

بررسی القای آپوپتوز توسط پلاسمای سرد اتمسفری به عنوان مکانیسم مرگ سلولی در رده‌ی سلولی سرطان دهانه‌ی رحم (Hