie urządzenie diagnostyczne MORA, Dysza Violet Ray, Lustro Kozariewa, woda z kranu, woda z Reaktora Blue Lagoon



Jak widać, woda z kranu (menzurka po lewej stronie) nie powoduje w żaden sposób najmniejszego obniżenia obciążenia organizmu papierosem. Dalej wynosi 30



W zlewce znajduje się teraz ta sama woda z kranu przepuszczona przez Dyszę Violet Ray (złota Dysza koło zlewki). Wynik naprawdę niesamowity: z 30 na 78!!! Całkowita niwelacja wszelkich obciążeń, działanie na najgłębszych warstwach organizmu, w całej przestrzeni międzykomórkowej. Wszystko w zaledwie 2-3 sekundy.



I na koniec, woda z Reaktora Blue Lagoon przepuszczona przez Dyszę Violet Ray została umieszczona w lustrze Kozariewa na 2 minuty. Wynik oszałamiający: z 30 na 84 !!! Zlikwidowane wszelkie obciążenia, działanie na najgłębsze warstwy organizmu, nadprzewodność informacji w organizmie.



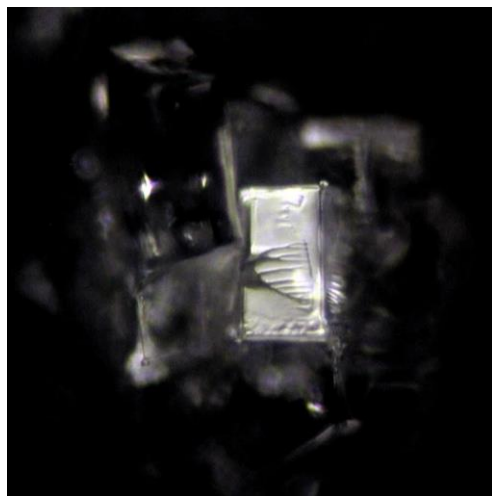
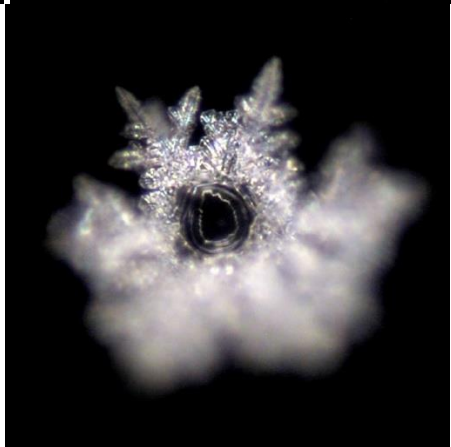
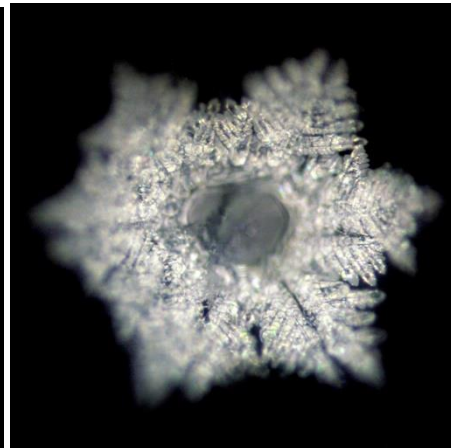
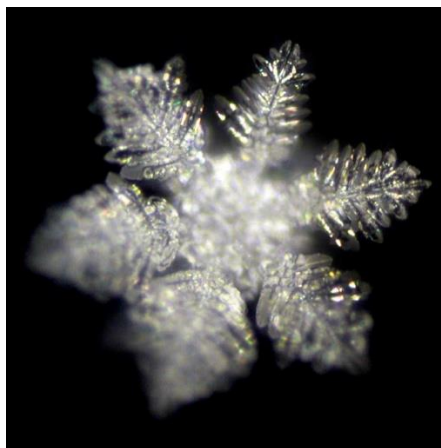
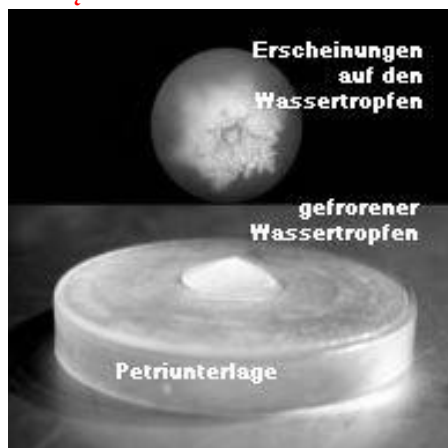
Lustro Kozariewa.

Niesamowite wzmocnienie właściwości badanych substancji w krótkim okresie czasu.

DYSZA VIOLET RAY:



ZDJĘCIA KRYSZTAŁÓW WODY Z DYSZY WYKONANE PRZEZ LABORATORIUM W AUSTRII:



OTO WODA Z DYSZY W LUSTRZE KOZARIEWA !!!

Dysza Violet Ray jest wytwarzana na zamówienie i każda ma swój numer. W środku Dyszy znajdują się diamenty, szafiry oraz inne kryształy i minerały pozostające w dyskrekcji producenta. Znajduje się tam także mały pojemnik z substancją opracowaną przez już nie żyjącego Niemca.

W jednej z Dysz (tej na zdjęciu pojemnik zawiera sproszkowany Ormus zrobiony przez Adama P. Anczykowskiego).

Wyloty Dyszy składają się z precyzyjnych Tytanowych otworów formujących strumień wylatującej wody w kształt znaku ∞.

Każda woda przepływająca przez Dyszę, czy to z butelki wody mineralnej (poprzez adapter) z małą prędkością czy też prosto z kranu z prędkością 800 km/s (mierzoną przy wylocie) natychmiast zmienia całkowicie swe właściwości.

REDOX wody z Dyszy Violet Ray wynosi (-) 100

Kasowana jest cała pamięć wody, która w niezwykle sposób, w ciągu kilku sekund nabiera niezwykle cech pokazanych na zdjęciach powyżej.

Woda staje się aksamitna w dotyku, w wannie jest aksamitna i miękka. Po wyjściu z wanny skóra jest jak nakremowana.

Podobnie czułem wodę w rzekach wypływających z lodowców w Brytyjskiej Columbii gdy zajmowałem się tam poszukiwaniem złota.

Pijąc tą wodę zauważymy, że cały organizm inaczej, lepiej funkcjonuje. Inaczej śpimy, trenujemy, jemy i wydalamy.

Najlepsze efekty daje używanie mieszanki 50% woda z Dyszy Violet Ray i 50% woda z Reaktora Blue Lagoon.

ORMUS:

ORMUS ULTIMATE JEST MIESZANKĄ ORMUSA EXTREME Z WODĄ Z REAKTORA BLUE LAGOON (1 LITR). ZE WZGLĘDU NA ZDOLNOŚĆ PRZENIKANIA TEJ WODY PRZEZ BŁONY KOMÓRKOWE, ATOMY ORMUSOWSKIE SĄ NIESIONE DALEKO W GŁĘB ORGANIZMU. INNE ORMUSY WYTWARZANE PRZEZE MNIE SĄ ROBIONE WYŁĄCZNIE NA WODZIE Z DYSZY VIOLET RAY.

WODA BLUE LAGOON Z REAKTORA BLUE LAGOON ANI WODA Z DYSZY VIOLET RAY NIE JEST LEKIEM.

POWYŻSZE ILUSTRACJE OBRAZUJĄ JEDYNIPEWNE EKSPERYMENTY I SŁUŻĄ JEDYNIPE DO CELÓW POGLĄDOWYCH.

Nie należy rezygnować z opieki lekarskiej i ZAWSZE konsultować się z lekarzem przed zastosowaniem jakiegokolwiek produktu.

Żadnych nowych produktów nie należy używać gdy zachodzą jakiegokolwiek obawy lub gdy istnieje nadwrażliwość na jakiegokolwiek jego składniki.

Nie podawać dzieciom poniżej 12 lat oraz trzymać w bezpiecznym, niedostępnym dla dzieci miejscu.

Dotyczy to także takich substancji jak: biały cukier, biała sól, białe pieczywo, alkohol, papierosy, mleko krowie, antybiotyki, wszelkie napoje energetyzujące, używki i inne.

PONIŻEJ JEST KOPIA BADANIA WYKONANEGO NA ZLECENIE PRZEZ DR. HAB. ANDRZEJA RAPAKA Z ZAKŁADU ONKOLOGII DOŚWIADCZALNEJ INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ WE WROCŁAWIU Z REWELACYJNYMI KONKLUZJAMI NA STRONIE 22! BADANIE DOTYCZY WPLYWU WYŁADOWANIA JARZENIOWEGO NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE.

Dr [REDACTED]

Wrocław 6.03.2017

Sprawozdanie z wykonania umowy o dzieło

„ZBADANIE WPLYWU WYŁADOWANIA LAMPY JARZENIOWEJ O ROZNEJ CZĘSTOTLIWOŚCI NA ŻYWOTNOŚĆ PATOGENÓW W OBECNOŚCI MINERAŁÓW METALI I WODY „

Zleconej 03.01.2017 przez firmę

reprezentowaną przez prezesa

Pana

Firma LL dostarczyła komplet urządzeń niezbędnych do wykonania powyższego zlecenia.

Badano wpływ różnych parametrów wyładowania lampy jarzeniowej na żywotność wymienionych poniżej typów nowotworowych linii komórkowych •

1. LnCap rak gruczołu krokowego
2. MCF-7 rak piersi
3. HT-29 rak jelita grubego
4. K562 białaczka szpikowa
5. Daudi chłoniak Burkita

Komórki naświetlano lampą przez okres 15 minut, a następnie po 48 godzinach mierzono ich żywotność testem MTS. Proces powtarzano pięciokrotnie dla każdej linii komórkowej.

Na załączonych zdjęciach przedstawiono przykładowe wyładowania w różnych otoczeniach lampy



P1



P2

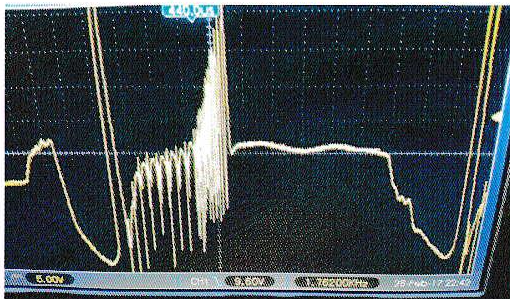


P3

Poniżej przedstawiono rezonans wyładowania lampy jarzeniowej mierzony oscyloskopem



PW1 (z płaszczem wodnym)

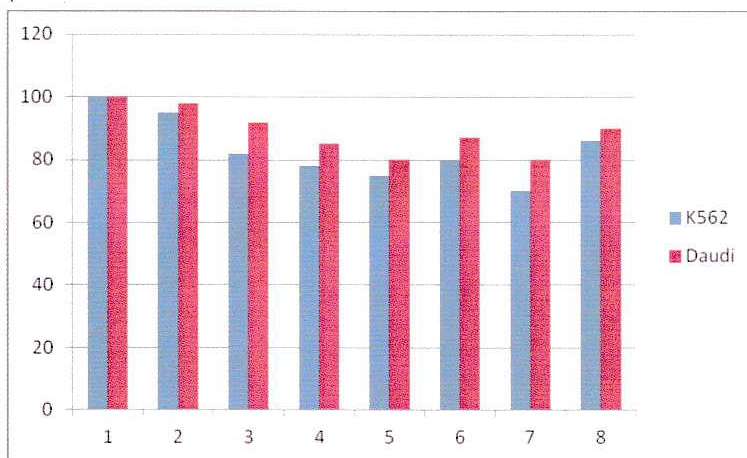


PW2 (z płaszczem wodnym)

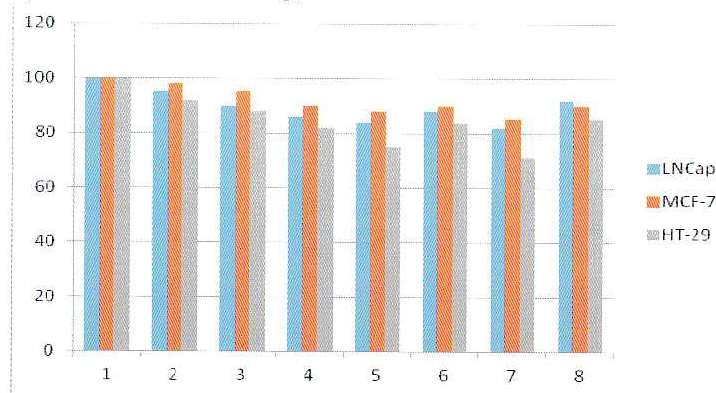
Na wykresach słupkowych przedstawiono skuteczność oddziaływania lampy jarzeniowej w zależności od wielkości rezonansu, zadanej energii i otoczenia.

1. Nietraktowane (kontrola)
2. Naświetlane P1
3. Naświetlane P2
4. Naświetlane P3
5. Naświetlane PW1
6. Naświetlane PW2
7. Komórki potraktowano Natrium Chloratum 0,9%, po uprzednim naświetlaniu lampą jarzeniową przez 15 min. Następnie poddano komórki naświetlaniu lampą przez kolejne 15 min.

Żywotność komórek K562 i Daudi



Żywotność komórek LNCap, MCF-7 i HT-29



Wnioski

- Jednorazowe naświetlanie komórek nowotworowych lampą jarzeniową zmniejsza ewidentnie żywotność wszystkich linii komórkowych
- Uzyskany efekt uzależniony był od energii lampy jarzeniowej zaskakująco dobry efekt ok. 30% daje naświetlanie lampą jarzeniową komórek, które uprzednio potraktowano Natrium Chloratum 0,9%
- Stwierdzić można, że większość linii komórkowych obumiera po 15 min. naświetlania (obniżenie żywotności o około 20%)
- Najlepsze efekty obniżenia żywotności uzyskano dla komórek białaczki szpikowej K562 (20-30%) oraz raka jelita HT-29 (18-28%)

Zaznaczam, że wszystkie próby wykonywano w takich samych warunkach tj. temperatury, wilgotności i czasie naświetlania.

Firma powinna dalej prowadzić badania przy udoskonalaniu urządzenia, ponieważ ta metoda ma obiecujące zastosowanie w leczeniu różnego typu nowotworów. Wyładowanie jarzeniowe jak widać wykazuje znaczną zdolność przeciwnowotworową względem wielu linii komórek nowotworowych.

Podobne obserwacje uzyskano w wielu ośrodkach naukowych na świecie. Z dostępnych publikacji wynika, że zastosowane tam urządzenia mają jednak mały zasięg rezonansu (kilka centymetrów).

Urządzenie dostarczone przez firmę wykazuje dużo większy zasięg (do 50 cm) co daje duże możliwości w konstrukcji urządzenia mogącego mieć zastosowanie w terapii ludzi i zwierząt.

Wrocław 06.03.2017

Dr

**PONIŻEJ ZNAJDUJE SIĘ KOPIA ARTYKUŁU Z LISTOPADA 2016 ROKU
OPISUJĄCEGO ZBIÓR NAJNOWSZYCH BADAŃ PRZEPROWADZONYCH W
USA NAD ZDOLNOŚCIĄ ZIMNEJ PLAZMY DO WYBIÓRCZEGO
LIKWIDOWANIA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH.**

Zimna Plazma Atmosferyczna – Nowa Obiecująca Terapia Antynowotworowa

Artykuł opublikowany w Oncotarget, listopad 2016

3 autorów, w tym:



D. Yan

George Washington University

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Advance Publications 2016

Zimna plazma atmosferyczna – nowa obiecująca terapia antynowotworowa

Dayun Yan¹, Jonathan H. Sherman² and Michael Keidar¹

¹ Department of Mechanical and Aerospace Engineering, The George Washington University, Science & Engineering Hall, NW, Washington, DC, USA

² Neurological Surgery, The George Washington University, Foggy Bottom South Pavilion, NW, Washington, DC, USA

Autorzy korespondencyjni: Dayun Yan, **email:** ydy2012@gwmail.gwu.edu, Michael Keidar, **email:** keidar@gwu.edu

Słowa kluczowe: zimna plazma, leczenie raka, formy reaktywne, selektywność

Otrzymano: 14 września, 2016

Zaakceptowano: 29 października, 2016 **Opublikowano:** 11 listopada, 2016

ABSTRACT

W ostatnim dziesięcioleciu zimna plazma atmosferyczna (ZPA) – zjonizowany gaz o temperaturze zbliżonej do temperatury pokojowej – okazała się mieć obiecujące zastosowanie w leczeniu raka. Dwa urządzenia do wytwarzania ZPA, tzn. urządzenie do wyladowań poprzez barierę dielektryczną i plazmotron, wykazują znaczną zdolność antynowotworową względem dziesiątków linii komórek nowotworowych *in vitro* i szeregu podskórnych heteroprzeszczepów nowotworowych *in vivo*. W przeciwieństwie do konwencjonalnych podejść i leków antynowotworowych, ZPA charakteryzuje się selektywnością antynowotworową. Jak dotąd daleko jest jeszcze do pełnego ustalenia jaki jest chemiczny i molekularny mechanizm zdolności antynowotworowej ZPA. W tym przeglądowym artykule przedstawiamy obszerne wprowadzenie do ZPA, stanu

badań w tej dziedzinie, głównych wyzwań stojących przed badaczami zajmującymi się biologią nowotworów, i przyszłych kierunków badań w tej dziedzinie.

PLAZMA I ZIMNA PLAZMA

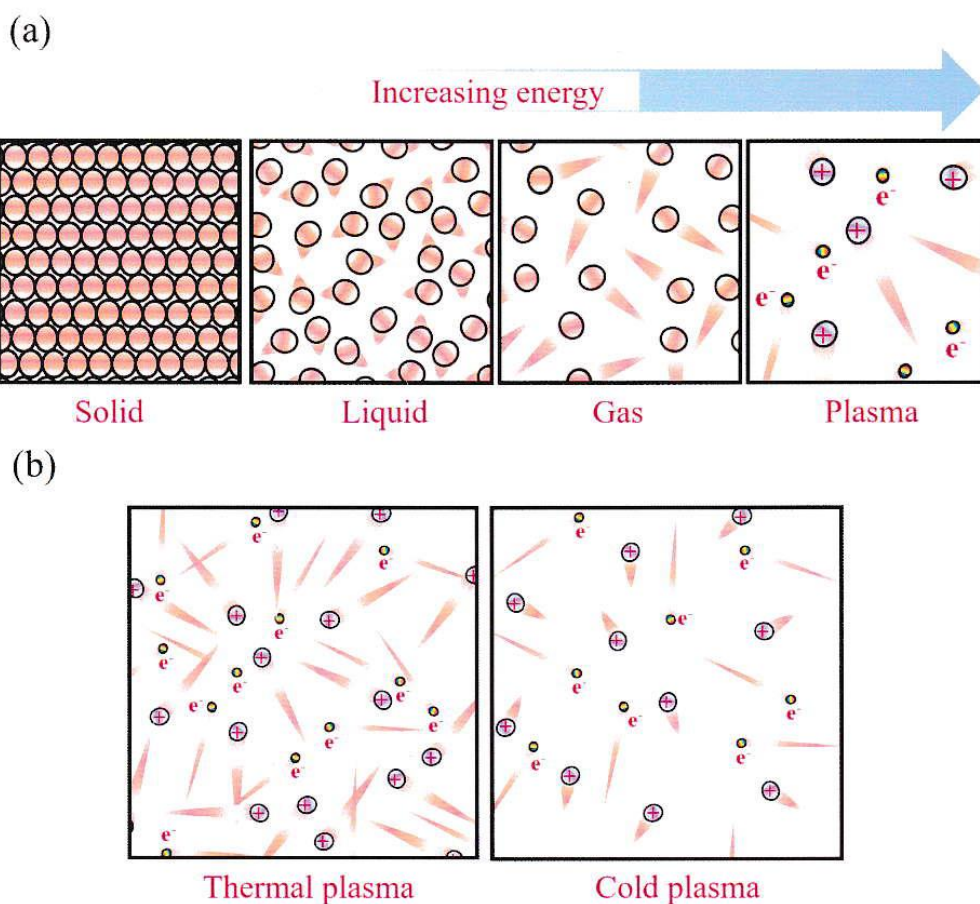
Istnieją cztery podstawowe stany skupienia materii: stały, ciekły, gazowy i plazma (Rysunek 1a). W miarę jak zwiększa się energia działająca na atomy, ruch cieplny atomów w ciele stałym pogarsza i w końcu pokonuje ograniczające interakcje między atomami w ciele stałym takie, jak wiązania jonowe, i tworzy się ciecz. Podobnie, gdy atomy w cieczy uzyskają energię odpowiednio dużą, aby pokonać ograniczające siły van der Waalsa pochodzące od otaczających atomów, ciekłe atomy przejdą w atomy gazowe. Oczywiście energia translacyjna atomów w gazie jest dużo większa niż w cieczy i w ciele stałym. Gdy ta energia jest wystarczająco duża, aby elektron pokonał barierę potencjału elektrostatycznego, elektron ten zostanie zdarty, tworząc elektron swobodny i naładowany dodatnio jon. Proces ten nazywa się jonizacją. Plazma zwykle jest zjonizowanym gazem obojętnym składającym się z dodatnio naładowanych jonów, elektronów i cząstek obojętnych.

Ogólnie rzecz biorąc, temperatura zwiększa się, gdy materie przechodzą ze stanu gazowego w ciekły i w plazmę. O temperaturze plazmy decydują ruchy termiczne elektronów i cząstek ciężkich takich, jak atomy i jony. W przypadku zwykłej plazmy termicznej, gdy gęstość cząstek jest wysoka w wyniku intensywnych kolizji między elektronami i ciężkimi cząstkami, wszystkie cząstki dążą do równowagi termicznej [1]. Temperatura w takiej plazmie jest wysoka – powyżej kilku tysięcy stopni [1]. Plazmy takie zwykle stosowane są w warunkach ciśnienia atmosferycznego. W przypadku szybkiego wyładowania plazmy pod ciśnieniem atmosferycznym, mamy do czynienia z plazmami, w których elektrony i cząstki ciężkie są w stanie nierównowagi cieplnej. W tym przypadku, temperatura cząstek ciężkich jest dużo niższa niż elektronów (Rysunek 1b). Plazmy te będziemy nazywać zimnymi plazmami atmosferycznymi (ZPA, *ang.* CAP). Temperatura ciężkich cząstek ZPA jest w przedziale od 25°C do 45°C [2]. Takie plazmy mogą być stosowane w biomedycynie [3]. Wiele reaktywnych form, w tym rodniki na bazie tlenu, rodniki na bazie azotu, i inne składniki wytwarzane są w ZPA [4-6]. Ta skomplikowana “chemia” prowadzi do niezliczonych interakcji pomiędzy ZPA a układami biologicznymi, w tym komórkami i tkankami [7-9].

URZĄDZENIA DO WYTWARZANIA ZPA

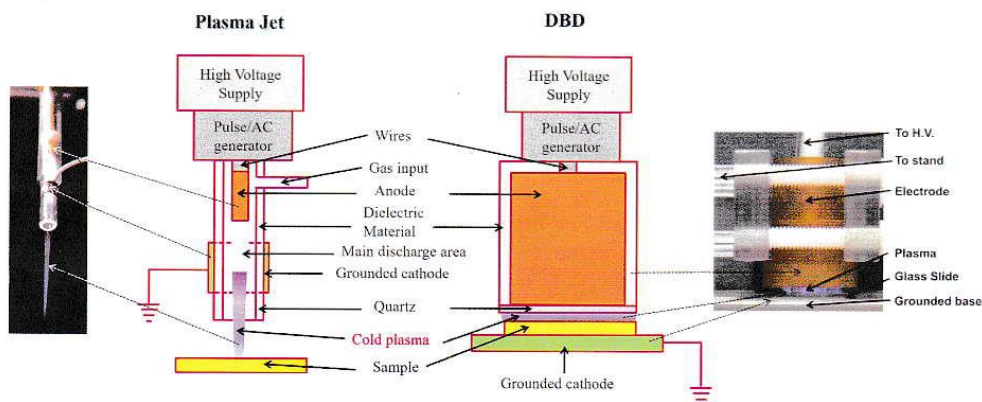
Do wytwarzania ZPA stosuje się dwa główne podejścia: wyładowanie bezpośrednie i wyładowanie pośrednie. W przypadku wyładowania pośredniego, aktywne formy plazmy od głównego łuku wyładowczego transportowane są przez przepływ gazu. W przypadku wyładowania bezpośredniego, żywa tkanka lub żywe komórki jest/są jedną z elektrod i stanowi/ą aktywną część tego wyładowania. Opierając się na tych zasadach opracowano dwa urządzenia do wytwarzania ZPA: plazmotron łukowy [6, 10, 11] i urządzenie do wyładowań poprzez barierę dielektryczną (*ang.* dielectric barrier discharge (DBD)) [12, 13], szeroko stosowane w medycynie plazmowej. W niektórych pracach plazmotron łukowy jest także nazywany ołówkiem plazmowym, [23, 24], igłą plazmową [2, 25, 26] lub działem plazmowym [27]. Jak pokazano na Rysunku 2, plazmotron i urządzenie DBD wykazują szereg podobieństw co do zasad fizycznych, części składowych i materiałów. W obu urządzeniach fioletowa plazma wytwarzana jest między anodą a katodą. Anoda albo katoda pokryta jest warstwą materiału dielektrycznego takiego, jak kwarc [19, 28]. W wielu

plazmotronach stosuje się pustą rurkę kwarcową jako warstwę dielektryczną na katodzie [2, 29]. Metalowa, np. miedziana, katoda otacza rurkę kwarcową. Ponadto plazmotron potrzebuje gazu nośnego takiego, jak hel [18, 26, 30] lub argon [25, 31, 32], aby utrzymać tworzenie się ZPA, podczas gdy urządzenie DBD może wytwarzać plazmę bezpośrednio w powietrzu [20-22, 33]. W niektórych zastosowaniach do gazu nośnego dodaje się tlen [4, 34] i azot [35, 36], aby uzyskać specyficzny skład chemiczny. Dzięki ciągłemu przepływowi gazu tworzy się strumień ZPA. W odróżnieniu do powyższego, urządzenie DBD na ogół wytwarza krótką, ale szeroką plazmę. Ponadto różne są funkcje próbek w tych dwóch urządzeniach do wytwarzania zimnej plazmy. W plazmotronie próbka tylko jest poddawana działaniu strumienia plazmy [4, 18, 37]. W odróżnieniu od tego, w urządzeniu DBD próbka jest integralną częścią wyładowania [20, 22, 38]. ZPA nie wytworzy się w urządzeniu DBD jeśli próbka nie będzie odpowiednio blisko drugiej elektrody. Te własności i cechy wskazują, że plazmotron może bardziej nadawać się do delikatnej obróbki małego obszaru na próbce, podczas gdy urządzenie DBD może być bardziej przydatne do bardziej intensywnej obróbki dużego obszaru próbki. Podstawy fizyczne wytwarzania form reaktywnych w różnych urządzeniach ZPA obszernie przedstawiono w pracy przeglądowej X. Lu i in. [39].



Rysunek 1: Fizyczny opis plazm. a. Ilustracja poglądowa czterech podstawowych stanów skupienia materii. Trójkątne ogonki przedstawiają siłę ruchu cieplnego cząstek. b. Ilustracja poglądowa plazmy termicznej i plazmy zimnej. Brązowe kulki, fioletowe kulki i opalizujące kulki przedstawiają odpowiednio obojętne atomy,

dotatnio naładowane jony, i elektrony. (Rosnąca energia, Ciało stałe, Ciecz, Gaz, Plazma, Plazma termiczna, plazma zimna)



Rysunek 2: Plazmotron i urządzenie do wyładowań poprzez barierę dielektryczną (DBD) to dwa główne urządzenia stosowane w medycynie plazmowej. Takie same elementy plazmotronu i urządzenia DBD zaznaczono takimi samymi kolorami. Wstawka z lewej strony reprodukowana za zgodą Alana Siu i in., PLoS ONE, 10(6), E0126313 (2015). Copyright 2015 Public Library of Science. Wstawka z prawej strony reprodukowana za zgodą Sameera Kalghatgi i in., PLoS ONE, 6(1), e16270 (2011). Copyright 2011 Public Library of Science. (Plazmotron Zasilanie wysokim napięciem, Generator impulsów/Prądnicą prądu przemiennego, Przewody, Dopływ gazu, Anoda, Materiał dielektryczny, Główny obszar wyładowania, Uziemiona katoda, Kwarc, Plazma zimna, Próbką, Urządzenie DBD, Uziemiona Katoda, Do wysokiego napięcia, Do stanowiska, Elektroda, Plazma, Szkiełko, Uziemiona podstawa)

STAN BADAŃ

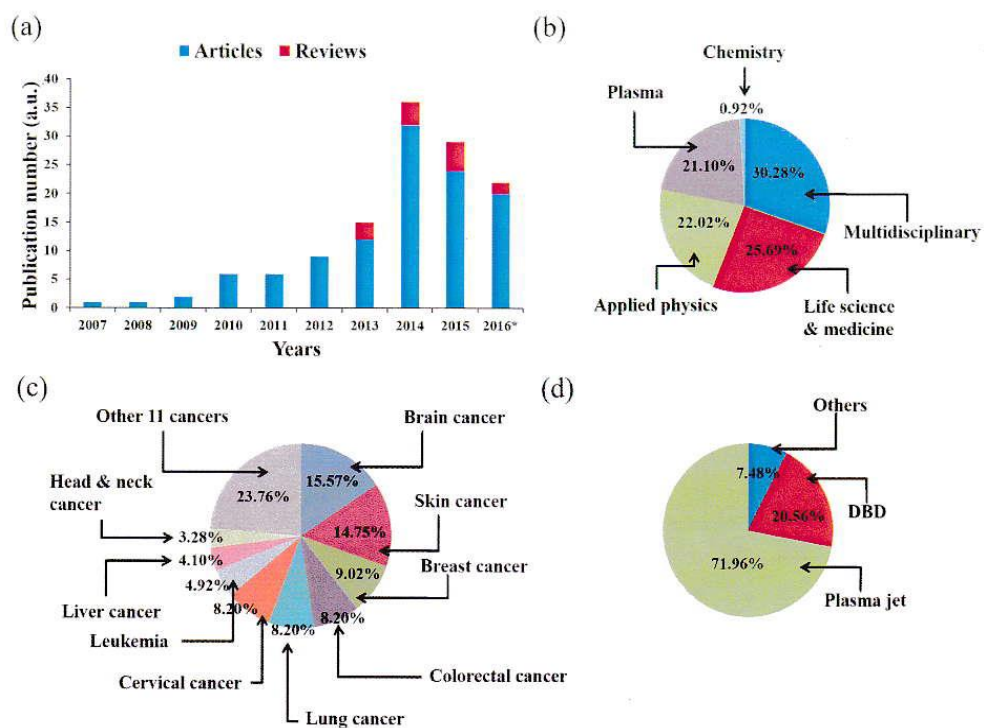
Ukazało się szereg prac przeglądowych omawiających zastosowanie ZPA w leczeniu raka [40-44] [45]. W niniejszym artykule skoncentrowaliśmy się na przedstawieniu podstawowego pojęcia ZPA i biologicznych podstaw mechanizmu przeciwnowotworowego ZPA. Od momentu ukazania się w 2007 roku pierwszego doniesienia o zabójczym działaniu DBD na czerniaka nastąpił szybki rozwój zastosowań ZPA w leczeniu nowotworów (Rysunek 3a). Z obszernego przeglądu wszystkich publikacji, które ukazały się do września 2016 roku, wynika, że około 75% artykułów z tej dziedziny zostało opublikowanych w multidyscyplinarnych czasopismach takich, jak PLoS ONE, czasopismach poświęconych fizyce stosowanej takich, jak Applied Physics Letters, a także w czasopismach poświęconych plazmie takich, jak Plasma Processes and Polymers (Rysunek 3b). Z drugiej strony, tylko około 25% artykułów zostało opublikowanych w czasopismach poświęconych naukom przyrodniczym i medycynie. W efekcie badania w tej dziedzinie skupiają się na głównie na opisie antynowotworowego efektu ZPA w leczeniu różnych linii komórek rakowych [41, 44] i nowotworów w modelach zwierzęcych [20, 30, 46]. Jak dotąd udowodniono znaczącą zdolność antynowotworową ZPA dla ponad 20 typów raka *in vitro*. Spośród tych linii rakowych, intensywnie badano raka mózgu [27, 47, 48], raka skóry [2, 19, 49], raka piersi [50-52], raka jelita grubego [15, 53, 54], raka płuca [18, 46, 55], raka szyjki macicy [56-58], białaczkę [23, 59, 60], raka wątroby [25, 37, 58], a także raka głowy i szyi [61-63] (Rysunek 3c). Poza tym w około 70% wszystkich publikacji jako narzędzia przeciwnowotworowe stosowano plazmotrony (Rysunek 3d).

Oprócz powstrzymywania wzrostu komórek nowotworowych ZPA jest zdolna przywrócić wrażliwość na określone leki komórkom rakowym opornym na chemioterapię. Na przykład ZPA przywróciła wrażliwość na terapię temozomolidem (TMZ) komórkom glejaka

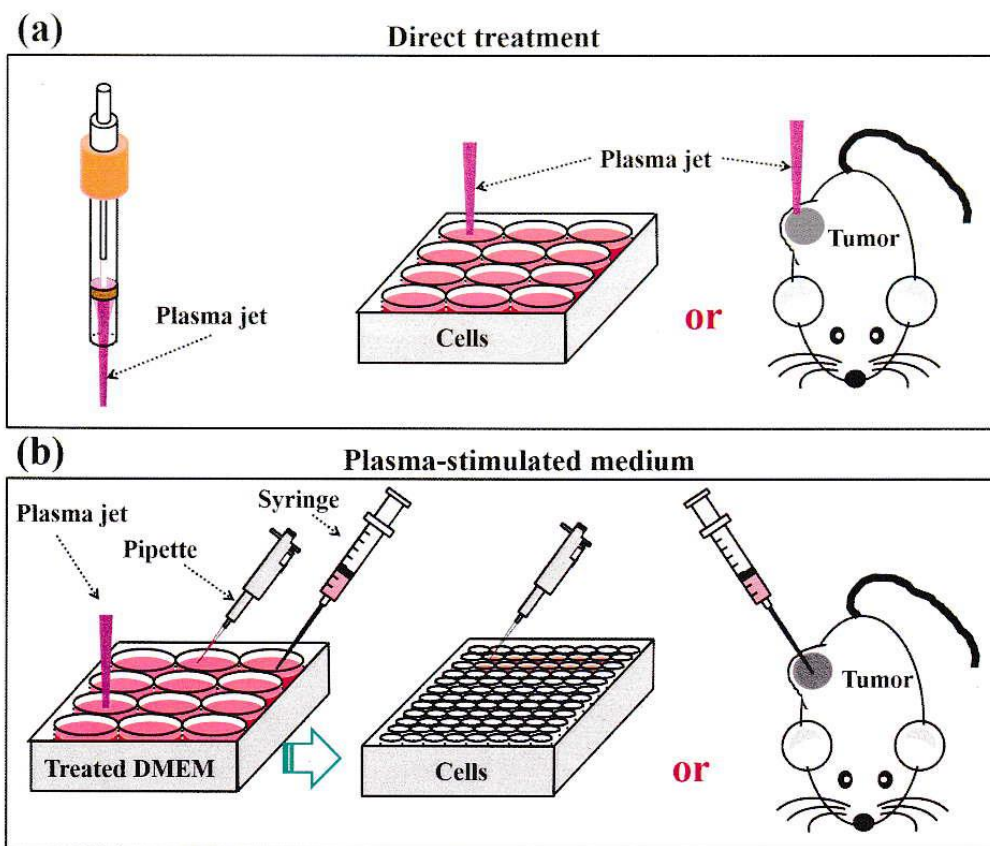
opornym na TMZ [64]. Inny przykład to przywrócenie wrażliwości na leczenie ligandem związanym z czynnikiem martwicy nowotworów (TRAIL), wywołującym apoptozę komórek nowotworowych, komórkom raka jelita grubego opornym na TRAIL [65].

Ponadto można uzyskać silniejsze działanie antynowotworowe ZPA poprzez jej synergiczne zastosowanie z technikami nanocząsteczkowymi. M.G. Kong i in. zilustrowali to szczegółowo w pracy opisującej potencjalne synergistyczne zastosowanie ZPA i nanocząstek w medycynie [66]. Zwiększony efekt antynowotworowy po raz pierwszy uzyskano stosując ZPA do leczenia rakowych komórek czerniaka, które uprzednio poddano działaniu nanocząstek złota sprzężonych z przeciwciałem anti-FAK [49]. Niewątpliwie takie powierzchniowo zmodyfikowane nanocząstki osłabiają normalną funkcję FAK, co może zintensyfikować spowodowane przez ZPA odwarstwianie komórek czerniaka od podłoża. Wykazano ponadto, że uprzednie zastosowanie nanocząstek złota bez modyfikacji tym przeciwciałem także zwiększyło efekt anty-glejakowy strumienia plazmy [67]. Najnowsze badania wykazały, że połączone działanie nanocząstek złota powleczonego glikolem polietylenowym (*ang.* PEG), i ZPA zwiększyło obumieranie komórek rakowych w litych guzach i zmniejszyło przejście epitelialno-mezenchymalne (*ang.* EMT) [68]. Także zastosowanie kapsułkowanych w leku nanocząstek typu core-shell (rdzeń/powłoka) syntezowanych poprzez współosiowe elektrorozpylanie wykazało synergistyczny potencjał antynowotworowy w połączeniu z ZPA w przypadku komórek raka piersi [69]. Badania te wskazują, że nanocząstki mogą osłabiać lub uszkadzać normalną funkcję specyficznych białek lub szlaków, które przeciwstawiają się zmianie wewnątrzkomórkowej spowodowanej reaktywnymi formami pochodzącymi od ZPA.

Opracowano dwie podstawowe strategie stosowania ZPA. Jedna polega na zastosowaniu plazmotronu lub urządzenia DBD [19] do bezpośredniego oddziaływania na komórki wysiane na płytce Petriego lub płytce wielodołkowej lub na podskórne nowotwory w myszach (Rysunek 4a). Drugie podejście polega na zastosowaniu roztworów stymulowanych zimną plazmą (*ang.* PSA), głównie pożywki stymulowanej zimną plazmą (*ang.* PSM), w celu zahamowania wzrostu komórek nowotworowych w standardowym procesie hodowli komórek [47, 70] lub zahamowania wzrostu komórek nowotworowych poprzez wstrzyknięci PSM w komórki rakowe myszy [71] (Rysunek 4b). PSM jest także nazywana pożywką aktywowaną zimną plazmą (*ang.* PAM). W większości badań wykorzystano pierwszą metodę. W ostatnich trzech latach drugie podejście stopniowo zyskuje na popularności [66, 72-80]. W niniejszym opracowaniu omawiamy tylko pierwsze podejście.



Rysunek 3: Stan badań nad zastosowaniem ZPA w leczeniu raka do 2016 roku włącznie. a. Liczba publikacji. *: do końca września. b. Rodzaj czasopism, w których artykuły się ukazały. c. Nowotwory, których artykuły dotyczyły. d. Urządzenia plazmowe stosowane w artykułach. ((a) Liczba publikacji (w j.u.), Lata, Artykuły, Opracowania przeglądowe, (b) Chemia, Wielodyscyplinarne, Nauki przyrodnicze i medycyna, Fizyka stosowana, Plazma, (c) Rak mózgu, Rak skóry, Rak piersi, Rak jelita grubego, Rak płuca, Rak szyjki macicy, Białaczka, Rak wątroby, Rak głowy i szyi, Pozostałe 11 nowotworów, (d) Inne, DBD, Plazmotron)



Rysunek 4: Dwie podstawowe strategie stosowania ZPA. a. Bezpośrednie działanie ZPA na komórki nowotworowe *in vitro* lub na podskórne heteroprzeszczepy nowotworów *in vivo*. b. Pośrednie oddziaływanie ZPA na roztwory, głównie na pożywkę. PSM stosowane są w celu powstrzymania wzrostu komórek nowotworowych wysianych na płytce wielodołkowej lub tkanek nowotworowych w myszach. ((a) Bezpośrednie oddziaływanie, Strumień plazmy, Komórki, Strumień plazmy, lub Nowotwór, (b) Pożywka stymulowana plazmą, Strumień plazmy, Pipeta, Strzykawka, Potraktowane DMEM, Komórki lub Nowotwór)

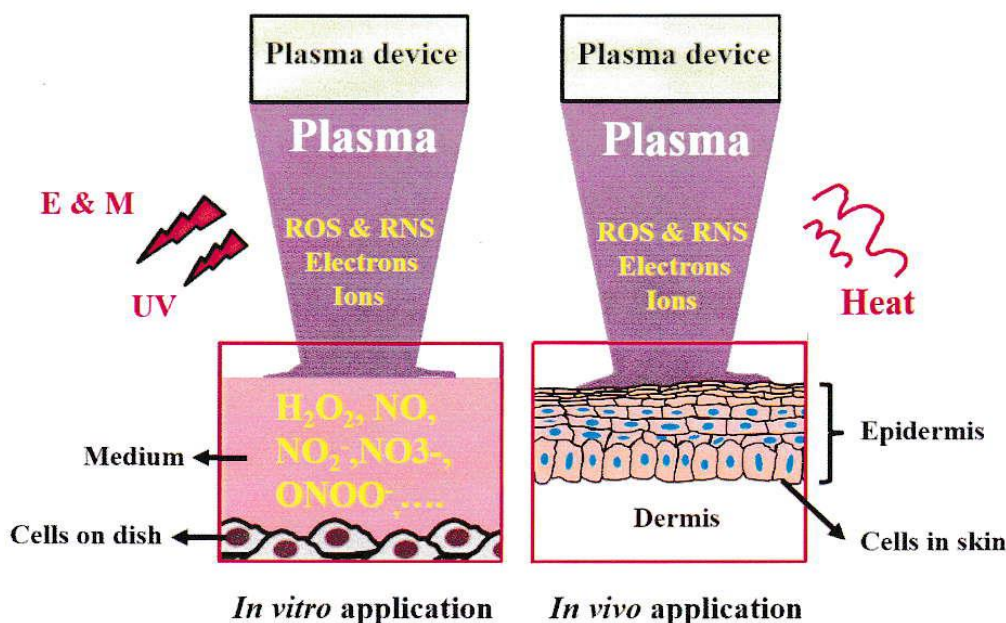
INTERAKCJA MIĘDZY ZPA A UKŁADEM BIOLOGICZNYM

Interakcja między ZPA a komórkami w tkance lub komórkami hodowanymi na płytce Petriego tworzy podstawy antynowotworowego efektu ZPA. Interakcja ta jest kombinacją czynników fizycznych i chemicznych tak, jak schematycznie przedstawiono to na Rysunku 5. Fizycznymi czynnikami w ZPA są: ultrafiolet, ciepło i pole elektromagnetyczne. Czynniki chemiczne obejmują dziesiątki form reaktywnych wytwarzanych w fazie gazowej ZPA. Wśród nich takie formy na bazie tlenu, jak hydroksyl (OH.), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) [5, 35, 50], ponadtlenek ($\text{O}_2\cdot$) [5], nadtlenuk wodoru (H_2O_2) [5], ozon (O_3) [5, 60], a także takie formy na bazie azotu, jak tlenek azotu(II) (NO) [5, 18, 36], dwutlenek azotu (NO_2) [60], trójtlenek azotu (NO_3) [60], tlenek dwuazotu (N_2O) [60] i tetratlenek diazotu (N_2O_4) [60] zaobserwowano w ZPA. Ponadto dodatkowo naładowane jony takie, jak N_2^+ [18, 37, 50] i elektrony [5] są także wytwarzane przez ZPA.

Do tej pory większość badań *in vitro* skupiała się na antynowotworowym oddziaływaniu ZPA na komórki nowotworowe hodowane na płytce Petriego lub na płytce

wielodołkowej. Terapia za pomocą ZPA jest skuteczna, gdy warstwa pożywki do hodowli komórek pokrywa komórki nowotworowe. Tak więc powyższe czynniki fizyczne i chemiczne najpierw oddziałują na pożywkę (Rysunek 5). Efekt działania ultrafioletu, ciepła oraz pola elektromagnetycznego na pożywkę jest znikomy. Niewielki wzrost temperatury pożywki po poddaniu jej działaniu ZPA od temperatury pokojowej do około 35°C jest jedynym potwierdzonym dowodem fizycznego efektu działania ZPA na pożywkę [33, 81]. Ostateczna temperatura pożywki zależy od jej temperatury początkowej, jej składu, dawki ZPA i mocy wyładowania [33, 81]. Ponieważ standardowa temperatura w inkubatorze wynosi 37°C, pożywka lekko podgrzana na skutek działania ZPA z pewnością nie będzie hamować wzrostu komórek nowotworowych. Poza tym ultrafiolet i elektrony w DBD okazały się czynnikami w niewielkim stopniu przyczyniającymi się do uszkodzenia wewnątrzkomórkowego DNA spowodowanego przez ZPA [5]. A zatem zaobserwowana reakcja komórkowa na oddziaływanie ZPA *in vitro* może być głównie spowodowana różnymi formami reaktywnymi pochodzącymi od ZPA [9]. Może to być istotna różnica między ZPA a niektórymi konwencjonalnymi metodami chemoterapeutycznymi. Te ostatnie mogą także generować wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny spowodowany nadmiarem reaktywnych rodników tlenowych (*ang.* ROS) poprzez różnorodne szlaki wewnątrzkomórkowe. Jednakże ZPA sama w sobie jest przestrzajalnym źródłem postaci reaktywnych. Wewnątrzkomórkowy stres ROS jest powodowany swoistą kombinacją form pochodzących od ZPA.

Nadal pozostaje wiele niejasności co do solwatacji komponentu plazmowego w roztwór wodny. Obserwuje się tu dwa trendy. Po pierwsze większość składników pożywki, szczególnie aminokwasy rozpuszczone w pożywce [82] i aminokwasy w białkach [70], są zmodyfikowane po poddaniu ich działaniu ZPA. Spośród 20 aminokwasów, cysteina wykazuje najsilniejszą reaktywność w stosunku do reaktywnych form pochodzących od plazmy rozpuszczonych w PSM, chociaż ten mechanizm nadal jest dyskusyjny [70]. Po drugie, stwierdzono powszechne występowanie szeregu reaktywnych rodników tlenowych (*ang.* ROS) takich, jak H_2O_2 [33, 56, 83], oraz reaktywnych form azotu (*ang.* RNS) takich, jak NO_2 [70, 84, 85] i ONOO w roztworach wodnych poddanych działaniu ZPA. Ponadto wielu autorów uważa, że NO wytworzył się w PSM [17, 56, 84]. Jednakże zmierzono tylko stężenie NO_2 raczej niż bezpośrednio stężenie NO [17, 52, 81]. NO_2 wykryty w pożywce może nie być tylko skutkiem utleniania NO w pożywce, chociaż jest to jak dotąd jedyne wyjaśnienie powolnego wzrostu stężenia NO_2 w PSM w trakcie przechowywania [70, 85]. Można przyjąć, że NO_2 tworzy się w wyniku nieznanej interakcji między pożywką a ZPA. Tak więc chociaż istnienie NO w fazach gazowych ZPA jest szeroko uznawane [5, 18, 36], nie udowodniono bezpośrednio, że NO wytwarza się w PSM.



Rysunek 5: Ilustracja pogłówna interakcji między ZPA a komórkami *in vitro* i *in vivo*. Skróty oznaczają: E & M – pole elektromagnetyczne, UV – ultrafiolet. Reaktywne formy tlenu/azotu w środowisku hodowli uważane są za główny czynnik powodujący obumieranie komórek nowotworowych *in vitro*. Jednakże hamowanie wzrostu tkanek podskórnego nowotworu przez ZPA zastosowaną nad skórą nadal pozostaje zagadką w medycynie plazmowej. (Urządzenie plazmowe, Plazma, ROS i RNS, Elektrony, Jony, Pożywka, Komórki na płytce, Zastosowanie w *in vitro*, Ciepło, Naskórek, Skóra, Komórki w skórze, Zastosowanie w *in vivo*)

EFEKT ANTYNOWOTWOROWY ZPA *IN VIVO*

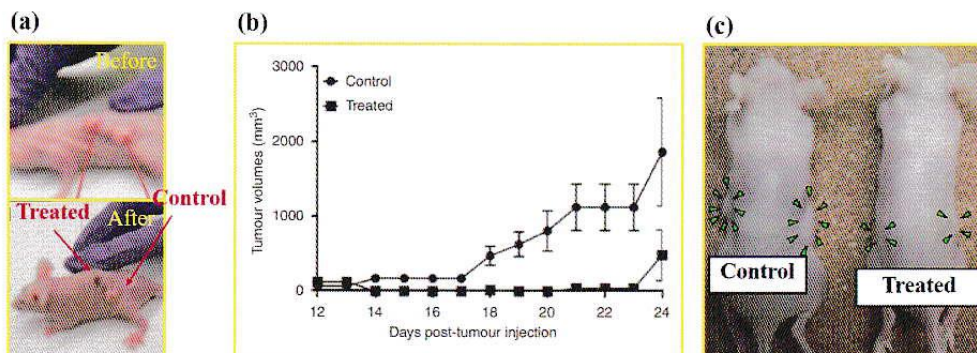
Do chwili obecnej w szeregu prac badawczych ZPA zastosowano do leczenia podskórnych heteroprzeszczepów nowotworów [20, 27, 30, 62, 87, 88] i czerniaka w myszach [89, 90]. We wszystkich tych badaniach osiągnięto podobny rezultat: wzrost nowotworu *in vivo* został w znacznym stopniu zatrzymany przez oddziaływanie ZPA na skórę myszy. Na przykład, nasze badania wykazały ten efekt w przypadku wstrzyknięcia podskórnego heteroprzeszczepu raka mysiego pęcherza [46] (Rysunek 6a). Po 24 godzinach od dwuminutowej terapii za pomocą ZPA leczony nowotwór zmniejszył się znacznie i nie był widoczny na skórze myszy [46]. Przeprowadziliśmy podobne eksperymenty na modelu mysiego czerniaka i stwierdziliśmy, że wzrost nowotworu został całkowicie zatrzymany po trzech tygodniach od leczenia za pomocą ZPA [46] (Rysunek 6 b). Odpowiadające temu wskaźniki przeżywania myszy również bardzo się zwiększyły w porównaniu do grupy kontrolnej nie poddanej oddziaływaniu ZPA [46]. Najnowsze badanie efektu antyczerniakowego DBD wykazało, że tkanka czerniaka całkowicie zniknęła 22 dnia po terapii ZPA [90].

Mechanizm antyrakowy terapii ZPA *in vivo* jest nadal otwartą kwestią. Ostatnio N. Gaur i in. udowodnili, że H_2O_2 , NO_2 i OH mogą być wytwarzane w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (*ang.* PBS) pokrytej warstwą żelatyny o grubości 1 mm, poddanej bezpośredniemu kontaktowi ze strumieniem plazmy [91]. Ten rezultat pokazuje, że możliwa jest dyfuzja form reaktywnych przez odpowiednik skóry. Także inne wyjaśnienia zostały zaproponowane. Według jednego obiecującego wyjaśnienia oddziaływanie ZPA aktywuje odpowiedź immunologiczną *in vivo* na atak nowotworu [92-94]. Makrofagi mogą

być aktywowane *in vitro* przez równomierne nanosekundowe impulsy DBD (nspDBD) i zwiększyć efekt gojenia się sztucznej rany [94]. Równomierne nanosekundowe impulsy DBD zwiększyły efekt antynowotworowy także przez zarówno indukcję immunogennej śmierci komórek nowotworowych, jak i zwiększenie funkcji makrofagu [93]. W swojej ostatniej pracy przeglądowej Vandana Miller i in. przedstawili obszerne wprowadzenie do obiecującej immunoterapii raka opartej na oddziaływaniu ZPA [92]. Optymalizując parametry ZPA w celu spowodowania immunologicznej śmierci komórek lokalnie w nowotworach można systematycznie wywoływać określone ochronne reakcje immunologiczne [92]. Oprócz tych bezpośrednich oddziaływań ZPA, także zdolność antynowotworowa pożywki PSM *in vivo* została potwierdzona poprzez wstrzykiwanie PSM bezpośrednio do podskórnych heteroprzeszczepów nowotworowych w myszach (Rysunek 6c) [71].

Najnowsze badania *in vivo* w modelu czerniaka myszy wykazały, że formy reaktywne takie, jak ROS i RNS są głównymi czynnikami przyczyniającymi się do likwidacji nowotworu za pomocą ZPA [90]. Jednakże należy zauważyć, że mechanizm działania ZPA *in vivo* może się różnić od mechanizmu *in vitro*. Stwierdzono, że w przypadku czerniaka w modelu myszy zastosowanie jedynie mieszanki żelu z H_2O_2 nie miało tak dużej skuteczności zabójczej, jak zastosowanie DBD [90]. W rzeczywistości zastosowanie mieszanki żel/ H_2O_2 tylko spowolniło wzrost nowotworu, ale nie zlikwidowało nowotworu [90]. Formy reaktywne inne niż H_2O_2 mogą także brać udział w interakcji między ZPA a tkanką rakową.

Należy poczynić kilka uwag dotyczących czynników fizycznych takich, jak promieniowanie, efekt cieplny, a także pole elektromagnetyczne. Pomimo iż uważa się, że czynniki fizyczne odgrywają mniej znaczącą rolę w efekcie antynowotworowym ZPA w warunkach *in vitro*, można oczekiwać pewnych efektów *in vivo* w przypadku bezpośredniego oddziaływania ZPA na skórę lub tkanki nabłonkowe. W jednym z ostatnich badań używając mysiego modelu heteroprzeszczepu wykazano, że wzrost temperatury na tkance rakowej *in vivo* poddawanej działaniu ZPA jest znikomy [90], co potwierdziło wcześniejsze doniesienia [46]. Chociaż stwierdzono, że wkład pola elektrycznego wytwarzanego przez ZPA do zdolności antynowotworowej ZPA był znikomy [90], potrzebne są dalsze badania tego efektu i jego znaczenia [95]. Ogólnie rzecz biorąc, efekt oddziaływania czynników fizycznych i chemicznych w przypadku zastosowania *in vivo* jest nadal w dużej mierze nieznanym.



Rysunek 6: Efekt antynowotworowy ZPA w modelu myszy. (a) Obraz myszy z dwoma guzami przed i po terapii plazmowej prowadzonej przez 24 h. Guzy podskórne hodowane są z posianych komórek rakowych pęcherza (*ang.* SCaBER) [46]. Reprodukcja za zgodą M. Keidara i in., British Journal of Cancer, 105, 1295 (2011). Copyright 2011 Cancer Research UK. (b) Efekt oddziaływania zimną plazmą na wzrost guza w modelu mysiego czerniaka [46]. Reprodukcja za zgodą M. Keidara i in., British Journal of Cancer, 105, 1295 (2011). Copyright 2011 Cancer Research UK. (c) Obrazy gołej myszy z podskórnymi guzami NOS2TR przed i po wstrzyknięciu pożywki stymulowanej zimną plazmą. Zielone strzałki wskazują lokalizację guzów [71]. Reprodukcja za zgodą F. Utsumi i in., PLoS One, 8, e81576 (2013). Copyright 2013 Public Library of Science.

MECHANIZM ANTYNOWOTWOROWY ZPA *IN VITRO*

Chemiczna istota toksyczności ZPA

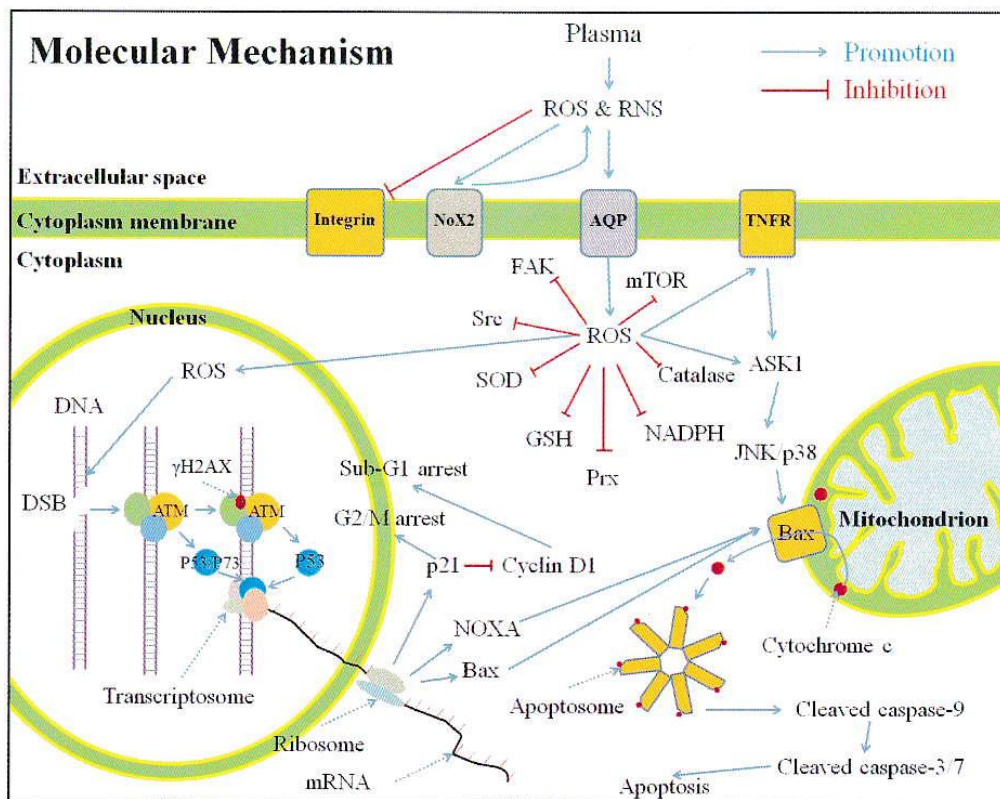
W większości badań *in vitro* komórki rakowe w trakcie oddziaływania ZPA były zanurzone w warstwie pożywki do hodowli komórek [62, 96, 97]. Jak wspomniano wcześniej, ta cienka warstwa pożywki ułatwia przemianę form reaktywnych w fazie gazowej w formy reaktywne rozpuszczone w fazie ciekłej [98]. Tak więc ta przemiana w pożywce poddanej oddziaływaniu ZPA lub PBS stanowi podstawę do zrozumienia chemicznej istoty toksyczności ZPA *in vitro*. Z powodu występowania buforujących substancji chemicznych w pożywce lub w PBS, krótkotrwałe oddziaływanie ZPA powoduje tylko nieznaczną zmianę w pH pożywki lub PBS [33, 81]. Udowodniono, że spośród różnych form pochodzących od plazmy, H₂O₂ jest główną formą reaktywną powodującą obumieranie komórek nowotworowych *in vitro* [37, 56, 72, 73, 75-77, 81, 83, 99, 100]. Faktycznie pożywka z odpowiednio wysokim stężeniem H₂O₂ jest toksyczna w stosunku do różnych komórek, w tym komórek rakowych [101, 102]. Jednakże oddziaływanie ZPA nie jest tożsame z oddziaływaniem H₂O₂, nawet w badaniach *in vitro*. Synergiczne użycie H₂O₂/NO₂⁻ lub H₂O₂/NO₂⁻/NO₃⁻ w pożywce do hodowli komórek lub w PBS może dać efekt antynowotworowy bardziej zbliżony do efektu oddziaływania ZPA niż użycia tylko pożywki zawierającej H₂O₂ lub PBS. [79, 103]. Niemniej jednak RNS (reaktywna forma azotu) jest drugorzędnym czynnikiem antynowotworowym w badaniach *in vitro* [79, 103]. Stwierdziliśmy, że nawet stężenie azotynu w pożywce staje się 100 razy silniejsze niż to wytworzone przez oddziaływanie ZPA. Nie będzie to miało zauważalnego wpływu na wzrost komórek glejaka, komórek raka piersi i komórek raka trzustki (wyniki nieopublikowane).

Zmiana błony komórkowej i kształtu komórek

Podstawowe zrozumienie mechanizmu antynowotworowego ZPA wylania się z badań *in vitro*. W tej części przedstawiamy streszczenie oparte na wszystkich publikacjach z tej dziedziny, które się ukazały do końca 2015 roku (Rysunek 7). Streszczenie to nie odzwierciedla punktów widzenia wszystkich badaczy w tej dziedzinie, ale przedstawia powszechnie uznane wnioski.

Reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS) pochodzące od ZPA (bezpośrednio lub w następstwie utworzone w pożywce) najpierw kontaktują się z błoną cytoplazmy. Krótco po oddziaływaniu ZPA w odpowiednio wysokiej dawce wiele komórek rakowych ulega zmianie morfologicznej z kształtów „rozpostartych” na kształty „skurczone” [2, 38, 49]. Obserwowaliśmy tę tendencję już godzinę po oddziaływaniu ZPA (nieopublikowane wyniki). W kształtach „skurczonych” zniknęła pozioma polaryzacja i występy cytoplazmatyczne [104]. Ponadto na skutek pojawienia się drobnych wypukłości na komórkach rakowych poddanych oddziaływaniu ZPA [105] komórki te mają bardziej chropowatą powierzchnię niż komórki rakowe nie poddane temu oddziaływaniu [104]. Zmianie kształtu komórek towarzyszy zmiana w architekturze cytoszkieletu takiego, jak F-aktyny [2, 104, 106]. Oddziaływanie ZPA także zmniejsza ekspresję integryny [2, 29, 53], kinazę ogniskowo-adhezyjną (FAK) [2], kinazę z rodziny Src (Scr) [104] i kinazę z rodziny Rho, w tym Rho i Rac [104], co powoduje powszechnie występujące zjawisko polegające na tym, że szybkość

migracji rakowych komórek poddanych działaniu ZPA zmniejsza się a szybkość ich odwarstwiania zwiększa się [29, 52].



Rysunek 7. Schemat ogólny mechanizmu antynowotworowego ZPA *in vitro* na podstawie publikacji, które ukazały się do końca 2015 roku. W skrócie: formy reaktywne pochodzące od ZPA powodują zauważalny wzrost wewnątrzkomórkowych ROS, co osłabia wewnątrzkomórkowy układ antyoksydacyjny a następnie powoduje poważne uszkodzenie obu nici DNA. W rezultacie następuje zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptoza poprzez szlak mitochondrialny lub szlak receptorowego czynnika martwicy nowotworu. Skróty oznaczają: ROS – reaktywne formy tlenu, RNS – reaktywne formy azotu, Nox – oksydazy NADPH, AQP – akwaporyny, TNFR – receptor czynnika martwicy nowotworu, FAK – kinaza ogniskowo-adhezyjna, Src – kinaza Src, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GSH – glutation, Prx – peroksyredoksyna, NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, mTOR – mechanistyczny cel rapamycyny, DNA – kwas deoksurybonukleinowy, DSB – dwuniciowe pęknięcie, ATM – zespół ataksji-teleangiektazji, mRNA – kwas rybonukleinowy informacyjny, ASK – kinaza regulująca sygnał apoptozy, JNK – kinaza N-końcowa białka c-Jun. (Mechanizm molekularny, Przedział pozakomórkowy, Błona cytoplazmy, Cytoplazma, Plazma, Promocja, Hamowanie, Integryna, Jądro, Transkryptosom, Rybosom, Zatrzymanie Sub-G1, Apoptosom, Mitochondrium, Cytochrom, Cyklina D1, Marker apoptozy, rozszczepiona kaspaza-9)

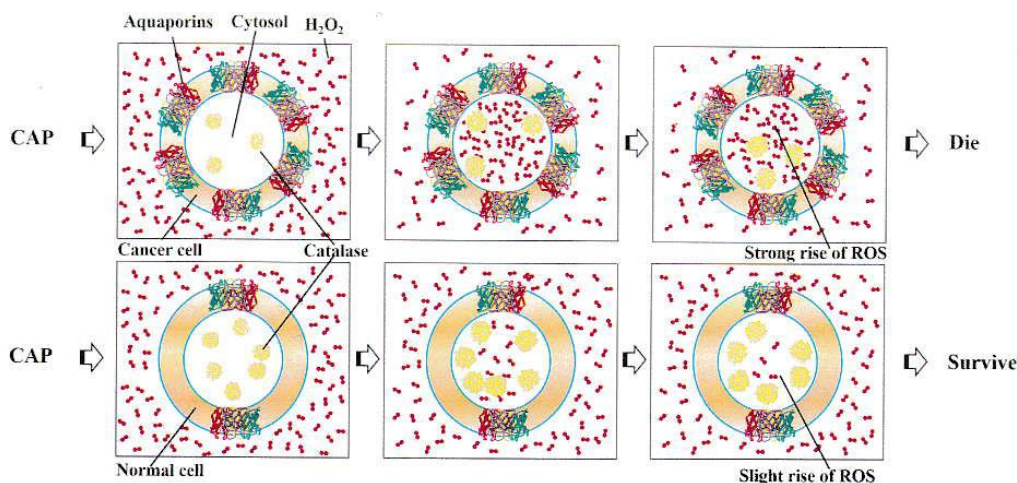
Dyfuzja przezbłonowa form reaktywnych

Znaczenie kanałów lub przenośników umiejscowionych w błonie komórkowej nie było jeszcze badane w medycynie plazmowej. Jednakże te białka błonowe mogą być kluczem do zrozumienia odpowiedzi komórkowej na oddziaływanie ZPA. Ponieważ większość form reaktywnych pochodzących od plazmy to cząsteczki naładowane lub polarne, potrzebne są kanały i przenośniki na błonie cytoplazmatycznej do dyfuzji przezbłonowej tych form reaktywnych (Tabela 1). Jak dotąd z form reaktywnych pochodzących od ZPA tylko NO jest

powszechnie uważany za cząsteczkę swobodnie dyfundującą [17]. Faktycznie ONOO potrafi swobodnie przechodzić przez błony fosfolipidowe przy współczynniku permeacji 400 razy wyższym niż współczynnik permeacji O_2 [107, chociaż pewne nieznane kanały mogą także być zaangażowane w dyfuzję przezbłonową [108]. Inne polarne lub naładowane formy reaktywne takie, jak H_2O_2 , NO_2^- [109] i NO_3^- [109, 110] potrzebują kanałów lub przenośników, aby ukończyć proces swojej przezbłonowej dyfuzji. Akwaporyny (*ang.* AQPs) zostały po raz pierwszy odkryte jako specyficzny kanał wodny [111]. Ostatnio została potwierdzona kluczowa rola rodziny akwaporyn w dyfuzji przezbłonowej szeregu małych cząsteczek takich, jak H_2O_2 , CO_2 , NO , NH_3 , mocznik, a nawet glicerol [112]. W rodzinie AQP, AQP 1, 3, 8 i 9 są kanałami błonowymi ułatwiającymi dyfuzję przezbłonową H_2O [113-116]. AQP 1 jest nawet w stanie ułatwić bierną dyfuzję NO przez błony komórkowe [117]. Do niedawna byliśmy pierwszymi, którzy wykazali kluczową rolę AQP 8 w komórkach glejaka (U87MG) jako kanałów dyfuzji przezbłonowej H_2O_2 pochodzącego od ZPA. Wyciszenie ekspresji AQP8 w komórkach U87MG znacznie ogranicza zdolność antynowotworową pożywki stymulowanej przez zimną plazmę (wyniki nieopublikowane). Tak więc akwaporyny mogą być kluczowym czynnikiem decydującym o zdolności antynowotworowej ZPA, szczególnie w kategoriach dyfuzji przezbłonowej H_2O_2 pochodzącego od plazmy [115]. Nawet jeśli niektórzy autorzy sugerowali, że zwiększona ilość wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) jest spowodowana produktami wtórnymi takimi, jak H_2O_2 z oksydaz NADPH (Nox) na błonie cytoplazmatycznej [53], dyfuzja przezbłonowa takiego wtórnego H_2O_2 także zależy od AQP [114, 118].

Tabela 1. Formy dyfuzji przezbłonowej niektórych form reaktywnych.

Formy reaktywne	Typy dyfuzji	Kanały/Przenośniki
NO	Dyfuzja bierna/kanały	AQP 1 [117]
H_2O_2	Kanały	AQP 1 [113], 3 [114], 8 [115], 9 [116]
NO_2^-	Przenośniki	NRT 2 [109]
NO_3^-	Kanały/przenośniki	AQP 6 [110], NRT 1 [109], NRT 2 [109]
$ONOO^-$	Kanały	Nieznane kanały anionowe [108]



Rysunek 8. Zmodyfikowany selektywny model oparty na wyrażonej ekspresji akwaporyn (AQPs) i katalazy w komórkach rakowych i w komórkach zdrowych. Komórki rakowe wykazują w wielu przypadkach więcej AQPs i mniej katalazy niż homologiczne komórki zdrowe. (Akwaporyny, Cytosol, Komórka rakowa, Katalaza, Komórka zdrowa, Duży wzrost ROS, Śmierć, Mały wzrost ROS, Przeżycie, ZPA)

Wzrost wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) i równowaga redoks

Znaczny wzrost wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu to najczęstsza reakcja komórek poddanych działaniu ZPA [119], w tym komórek nowotworowych [18, 1120], zdrowych nieprzekształconych komórek ssaków [5, 18] i komórek drożdży [34]. Najczęściej stosowaną wewnątrzkomórkową sondą ROS w tej dziedzinie jest diocetan 2,7-dichlorodihydrofluoresceiny (H_2DCFDA) – barwnik fluorescencyjny wrażliwy na utleniacze [17, 22, 27, 56, 71, 120]. Ponieważ H_2DCFDA nie jest swoistą sondą ROS, chemiczna istota wzrostu wewnątrzkomórkowych form tlenu jest nadal nieznana. Niemniej wielu badaczy uważa, że H_2O_2 [56, 100, 120], $OH\cdot$ [51] i $O_2\cdot$ [81] to główne wewnątrzkomórkowe ROS, których zwiększona obecność występuje w komórkach poddanych działaniu ZPA. Znaczenie wpływu zwiększonej obecności ROS na zdolność antynowotworową ZPA zostało szeroko zweryfikowane na podstawie obserwacji, że ZPA nie jest w stanie przeciwstawić się wzrostowi komórek rakowych jeśli te komórki zostały wcześniej poddane działaniu zmiataczy wewnątrzkomórkowych ROS takich, jak n-acetylocysteina (NAC) [22, 27, 120], d-mannitol [120], rotenon [18] i apocynina [18]. W przypadku nieprzekształconych zdrowych komórek ssaków, uprzednie poddanie ich oddziaływaniu NAC sprawia, że są one całkowicie odporne na dwuniciowe pęknięcia (DSB) DNA powodowane przez ZPA. [5]. Pochodzenie zwiększonych wewnątrzkomórkowych ROS jest nadal dyskusyjne. Większość autorów jest zgodna, że zwiększona ich obecność bierze się z dyfuzji pozakomórkowych ROS pochodzących od ZPA przez błonę cytoplazmatyczną [17, 18, 27]. Wyjaśnienie to jest zgodne ze spostrzeżeniem, że wewnątrzkomórkowe ROS zwiększają się dokładnie 5 minut po oddziaływaniu ZPA [17, 22]. Ostatnio stwierdzono, że obecność Nox na membranie cytoplazmatycznej powoduje wzrost wewnątrzkomórkowych ROS i spadek żywotności komórek raka jelita grubego po oddziaływaniu ZPA [53]. Reaktywne formy pochodzące od ZPA mogą aktywować tylko ekspresję Nox2 w komórkach nowotworowych, ale nie wchodzą bezpośrednio do cytoplazmy [53]. Nox może generować drugorzędowe ROS takie, jak ponadtlenek, który dodatkowo hamuje wzrost komórek [53]. Tak więc obecność wewnątrzkomórkowych ROS może być częściowo spowodowana przez drugorzędowe ROS pochodzące z oksydazy na błonie cytoplazmy komórki.

Zakłócenie wewnątrzkomórkowej równowagi redoks hamowane jest przez różnorodne układy antyoksydacyjne, w tym małe cząsteczki takie, jak glutation (GSH), zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH) i enzymy zmiatające ROS takie, jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksyredoksyna [121], katalaza, reduktaza tioredoksyny [122, 123] i reduktaza glutationowa [124]. Wzrost wewnątrzkomórkowych ROS zużywa i osłabia dziedziczny układ antyoksydacyjny w cytoplazmie. Przykładem jest GSH (glutation) – małowczątkowy tiol występujący w największej ilości w komórkach ssaków [125]. Zredukowana postać GSH to tripeptyd ze środkową resztą cysteinową. W wyniku utleniania reszty cysteinowej tworzy się wiązanie dwusiarczku z resztą cysteinową na innym GSH [125]. GSSG oznacza stan utleniony GSH [125]. Zmniejszony stosunek GSH/GSSG i NADPH/NADP stwierdzono w liniach komórek rakowych poddanych działaniu ZPA [37, 96]. Ponadto zmniejszoną ekspresję katalazy [37], SOD [37] i peroksyredoksyny (Prx) [126] stwierdzono także po terapii ZPA. Niewątpliwie osłabiony wewnątrzkomórkowy układ antyoksydacyjny ułatwia wzrost wewnątrzkomórkowych ROS.

Uszkodzenie DNA i szlaki apoptozy

W komórkach czerniaka poddanych oddziaływaniu ZPA szlak apoptozy bazującej na receptorze czynnika martwicy nowotworu (TNFR) został uaktywniony na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowych ROS [127]. Podobne szlaki apoptozy wykryto w komórkach raka głowy i szyi poddanych działaniu ZPA [62]. Jednakże większość szlaków apoptozy obserwowanych w komórkach nowotworowych poddanych działaniu ZPA bazuje na szlaku mitochondrialnym powstałym na skutek uszkodzenia DNA i uszkodzenia mitochondrialnego. Uszkodzenie DNA powszechnie obserwowano jako zdarzenie występujące w początkowym etapie terapii ZPA [44, 119]. Główny rodzaj uszkodzenia to DSB [27, 36, 64]. Ważnym markerem DSB jest swoista fosforylacja na serynie 139 na histonie H2AX (γ -H2AX), którą powszechnie obserwowano niedługo po oddziaływaniu ZPA [5, 27, 36, 38]. Seryna 139 na H2AX jest fosforylowana przez zespół ataksja-teleangiektazja (ATM) rekrutowany w miejscu dwuniciowego pęknięcia (DSB) przez inne kompleksy odpowiedzi na uszkodzenie DNA [108, 128]. Zwiększoną ekspresję ATM obserwowano w komórkach rakowych płaskich komórek nabłonka jamy ustnej poddanych działaniu ZPA [129]. Aktywowany monomeryczny ATM może fosforylować p53 i inne podłoże w kompleksach odpowiedzi na uszkodzenie DNA zlokalizowanych w miejscach DSB [129]. Fosforylację p53 (p-p53) obserwowano w komórkach rakowych płaskich komórek nabłonka jamy ustnej poddanych działaniu ZPA [129] i komórkach czerniaka [130]. Ponadto bezpośrednio po zwiększonej ekspresji p-p53 w komórkach czerniaka (B16F10) myszy poddanych działaniu ZPA następuje ekspresja γ -H2AX [38], która dostarcza wskazówek pomocnych w ustaleniu chronologicznej kolejności szlaków. Ponadto ATM może także fosforylować p73, co jeszcze bardziej aktywuje ekspresję czynników pro-apoptycznych [108]. Stwierdzono zwiększoną ekspresję p73 w komórkach czerniaka (Me1007) poddanych działaniu ZPA [131]. Nokaut genu p73 w komórkach Me1007 wyraźnie zmniejsza zdolność antynowotworową ZPA [131].

Fosforylacja p53 stanowi konieczny etap dla szeregu dalszych szlaków zatrzymania cyklu komórkowego [108, 128]. Aktywacja ekspresji p21 przez p53 została potwierdzona w różnych liniach komórek nowotworowych poddanych działaniu ZPA [129, 130]. Aktywowany p21 wywołuje dalsze różnorodne zatrzymania cyklu komórkowego [132]. W komórkach rakowych płaskich komórek nabłonka jamy ustnej poddanych działaniu ZPA p21 hamuje funkcję cykliny D1, powodując wyraźne zatrzymanie sub-G1 [129]. W komórkach czerniaka poddanych działaniu ZPA p21 wywołuje zatrzymanie G2/M poprzez nieznaną szlak [130]. Zatrzymanie cyklu komórkowego G2/M obserwowano także w szeregu innych

komórek nowotworowych poddanych działaniu ZPA [64, 133, 134], jednakże występujący tam mechanizm nie jest znany.

Ponadto fosforylacja p53 jest także konieczna, aby wyzwolić szlaki apoptozy bazujące na mitochondriach [132]. Gen p53 aktywuje ekspresję czynników pro-apoptycznych takich, jak Bax, PUMA i NOXA [132]. Te czynniki pro-apoptyczne ostatecznie powodują wydzielenie cytochromu c i innych międzybłonowych białek mitochondrialnych do cytozolu [135, 136], gdzie cytochrom c łączy się z czynnikiem-1 aktywującym proteazę apoptyczną (Apaf-1) i ostatecznie tworzy apoptosom [137]. Następnie ten apoptosom aktywuje kaspazę-9 poprzez rozszczepienie [138, 139]. Aktywowana kaspaza-9 z kolei aktywuje kaspazę-3/7 [138, 140] i ostatecznie zapoczątkowuje szereg zdarzeń apoptycznych [138]. Wśród nich rozszczepienie polimerazy poli ADP-rybozy (PARP) jest ważnym wczesnym markerem molekularnym apoptozy [138]. Apoptoza jest głównym rodzajem śmierci komórek nowotworowych po poddaniu ich działaniu ZPA [43, 44, 119]. W komórkach nowotworowych poddanych działaniu ZPA powszechnie obserwowano wydzielenie cytochromu c do cytozolu [38], ekspresję NOXA [141], Bax [142], kaspazy-9 [143] i kaspazy-3/7 [38, 47, 62, 130], rozszczepienie PARP [3, 64], utratę mitochondrialnego potencjału przezbłonowego [33, 38, 62, 96, 130] oraz fragmentację DNA [60]. Krótko mówiąc, komórki nowotworowe poddane działaniu ZPA przechodzą przez typowe szlaki uszkodzenia DNA [108, 128] a także przez dobrze poznane szlaki apoptozy [144].

Selektywny mechanizm antynowotworowy

W odróżnieniu od większości metod antynowotworowych takich, jak chemioterapia i radioterapia, główną zaletą ZPA jest jej selektywna zdolność antynowotworowa, którą wykazano dla dziesiątków linii komórek nowotworowych [119]. W jednakowych warunkach doświadczalnych ZPA wykazuje tendencję do przeciwstawiania się wzrostowi komórek nowotworowych raczej niż wzrostowi zdrowych komórek homologicznych [119], poprzez wyzwalanie więcej apoptozy w komórkach nowotworowych niż w komórkach zdrowych [15, 16, 55]. Zrozumienie tego selektywnego mechanizmu antynowotworowego stanowi jedno z kluczowych wyzwań w tej dziedzinie. Taki efekt selektywny może być głównie spowodowany szeroko obserwowanym zjawiskiem polegającym na tym, że wyraźny wzrost ROS występuje selektywnie w komórkach nowotworowych raczej niż komórkach zdrowych poddanych identycznemu działaniu ZPA [18, 53, 96, 127, 145]. Poziom ROS zmierzony w komórkach nowotworowych jest wyższy niż ten w komórkach zdrowych po poddaniu ich działaniu ZPA [18, 53, 96, 127, 145]. Jednakże ZPA zabija więcej komórek nowotworowych niż zdrowych komórek homologicznych w kilku przypadkach [133, 146].

Aby wyjaśnić powyższą tendencję zaproponowano dwa modele. Według pierwszego modelu różnica we wzroście ROS między zdrową tkanką a tkanką nowotworową spowodowana jest różnicą w poziomach podstawowych wewnątrzkomórkowych ROS między komórkami nowotworowymi a komórkami zdrowymi [9, 44]. Uważa się, że na skutek silniejszego metabolizmu w komórkach nowotworowych poziom podstawowych ROS jest wyższy niż w komórkach zdrowych [147-150]. Gdy dodatkowy stres ROS taki, jak reaktywne formy pochodzące od ZPA działa na komórki, całkowita ilość wewnątrzkomórkowych ROS w komórkach nowotworowych łatwiej przekroczy wartość graniczną niż w komórkach zdrowych [9, 44]. W efekcie komórki nowotworowe łatwiej doznają apoptozy niż komórki zdrowe poddane działaniu ZPA [119]. Model poziomu podstawowych ROS jest w stanie wyjaśnić pojawienie się wyższego poziomu ROS w komórkach nowotworowych poddanych działaniu ZPA, ale nie potrafi wyjaśnić selektywnego wzrostu ROS w komórkach nowotworowych.

Ostatnio w pracy przeglądowej [119] zaproponowano nowy model oparty na akwaporynach – jedyńskich sprawdzonych kanałach H_2O_2 w błonie cytoplazmatycznej. Biolodzy zajmujący się nowotworami potwierdzają, że większość tkanek nowotworowych wykazuje tendencję do ekspresji więcej AQPów na ich błonach cytoplazmatycznych niż zdrowe tkanki homologiczne [151]. Po terapii ZPA, H_2O_2 pochodzący od ZPA dyfunduje w tkanki nowotworowe dużo szybciej niż w zdrowe komórki homologiczne, powodując znacznie wyższy wzrost ROS w komórkach nowotworowych niż w komórkach zdrowych [119]. Pomimo bezpośrednich dowodów modelowi temu brakuje jeszcze dwóch pośrednich dowodów na poparcie naszej propozycji. Po pierwsze, pobór H_2O_2 w komórkach HEK 293 ssaków, komórkach gruczolakoraka HT29 ludzkiej okrężnicy a także w komórkach raka szyjki macicy HeLa może zostać znacznie zwiększony przez ekspresję AQP 3 na błonie komórkowej [114]. Po drugie, komórki drożdży wyrażające AQP 8 i AQP 1 mają dużo większą odporność na roztwór H_2O_2 niż komórki drożdży nie wyrażające tych akwaporyn [115]. Tak duża różnica w zdolności konsumpcji H_2O_2 przez komórki nowotworowe i komórki zdrowe może stanowić podstawę selektywnego mechanizmu antynowotworowego ZPA. Model bazujący na AQPach nie tylko wyjaśnia obserwowany selektywny wzrost ROS w komórkach rakowych, ale także wyjaśnia nasze najnowsze spostrzeżenie, że komórki glejaka wykazują tendencję do znacznie szybszej konsumpcji H_2O_2 w pożywce niż astrocyty [119]. Należy podkreślić, że selektywna zdolność antynowotworowa wynikająca z modelu opartego na AQPach nie musi koniecznie zaistnieć. Jeżeli komórki nowotworowe wyrażają mniej AQP1, 3, 8 i 9 niż odpowiednie zdrowe komórki homologiczne, ZPA może zabić te komórki nowotworowe bez selektywności lub nawet zabić więcej komórek zdrowych niż komórek nowotworowych.

Oprócz powyższych modeli ukazało się doniesienie oparte na korelacji między ekspresją p53 a wrażliwością linii komórek nowotworowych na działanie ZPA [84]. Stwierdzono, że komórki, w tym komórki nowotworowe i komórki zdrowe, wyrażające gen p53 były bardziej odporne na działanie ZPA niż komórki nowotworowe bez genu p53 [84]. Przed tym doniesieniem, zaobserwowano także tendencję, że komórki rakowe charakteryzujące się wyższą szybkością rozmnażania są bardziej wrażliwe na działanie ZPA niż komórki rakowe z niższą szybkością rozmnażania [106]. Utrata p53 jest kluczowym momentem w rozwoju nowotworu [75]. Wiele nowotworów będących w zaawansowanym stadium onkogenezy ma tendencję do utraty p53 [75]. Ponadto komórki nowotworowe z zaawansowanego stadium onkogenezy wykazują tendencję do wyrażania więcej AQP niż komórki nowotworowe z niskiego stadium zaawansowania rozwoju nowotworu. Na przykład, ekspresja AQP 8 w komórkach glejaka (gwiazdziak stopnia czwartego) jest większa niż w przypadku gwiazdziaka stopnia pierwszego, drugiego i trzeciego [152]. Chociaż nie wykazano bezpośredniego związku między ekspresją p53 a akwaporynami w biologii nowotworów, model bazujący na akwaporynach może teoretycznie wyjaśnić korelację między poziomem ekspresji p53 a wrażliwością komórek nowotworowych na ZPA. Ujmując to najprościej, komórki nowotworowe bez p53 mogą mieć tendencję do wyrażania więcej akwaporyn, przez co komórki rakowe bez p53 zużywają reaktywne formy pochodzące od ZPA takie, jak H_2O_2 szybciej niż komórki rakowe bez p53. Ta hipoteza może posłużyć za podstawę korelacji p53-ZPA.

Wewnątrzkomórkowy układ antyoksydacyjny może również przyczyniać się do selektywnego mechanizmu antynowotworowego, chociaż nadal brak jest bezpośredniego dowodu. Równowaga między wniknięciem reaktywnych form tlenu pochodzących z zewnątrz komórki a oporem ze strony wewnątrzkomórkowego układu antyoksydacyjnego decyduje o zmianie wewnątrzkomórkowych ROS [153, 154]. Jak już wspomniano, wewnątrzkomórkowe układy antyoksydacyjne zawierają szereg enzymów takich, jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, reduktaza glutationowa, peroksydaza glutationowa, jak również małe

UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, ZPA wykazuje obiecujący potencjał stania się selektywnym narzędziem antynowotworowym. Wstępne badania przeprowadzone w minionej dekadzie wykazały, że ZPA może skutecznie hamować wzrost dziesiątków linii komórek nowotworowych *in vitro* głównie poprzez uruchomienie apoptozy. ZPA jest także w stanie efektywnie powstrzymać wzrost podskórnych heteropszczepów nowotworów u myszy poprzez nieznaną mechanizm. Reaktywne formy pochodzące od ZPA uważane są za główne czynniki prowadzące do śmierci komórek, jednak czynniki fizyczne ZPA również mogą pełnić jakieś pomniejsze funkcje. Mimo że nadal jest daleko do poznania molekularnego mechanizmu antynowotworowego, aktualnie prowadzone badania wykazują, że apoptoza komórek nowotworowych poddanych działaniu ZPA *in vitro* jest spowodowana głównie intensywnym pękaniem obu nici DNA na skutek znacznego wzrostu wewnątrzkomórkowych form tlenu (ROS). Zróżnicowana ekspresja kanałów akwaporynowych i wewnątrzkomórkowych enzymów antyoksydacyjnych takich, jak katalazy w komórkach nowotworowych i komórkach zdrowych wydaje się możliwym do przyjęcia mechanizmem kontroli selektywnej dyfuzji reaktywnych form przez błonę cytoplazmatyczną komórek nowotworowych i selektywnego wzrostu wewnątrzkomórkowych ROS w komórkach nowotworowych. Ponieważ odpowiadające tym komórkom zdrowe komórki homologiczne doświadczają jedynie słabego wzrostu ROS, ZPA jest w stanie selektywnie powodować apoptozę w komórkach nowotworowych *in vitro*.

PODZIĘKOWANIA

Niniejsza praca została w części subsydiowana poprzez grant 1465061 otrzymany od National Science Foundation.

KONFLIKTY INTERESÓW

Nie ma konfliktu interesów.

LITERATURA

1. Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J and Leprince P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *SpectrochimicaActa Part B: Atomic Spectroscopy*. 2006; 61(1):2-30.
2. Lee HJ, Shon CH, Kim YS, Kim S, Kim GC and Kong MG. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma.
3. *New Journal of Physics*. 2009; 11(11):115026.
4. Park GY, Park SJ, Choi MY, Koo IG, Byun JH, Hong JW, Sim JY, Collins GJ and Lee JK. Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications. *Plasma Sources Science and Technology*. 2012; 21(4):043001.
5. Cheng X, Sherman J, Murphy W, Ratovitski E, Canady J and Keidar M. The Effect of Tuning Cold Plasma Composition on Glioblastoma Cell Viability. *PloS one*. 2014; 9(5):e98652.

6. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, Friedman G and Azizkhan-Clifford J. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*. 2011; 6(1):e16270.
7. Laroussi M and Akan T. Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Processes and Polymers*. 2007; 4(9):777-788.
8. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN and Fridman A. *Applied Plasma Medicine*. *Plasma Processes and Polymers*. 2008; 5(6):503-533.
9. Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine? *Plasma Science, IEEE Transactions on*. 2009; 37(6):714-725.
10. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2012; 45(26):263001.
11. Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M and Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 2010; 82(6):1223-1237.
12. Jeong J, Babayan S, Tu V, Park J, Henins I, Hicks R and Selwyn G. Etching materials with an atmospheric-pressure plasma jet. *Plasma Sources Science and Technology*. 1998; 7(3):282.
13. Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma chemistry and plasma processing*. 2003; 23(1):1-46.
14. Wagner H-E, Brandenburg R, Kozlov K, Sonnenfeld A, Michel P and Behnke J. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. *Vacuum*. 2003; 71(3):417-436.
15. Shashurin A, Shneider MN, Dogariu A, Miles RB and Keidar M. Temporary-resolved measurement of electron density in small atmospheric plasmas. *Applied Physics Letters*. 2010; 96(17):171502.
16. Georgescu N and Lupu AR. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. *Plasma Science, IEEE Transactions on*. 2010; 38(8):1949-1955.
17. Kim JY, Kim S-O, Wei Y and Li J. A flexible cold microplasma jet using biocompatible dielectric tubes for cancer therapy. *Applied Physics Letters*. 2010; 96(20):203701.
18. Yan X, Xiong Z, Zou F, Zhao S, Lu X, Yang G, He G and Ostrikov KK. Plasma-Induced Death of HepG2 Cancer Cells: Intracellular Effects of Reactive Species. *Plasma Processes and Polymers*. 2012; 9(1):59-66.
19. Ja Kim S, Min Joh H and Chung TH. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Applied Physics Letters*. 2013; 103(15):153705.
20. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, www.impactjournals.com/oncotarget 14 Oncotarget Fridman A, Gutsol A, Vasilets V and Friedman G. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2007; 27(2):163-176.
21. Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A and Pouvesle J-M. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non-thermal plasma treatment. *Plasma medicine*. 2011; 1(1):27-43.
22. Kaushik NK, Uhm H and Ha Choi E. Micronucleus formation induced by dielectric barrier discharge plasma exposure in brain cancer cells. *Applied Physics Letters*. 2012; 100(8):084102.

23. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A and Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2012; 9(66):147-157.
24. Barezzi N and Laroussi M. Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2012; 45(42):422002.
25. Laroussi M, Mohades S and Barezzi N. Killing adherent and nonadherent cancer cells with the plasma pencil. *Biointerphases*. 2015; 10(2):029401.
26. Zhang X, Li M, Zhou R, Feng K and Yang S. Ablation of liver cancer cells *in vitro* by a plasma needle. *Applied Physics Letters*. 2008; 93(2):021502.
27. Zirnheld JL, Zucker SN, DiSanto TM, Berezney R and Etemadi K. Nonthermal plasma needle: development and targeting of melanoma cells. *Plasma Science, IEEE Transactions on*. 2010; 38(4):948-952.
28. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, Sobilo J, Gosset D, Kieda C, Legrain B, Pouvesle JM and Pape AL. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012; 130(9):2185-2194.
29. Laroussi M, Richardson JP and Dobbs FC. Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Applied Physics Letters*. 2002; 81(4):772.
30. Shashurin A, Stepp MA, Hawley TS, Pal-Ghosh S, Brieda L, Bronnikov S, Jurjus RA and Keidar M. Influence of Cold Plasma Atmospheric Jet on Surface Integrin Expression of Living Cells. *Plasma Processes and Polymers*. 2010; 7(3-4):294-300.
31. Brulle L, Vandamme M, Ries D, Martel E, Robert E, Lerondel S, Trichet V, Richard S, Pouvesle JM and Le Pape A. Effects of a non-thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-lucorthotopic pancreatic carcinoma model. *PloS one*. 2012; 7(12):e52653.
32. Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F and Hori M. Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Applied Physics Letters*. 2012; 100(11):113702.
33. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, Weiss FU, Evert M, Huebner NO, Guenther C, Heidecke CD, Kramer A, Bussiahn R, Weltmann KD, Pati O, Bender C, et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *BMC cancer*. 2012; 12:473.
34. Panngom K, Baik KY, Nam MK, Han JH, Rhim H and Choi EH. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell death & disease*. 2013; 4:e642.
35. Ma RN, Feng HQ, Liang YD, Zhang Q, Tian Y, Su B, Zhang J and Fang J. An atmospheric-pressure cold plasma leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulating intracellular reactive oxygen species and calcium. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2013; 46(28):285401.
36. Reuter S, Tresp H, Wende K, Hammer MU, Winter J, Masur K, Schmidt-Bleker A and Weltmann K. From RONS to ROS: tailoring plasma jet treatment of skin cells. *Plasma Science, IEEE Transactions on*. 2012; 40(11):2986-2993.
37. Han X, Klas M, Liu Y, Sharon Stack M and Ptasinska S. DNA damage in oral cancer cells induced by nitrogen atmospheric pressure plasma jets. *Applied Physics Letters*. 2013; 102(23):233703.
38. Zhao S, Xiong Z, Mao X, Meng D, Lei Q, Li Y, Deng P, Chen M, Tu M, Lu X, Yang G and He G. Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative

- and nutritive stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells. *PloS one*. 2013; 8(8):e73665.
39. Kim GJ, Kim W, Kim KT and Lee JK. DNA damage and mitochondria dysfunction in cell apoptosis induced by nonthermal air plasma. *Applied Physics Letters*. 2010; 96(2):021502.
 40. Lu X, Naidis GV, Laroussi M, Reuter S, Graves DB and Ostrikov K. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects. *Physics Reports*. 2016; 630:1-84.
 41. Berekzi N and Laroussi M. Effects of Low Temperature Plasmas on Cancer Cells. *Plasma Processes and Polymers*. 2013; 10(12):1039-1050.
 42. Keidar M, Shashurin A, Volotskova O, Ann Stepp M, Srinivasan P, Sandler A and Trink B. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas*. 2013; 20(5):057101.
 43. Schlegel J, Körtzner J and Boxhammer V. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine*. 2013; 1(2):2-7.
 44. Ratovitski EA, Cheng X, Yan D, Sherman JH, Canady J, Trink B and Keidar M. Anti - Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers*. 2014; 11(12): 1128-1137.
 45. Keidar M. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology*. 2015; 24(3): 033001.
 46. Hirst AM, Frame FM, Arya M, Maitland NJ and O'Connell D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016; 37(6):7021-7031.
 47. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R and Trink B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British journal of cancer*. 2011; 105(9):1295-1301.
 48. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F and Hori M. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine*. 2011; 1(3-4).
 49. Kaushik NK, Attri P, Kaushik N and Choi EH. A preliminary study of the effect of DBD plasma and osmolytes on T98G brain cancer and HEK non-malignant cells. *Molecules*. 2013; 18(5):4917-4928.
 50. Kim GC, Kim GJ, Park SR, Jeon SM, Seo HJ, Iza F and Lee JK. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2009; 42(3):032005.
 51. Kim SJ, Chung TH, Bae SH and Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Applied Physics Letters*. 2010; 97(2):023702.
 52. Ninomiya K, Ishijima T, Imamura M, Yamahara T, Enomoto H, Takahashi K, Tanaka Y, Uesugi Y and Shimizu N. Evaluation of extra- and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric-pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2013; 46(42):425401.
 53. Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M and Zhang LG. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PloS one*. 2013; 8(9):e73741.
 54. Ishaq M, Evans MDM and Ostrikov K. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and

- Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma. PloS one. 2016; 11(2):e0150279.
70. Park JH, Kumar N, Park DH, Yusupov M, Neyts EC, Verlackt CC, Bogaerts A, Kang MH, Uhm HS, Choi EH and Attri P. A comparative study for the inactivation of multidrug resistance bacteria using dielectric barrier discharge and nano-second pulsed plasma. Scientific reports. 2015; 5:13849.
 71. Yan D, Sherman JH, Cheng X, Ratovitski E, Canady J and Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. Applied Physics Letters. 2014; 105(22):224101.
 72. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M and Kikkawa F. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemoresistant ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. PloS one. 2013; 8(12):e81576.
 73. Yokoyama M, Johkura K and Sato T. Gene expression responses of HeLa cells to chemical species generated by an atmospheric plasma flow. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 450(4):1266-1271.
 74. Mohades S, Laroussi M, Sears J, Barekzi N and Razavi H. Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells. Physics of Plasmas. 2015; 22(12):122001.
 75. Yang H, Lu R, Xian Y, Gan L, Lu X and Yang X. Effects of atmospheric pressure cold plasma on human hepatocarcinoma cell and its 5-fluorouracil resistant cell line. Physics of Plasmas. 2015; 22(12):122006.
 76. Yan D, Nourmohammadi N, Bian K, Murad F, Sherman JH and Keidar M. Stabilizing the cold plasma-stimulated medium by regulating medium's composition. Scientific reports. 2016; 6:26016.
 77. Adachi T, Nonomura S, Horiba M, Hirayama T, Kamiya T, Nagasawa H and Hara H. Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury. Scientific reports. 2016; 6:20928.
 78. Judee F, Fongia C, Ducommun B, Yousfi M, Lobjois V and Merbahi N. Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. Scientific reports. 2016; 6:21421.
 79. Kumar N, Park JH, Jeon SN, Park BS, Choi EH and Attri P. The action of microsecond-pulsed plasma-activated media on the inactivation of human lung cancer cells. Journal of Physics D: Applied Physics. 2016; 49(11):115401.
 80. Kurake N, Tanaka H, Ishikawa K, Kondo T, Sekine M, Nakamura K, Kajiyama H, Kikkawa F, Mizuno M and Hori M. Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasmaactivated medium. Arch Biochem Biophys. 2016; 605:102-108.
 81. Boehm D, Heslin C, Cullen PJ and Bourke P. Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. Scientific reports. 2016; 6:21464.
 82. Kaushik N, Kumar N, Kim CH, Kaushik NK and Choi EH. Dielectric Barrier Discharge Plasma Efficiently Delivers an Apoptotic Response in Human Monocytic Lymphoma. Plasma Processes and Polymers. 2014; 11(12):1175-1187.
 83. Takai E, Kitamura T, Kuwabara J, Ikawa S, Yoshizawa S, Shiraki K, Kawasaki H, Arakawa R and Kitano K. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. Journal of Physics D: Applied Physics. 2014; 47(28):285403.
 84. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J and Keidar M. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. Scientific reports. 2015; 5:18339.

85. Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee K-W and Song K. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Preferentially Induces Apoptosis in p53-Mutated Cancer Cells by Activating ROS Stress-Response Pathways. *PloS one*. 2014; 9(4):e91947.
86. Gibson AR, McCarthy HO, Ali AA, O'Connell D and Graham WG. Interactions of a non - thermal atmospheric pressure plasma effluent with PC - 3 prostate cancer cells. *Plasma Processes and Polymers*. 2014; 11(12):1142-1149.
87. Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I and Clupek M. Aqueousphase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-secondorder post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Science and Technology*. 2014; 23(1):015019.
88. Walk RM, Snyder JA, Srinivasan P, Kirsch J, Diaz SO, Blanco FC, Shashurin A, Keidar M and Sandler AD. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*. 2013; 48(1):67-73.
89. Mirpour S, Piroozmand S, Soleimani N, Jalali Fahanani N, Ghomi H, Fotovat Eskandari H, Sharifi AM, Mirpour S, Eftekhari M and Nikkhah M. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application. *Scientific reports*. 2016; 6:29048.
90. Yajima I, Iida M, Kumasaka MY, Omata Y, Ohgami N, Chang J, Ichihara S, Hori M and Kato M. Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expressions in melanocytic tumors of RET-transgenic mice. *Experimental dermatology*. 2014; 23(6):424-425.
91. Chernets N, Kurpad DS, Alexeev V, Rodrigues DB and Freeman TA. Reaction Chemistry Generated by Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Treatment is Responsible for the Tumor Eradication in the B16 Melanoma Mouse Model. *Plasma Processes and Polymers*. www.impactjournals.com/oncotarget 17 Oncotarget 2015; 12(12):1400-1409.
92. Gaur N, Szili EJ, Oh J-S, Hong S-H, Michelmore A, Graves DB, Hatta A and Short RD. Combined effect of protein and oxygen on reactive oxygen and nitrogen species in the plasma treatment of tissue. *Applied Physics Letters*. 2015; 107(10):103703.
93. Miller V, Lin A and Fridman A. Why target immune cells for plasma treatment of cancer. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2016; 36(1):259-268.
94. Lin A, Truong B, Pappas A, Kirifides L, Oubbari A, Chen S, Lin S, Dobrynin D, Fridman G and Fridman A. Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti - Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Processes and Polymers*. 2015; 12(12):1392-1399.
95. Miller V, Lin A, Fridman G, Dobrynin D and Fridman A. Plasma Stimulation of Migration of Macrophages. *Plasma Processes and Polymers*. 2014; 11(12):1193-1197.
96. Schoenbach KH, Abou-Ghazala A, Vithoulkas T, Alden RW, Turner R and Beebe S. (1997). The effect of pulsed electrical fields on biological cells. *Pulsed Power Conference, 1997 Digest of Technical Papers 1997 11th IEEE International: IEEE*, pp. 73-78.
97. Kaushik NK, Kaushik N, Park D and Choi EH. Altered Antioxidant System Stimulates Dielectric Barrier Discharge Plasma-Induced Cell Death for Solid Tumor Cell Treatment. *PloS one*. 2014; 9(7):e103349.

98. Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Maruyama S, Kodera Y, Terasaki H, Adachi T, Kato M, Kikkawa F and Hori M. Cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma with ultra-high electron density. *Physics of Plasmas*. 2015; 22(12):122004.
99. Adachi T, Tanaka H, Nonomura S, Hara H, Kondo S and Hori M. Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial nuclear network. *Free radical biology & medicine*. 2014; 79C:28-44.
100. Bekeschus S, Kolata J, Winterbourn C, Kramer A, Turner R, Weltmann KD, Bröker B and Masur K. Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free Radical Research*. 2014; 48(5):542-549.
101. Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer letters*. 2007; 252(1):1-8.
102. Nathan CF and Cohn ZA. Antitumor effects of hydrogen peroxide *in vivo*. *The Journal of experimental medicine*. 1981; 154(5):1539-1553.
103. Girard PM, Arbabian A, Fleury M, Bauville G, Puech V, Dutreix M and Sousa JS. Synergistic Effect of H₂O₂ and NO₂ in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. *Scientific reports*. 2016; 6:29098.
104. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, Lee J-S, Moon E, Lee K and Kim C-H. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Inhibits Thyroid Papillary Cancer Cell Invasion via Cytoskeletal Modulation, Altered MMP-2/-9/uPA Activity. *PloS one*. 2014; 9(3):e92198.
105. Recek N, Cheng X, Keidar M, Cvelbar U, Vesel A, Mozetic M and Sherman J. Effect of cold plasma on glial cell morphology studied by atomic force microscopy. *PloS one*. 2015; 10(3):e0119111.
106. Naciri M, Dowling D and Al-Rubeai M. Differential Sensitivity of Mammalian Cell Lines to Non-Thermal Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers*. 2014; 11(4):391-400.
107. Marla SS, Lee J and Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(26):14243-14248.
108. Denicola A, Souza JM and Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95(7):3566-3571.
109. Galvan A and Fernandez E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001; 58(2):225-233.
110. Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P and Yasui M. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells requirement of pore-lining residue threonine 63. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(42):39873-39879.
111. Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie*. 2004; 43(33):4278-4290.
112. Wu B and Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007; 64(18):2413-2421.
113. Bienert GP and Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1840(5):1596-1604.
114. Miller EW, Dickinson BC and Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(36):15681-15686.
115. Almasalmeh A, Krenc D, Wu B and Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *The FEBS journal*. 2014; 281(3):647-656.

116. Kawasaki T, Kusumegi S, Kudo A, Sakanoshita T, Tsurumaru T, Sato A, Uchida G, Koga K and Shiratani M. Effects of irradiation distance on supply of reactive oxygen species to the bottom of a Petri dish filled with liquid by an atmospheric O₂/He plasma jet. *Journal of Applied Physics*. 2016; 119(17):173301.
117. Herrera M, Hong NJ and Garvin JL. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*. 2006; 48(1):157-164.
118. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. www.impactjournals.com/oncotarget 18 Oncotarget The Journal of cell biology. 2011; 194(1):7-15.
119. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X and Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). *Biointerphases*. 2015; 10(4):040801.
120. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS and Lee J-S. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PloS one*. 2011; 6(11):e28154.
121. Cox AG, Winterbourn CC and Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *The Biochemical journal*. 2010; 425(2):313-325.
122. Sandalova T, Zhong L, Lindqvist Y, Holmgren A and Schneider G. Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(17):9533-9538.
123. Fritz-Wolf K, Kehr S, Stumpf M, Rahlfs S and Becker K. Crystal structure of the human thioredoxin reductasethioredoxin complex. *Nature communications*. 2011; 2:383.
124. Andreyev AY, Kushnareva YE and Starkov A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*. 2005; 70(2):200-214.
125. Filomeni G, Rotilio G and Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical pharmacology*. 2002; 64(5–6):1057-1064.
126. Weiss M, Gumbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, Walther R, Ekkernkamp A, Sckell A, Kramer A, Burchardt M, Lillig CH and Stope MB. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PloS one*. 2015; 10(7):e0130350.
127. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, Murphy AB and Ostrikov K. Atmospheric gas plasmainduced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 2014; 25(9):1523-1531.
128. Kastan MB. DNA Damage Responses: Mechanisms and Roles in Human Disease 2007 GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Molecular Cancer Research*. 2008; 6(4):517-524.
129. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, Lee J-S, Moon E, Baek SJ, Lee K and Kim C-H. Nonthermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G1 arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014; 545(0):133-140.
130. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, Karrer S, Zimmermann JL and Bosserhoff AK. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Experimental dermatology*. 2013; 22(4):284-289.

131. Ishaq M, Bazaka K and Ostrikov K. Intracellular effects of atmospheric-pressure plasmas on melanoma cancer cells. *Physics of Plasmas*. 2015; 22(12):122003.
132. Joerger AC and Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual review of biochemistry*. 2008; 77:557-582.
133. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA and Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific reports*. 2012; 2:636.
134. Gherardi M, Turrini E, Laurita R, De Gianni E, Ferruzzi L, Liguori A, Stancampiano A, Colombo V and Fimognari C. Atmospheric Non - Equilibrium Plasma Promotes Cell Death and Cell - Cycle Arrest in a Lymphoma Cell Line. *Plasma Processes and Polymers*. 2015; 12(12):1354-1363.
135. Yan N and Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21:35-56.
136. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91(4):479-489.
137. Yuan S, Yu X, Asara JM, Heuser JE, Ludtke SJ and Akey CW. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. *Structure*. 2011; 19(8):1084-1096.
138. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang H-G, Reed JC, Nicholson DW and Alnemri ES. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*. 1999; 144(2):281-292.
139. Zou H, Li Y, Liu X and Wang X. An APAF-1{middle dot}Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(17):11549-11556.
140. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997; 90(3):405-413.
141. Ishaq M, Bazaka K and Ostrikov K. Pro-apoptotic NOXA is implicated in atmospheric-pressure plasma-induced melanoma cell death. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2015; 48(46):464002.
142. Kaushik N, Uddin N, Sim GB, Hong YJ, Baik KY, Kim CH, Lee SJ, Kaushik NK and Choi EH. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Scientific reports*. 2015; 5:8587.
143. Wang C, Zhang H, Xue Z, Yin H, Niu Q and Chen H. The relation between doses or post-plasma time points and apoptosis of leukemia cells induced by dielectric barrier discharge plasma. *AIP Advances*. 2015; 5(12):127220. www.impaactjournals.com/oncotarget 19 Oncotarget
144. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*. 2002; 9(3):459-470.
145. Kim SJ and Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Scientific reports*. 2016; 6:20332.
146. Hirst AM, Simms MS, Mann VM, Maitland NJ, O'Connell D and Frame FM. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *British journal of cancer*. 2015; 112(9):1536-1545.
147. Trachootham D, Alexandre J and Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009; 8(7):579-591.

148. Cairns RA, Harris IS and Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer*. 2011; 11(2):85-95.
149. Wang J and Yi J. Cancer cell killing via ROS. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(12):1875-1884.
150. Cairns RA, Harris I, McCracken S and Mak TW. Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011; 76:299-311.
151. Papadopoulos MC and Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2015; 1848(10):2576-2583.
152. Zhu SJ, Wang KJ, Gan SW, Xu J, Xu SY and Sun SQ. Expression of aquaporin8 in human astrocytomas: correlation with pathologic grade. *Biochem Biophys ResCommun*. 2013; 440(1):168-172.
153. Bienert GP, Schjoerring JK and Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta*. 2006; 1758(8):994-1003.
154. Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB and Verrax J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*. 2011; 82(10):1384-1390.
155. MatÉs JM, Pérez-Gómez C and De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999; 32(8):595-603.
156. Nguyen NH, Park HJ, Yang SS, Choi KS and Lee JS. Anticancer efficacy of nonthermal plasma dissolved in a liquid, liquid plasma in heterogeneous cancer cells. *Scientific reports*. 2016; 6:29020.
157. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J and Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free radical biology & medicine*. 2015; 87:84-97.
158. Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K and Amino N. Decreased expression of catalase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2003; 33(1):6-9.
159. Asaduzzaman Khan M, Tania M, Zhang D-z and Chen H-c. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2010; 22(2):87-92.
160. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik Gand Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-Stransferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, andmalondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer letters*. 2005; 227(2):133-139.
161. Hwang TS, Choi HK and Han HS. Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007; 33(4):474-479.
162. Hempel N, Ye H, Abessi B, Mian B and Melendez JA. Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. *Free radical biology & medicine*. 2009; 46(1):42-50.

Published Online: March 2015

Accepted: March 2015

Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer

Abstract

Cold atmospheric plasma (CAP) is an emerging modality for the treatment of solid tumors. In-vitro experiments have demonstrated that with increasing doses of plasma, tumor cells assays display decreased cell viability. CAP is theorized to induce tumor cells into apoptosis via multiple pathways including reactive oxygen and nitrogen species as well as cell cycle disruption. Studies have shown CAP treatment can decrease mouse model glioblastoma multiforme tumor volume by 56%, increase life span by 60%, and maintain up to 85% viability of normal cells. Emerging evidence suggests that CAP is a viable in-vivo treatment for a number of tumors, including glioblastoma, as it appears to selectively induce tumor cell death while noncancerous cells remain viable.

OPISY LUDZI O DOŚWIADCZENIACH Z WODĄ BLUE LAGOON I WODĄ Z DYSZY:

Adam P. Anczykowski, November 2016

Mój kot Julek, Rosyjski Niebieski latem 2015 został straszliwie poraniony w walce prawdopodobnie z kuną: nie było połowy skóry na szyi widać było tylko gołe mięśnie, głowa strasznie pogryziona i spuchnięta. Utarłem kilka pastylek węgla drzewnego (z apteki) i zmieszałem z Ormusem do uzyskania papki. Nakładałem tą papkę na żywe mięso na szyi rano i wieczorem. Oprócz tego dawałem do pyszczka 2 ml Ormusa rano i wieczorem. Nieprawdopodobnie ale już po 3 dniach na szyi Julka zaczynała rosnąć sierść a opuchlizna głowy całkowicie zniknęła. Po paru tygodniach nie było śladu.

Wiosną 2016 roku Julek dostał wylewu krwi w kręgosłupie i został sparaliżowany od pasa w dół. Załatwiał się pod siebie bez żadnej kontroli i pełzał pomału podciągając się przednimi łapkami ale w zasadzie leżał na jednym boku. Wszyscy weterynarze, z którymi się kontaktowali mówili aby go uśpić bo nikt z nich nie znał przypadku aby kot z tego wyszedł. Nie dawałem mu Ormusa bo sytuacja wyglądała tragicznie. Wyniosłem go do ogrodu, do specjalnego domku bo w domu strasznie śmierdziało, nie chciałem go usypiać. Ale po 2 tygodniach zacząłem dawać mu po 2 ml Ormusa rano i wieczorem. Pewnego dnia, po ok. 3 tygodniach kuracji, Julek zniknął. Szukałem go wszędzie. Patrzę a on przelazł przez płot i jest u sąsiada w ogrodzie!

Teraz miło 6 miesięcy: Julek robi wszystko, nawet upolował ptaka, kuleje na jedną tylną łapkę ale żyje i jest w ok. 80% sprawny.

ciąg dalszy:

Po paru miesiącach zacząłem mu podawać do picia wodę z Dyszy Violet Ray 50% i 50% woda z Reaktora Zimnej Plazmy Violet Ray. I niemożliwe stało się możliwe: po 3 tygodniach Julek nagle zaczął chodzić prosto wcale nie utykając! Jest w 100% sprawny, nie ma śladu tych strasznych przeżyć. Ma 15 lat.

PAMIĘTAJ, NIGDY SIĘ NIE PODDAWAJ!

Adam P. Anczykowski, November 2016

Po picu przez 2 miesiące mieszanki wody z Reaktora Zimnej Plazmy i Dyszy oraz smarowaniu nią głowy i włosów: znaczący przyrost włosów, znaczące wzmocnienie włosów. Uszkodzony 5 lat temu kręgosłup wreszcie zupełnie przestał boleć.

Moja dentystka mówi, że moja skóra na twarzy zmieniła się nie do poznania.

Na siłowni: normalnie po treningu (30 lat trenowałem 4-6 godzin 7 dni w tygodniu) miałem tętno 170 (uderzeń serca na minutę) a teraz mam 93-100 !!! Rewelacja.

Całkowity brak zakwasów nawet po ciężkim treningu.

Śpię znacząco lepiej. Mogę pracować cały dzień bez zmęczenia do 4 rano.

Piję też Ormus.

Marta Cieśla 25Nov16

Po picu wody Blue Lagoon przez około 2 miesiące, czuję że cały mój organizm jest w harmonii.

Mam dużo energii witalnej, chęci do życia, tak jak by zmieniła się pamięć komórkowa całego mojego organizmu (wcześniej byłam non stop zmęczona i bez życia).

Wypróbowałam również wodę BL na ból zęba, ból tak dotkliwy że bolało mnie ucho środkowe i pół twarzy.

Po trzymaniu wody BL w ustach przez 2-3 minuty, po kilku takich seriach poczułam nagle dziwne drętwienie w buzi a ból zęba całkowicie zniknął J

Dziękuję za tą cudowną wodę.

Woda z plazmy z probiotykami używam tylko 1 łyk dziennie rano. Przed połknięciem trzymam ok 3 min. Ponieważ mam problemy z zębami są słabe i nadwrażliwe zauważyłam że nadwrażliwości się zmniejszała i mogę już jeść owoce bez bólu. Poprawiła się tkanka dziąseł. Pozdrawiam Karolina

Woda z dyszy trzymałam 3 tyg. W słoiku szklanym. Wypilałam ją jak się strulałam w restauracji dyspepsja ustąpiła po ok 15 min. Karolina Woda z dyszy usunęła kamień z czajników elektrycznego i gotowanego na piecyku. Karolina, November 2016

Cześć tu Rafał, Moja opinia dotycząca wody:

Po wypiciu łyka wody już byłem mocno zaskoczony. Po pierwsze sam smak wody, był niepowtarzalny i nie do porównania z jakąkolwiek inną wodą. Miało się wrażenie, picia czegoś bardzo czystego. Po drugie, poczułem momentalnie jak odblokowują mi się okolice oczu, miałem wrażenie że widzę zupełnie inaczej, lepiej. November 2016

Witaj Adamie,

Oto trochę informacji o wodzie, którą otrzymuję dzięki zamontowaniu na kranie DYSZY. Jestem bardzo zadowolona z jakości wody, nabrała ona miękkości, jest rzadsza, bardziej aksamitna, zmienił się jej zapach i ma w sobie dużo energii. Napoje zaparzone tą wodą mają zdecydowanie ciekawszy bukiet smaków i zapachów. A skóra w kontakcie z tą wodą staje się gładziej, jest nawilżona jak po balsamie - bardzo miłe odczucie.

Kosmetyki do mycia też zmieniają swoje właściwości, zużywam ich mniej a efekt jest lepszy np; szampon lepiej się pieni a włosy są bardziej miękkie i puszyste. Zauważyłam, że znacznie łatwiej utrzymać czystość kabiny natryskowej i wanny. Jakość tej wody powoduje, że na ich powierzchniach jest dużo mniejszy osad, a właściwie prawie go nie ma, a więc stosuje mniej chemicznych środków do ich czyszczenia.

W testowaniu wody brała udział też moja kotka; dostała trzy takie same miseczki z różnymi wodami. W pierwszej była miejska woda z kranu, w drugiej naturalna woda mineralna, a w trzeciej woda z dyszy. Kotka pije tylko wodę z dyszy.

Odnoszę wrażenie, iż picie tej wody, używanie jej do gotowania i mycia daje mi miły energetyczny i fizyczny komfort.

Na Twoje ręce składam podziękowanie Twórcy tego magicznego urządzenia, a Tobie bardzo serdecznie dziękuję, że mogę je mieć. Jola K. 12Oct16

Teresa P., Spain, 07Dec16

Witam Panie Adamie. Przepraszam tak jako ostatnio tyle się dzieje. Panie Adamie pieniądze są wysłane za tą ostatnią wodę Blue i za wysyłkę oraz zamawiam dwie butelki wody wraz z przesyłką. Sama nie mogę zdecydować do końca, ponieważ widzimy już poprawę przynajmniej ja napiszę o sobie mam więcej energii i wreszcie od 16 lat zaczęłam sprzątać bez bólu i problemu, nogi moje jedna była do połowy w samych guzach i całkiem ciemna, w chwili obecnej guzy zaczynają się rozchodzić a kolor jest o połowę jaśniejszy, również odkałd pije Ormusu nie byłam ani raz opuchnięta, nie wiem jak wygląda mój rdzeń. I kręgosłup ponieważ nie miałam w tym czasie robione rezonansu ale wiem że w ciągu tych dwóch miesięcy nie miałam ani razu silnych boli. Również nie kręci mi palców a boli reumatycznych praktycznie nie czuje. Badania ogólne będę miała 16 grudnia to napisze. Ja miałam po prostu wszystko chore od rdzenia, kręgosłup, nerki, tarczycę, żołądek, można powiedzieć wrak człowieka, dziś patrząc w lusterko wydaje mi się że jestem co najmniej 10 lat młodsza. Ale to nie wszystko moja córka lat 19 miała dwa lata temu wylew krwi do mózgu, obecnie studiuje medycynę i odkałd bierze Ormusu zdaje wszystkie egzaminy a oceny wszystkie są pomiędzy 8 a 10. Mąż miał wypadek, ma uszkodzony trzon kręgosłupa a kręgi w dolnej części kręgosłupa są polamane. Bol niesamowicie, odkałd bierze Ormus ból się zmniejszył dorosły mu włosy a twarz robiła się gładka. To tylko i aż tyle odkałd od dwóch miesięcy bierzemy Ormus a ostatnio bierzemy rano Ormus A wieczór Wodę Blue. Bardzo dziękuję Panie Adamie za pracę jaką Pan wykonał i ciągle wykonuje dla dobra ludzi. Jeszcze wspomnę że od młodych lat choruję. Przeszłam już nowotwór żołądka i nowotwór rdzenia a w ostatnich latach zagadam się z chorobą Sarcoidozę II reumatyzm, nerek i jelita grubego. Nikt sobie nie wyobraża cierpienia, bólu. Ale we mnie tkwi chęć życia i głęboka wiara. Dziękuję, przepraszam i życzę Panu i rodzinie radosnych, spokojnych Świąt Bożego Narodzenia

Witaj Adamie,

od września moja córka i ja bierzemy udział w Twoich fascynujących wykładach, na których mamy możliwość kupienia cudownych preparatów i urządzeń (Ormus, Dysza Violet Ray, krem i serum do twarzy).

Jestem zachwycona kremem Kokum Extreme – ma cudowny zapach, kojącą konsystencję wpływającą na miękkość i gładkość skóry - ogromny komfort stosowania. Stosowany wraz z serum daje spektakularne efekty – skóra wygładza się i wygląda na młodszą, zmarszczki się spływają, znikają przebarwienia. Zauważyłam też pozytywne skutki spożywania Ormusu Ultimate i wody z Dyszy Violet Ray – przede wszystkim znacznie zwiększyła się moja wytrzymałość fizyczna i odporność psychiczna. Kiedyś przy wchodzeniu na czwarte piętro miałam zadyszkę, a po miesiącu picia Ormusu i wody z Dyszy prawie wbiegam na to czwarte piętro bez wysiłku. Poza tym uświadomiłam sobie, że po całym dniu intensywnej pracy nie jestem tak zmęczona, jak to było przedtem. U córki cofnął się refluks. Mój mąż też odczuwa ich wspaniałe działanie. Wiosną stwierdzono u niego zakrzepicę w prawym podudziu, poddano go leczeniu, ale nie czuł się najlepiej. Po dwóch miesiącach spożywania Ormusu i wody z Dyszy lekarz nie mógł się nadziwić, bo naczynia krwionośne tak wyglądają, jakby nigdy tej zakrzepicy nie było! Serdecznie dziękujemy!

Bardzo ciepło pozdrawiam, Ilona M.

Witaj Adam chciałam się podzielić zmianami jakie zachodzą w moim organizmie po użyciu wody z DYSZY VIOLET RAY już po pierwszej kąpieli czułam mega ulgę i relax, skóra się wygładziła włosy nabrały blasku i puszystości. Dostę dużo pracuję czasem po 13 godzin i cały czas w ruchu od 5 godziny rano nawet i do 18 wieczorem kąpiel usuwa zmęczenie ciała i ducha. Kawa, herbata i wszystko co jest przygotowane na tej wodzie mają zupełnie niepowtarzalny smak. Mieszkam z mamą która choruje na przewlekłe choroby nadciśnienie, tarczycę bezsenność poważne problemy z oczami utrata wzroku ok 60% mama pije wodę od ok 3 dni ciśnienie zaczyna się normować zobaczymy to początek, dysza dla mnie jest bezcenna przemęczenie przestaje być problemem dziękuję Małgorzata K.

Witaj Adam dysza rewelacja wcześniej miałam okazję korzystać z dyszy grzecznościowo teraz mam swoją. Po kąpieli czuję jakbym chodziła cały dzień po górach a potem wzięła najwspanialszy energetyczny kąpiel na świecie zmienił się zapach potu i ciała mam wrażenie że organizm się odtruwa. Mam duży apetyt jem normalnie a nie tyję przeciwnie waga zleciała w dół, skóra staje się taka jasna niewiem jak to określić fakt od ponad roku piję ormus i miałam aktywację dna. Mój kot Olek pił bardzo mało wody bałam się trochę o jego nerki teraz jestem spokojna miseczka z wodą jest regularnie opróżniana. Kawa (gatunek taki sobie) która jest już po terminie zaparzana wodą z dyszy smakuje rewelacyjnie mogłabym tak pisać i pisać sumując mam najlepsze spa w kosmosie i dziękuję tym wolnym istotom dzięki którym dysza mogła trafić do nas Adam daj cynk jak będziesz miał lustra wiesz jakie kurczę zapominam jak się nazywają. Pozdrawiam Małgorzata K.

Adam opisuje moje doświadczenia po przyjmowaniu ormusu i wody z reaktora po pierwsze zatrzymana paradontoza miałam długo utrzymujący się stan zapalny przyzębia groziło mi usunięcie dolnych jedynek dziś po pół roku picia ormusu i wody nie ma śladu zapalenia, po drugie po kontuzji kolana lekarz stwierdził że musi być operowane dziś tańczę godzinami a rezonans nie wykazał żadnych urazów po trzecie trzeba cierpliwie obserwować co się dzieje w ciele bez paniki ciało samo się uzdrawia w najlepszej kolejności dotykało pamięci komórkowej różnych moich chorób np zapalenie uszu, węzłów chłonnych, złamana noga po kilku dniach wraca moc i siła ciała jestem zachwycona i bardzo zadowolona moja kondycja jest lepsza niż za młodych lat Adam bardzo dziękuję i polecam każdemu. Bogumiła T. 04Mar17

Moja mama 25 lat biegała po lekarzach, kontrolne badania były ciągle kiepskie, zwłaszcza wątrobowe. Po 2 miesiącach picia wody z reaktora w niewielkich ilościach poczuła się lepiej. Wyniki wszystkie w normie. Tomek z Dortmundu. 03Mar17

Witaj Adam,

Chcę podzielić się pierwszymi spostrzeżeniami dotyczącymi efektów użytkowania dyszy Violet Ray.

Pozwól sobie zauważyć, że dzięki wielkiemu zaufaniu do wiedzy przez którą nas prowadzisz i mozolnie odkrywanej przez nas samych, zdecydowaliśmy zakup dyszy bez jakiegokolwiek wiedzy na jej temat, przeniesiona grupa wrocławska nie miała wcześniej kontaktu z informacjami na temat tego urządzenia, więc dziękuję. Używamy jej w domu dopiero od miesiąca do kąpieli, pod prysznicem i do celów spożywczych.

Pierwszym efektem są niezwykle wrażenia podczas kontaktu z wodą pod prysznicem, woda zyskuje formę doskonale rozpylonej mgły nie tracąc siły uderzenia dając natychmiast cudowny efekt odprężenia, relaksu i spokoju, traktujemy to jako zabieg hydroterapeutyczny trwający o wiele dłużej niż zwykła kąpiel bardzo lekko i swobodnie się "oddycha" taką wodą, kierujemy dyszę na różne części ciała a twarz po dłuższym kontakcie zyskuje wygląd jak po zabiegach upiększających jest wypoczęta, świetlista, zrelaksowana jak po długim mocnym śnie, każdorazowy kontakt daje takie efekty natychmiast.

Szczególnie jest to widoczne i odczuwalne podczas wieczornego stosowania po długim męczącym dniu pracy, po takiej sesji czuję regenerację sił i odzyskaną energię jak po długim wypoczynku, czuję się silna i zdrowa, po bezsennych nocach śpię teraz głęboko budząc się rano z wypiekami na twarzy, jak u beztróskich

dzieci.

Jednak najważniejszy efekt w kontakcie z wodą dotyczy odczucia pełnego wysycenia organizmu wodą, tak dużego nawilżenia wewnątrz ciała i na zewnątrz że przestałam odczuwać pragnienie na poprzednim poziomie, woda także podczas picia jest bardzo wyjątkowo odróżnialna od zwykłej, miękka, delikatna i aksamitna bez wyczuwalnych śladów innych "dodatków", wrażenie że błyskawicznie wchłania się już od ust, wielka przyjemność w spożywaniu jej, jeśli chodzi o ewentualne niewielkie dolegliwości zniknęły w tak krótkim czasie problem wysychających i pękających stóp, stały się miękkie i delikatne bez żadnych dotychczasowych uporczywych zabiegów, zauważyliśmy również większą harmonię w przemianie materii, nie czuję już układu pokarmowego, absolutną preferencję lekkich, naturalnych posiłków ...i wielką, ogromną niechęć do zwykłej wody będziemy dalej obserwować jej dobroczynne i przyjemne działanie. Bardzo dziękuję i pozdrawiam serdecznie.
Do zobaczenia
Halina
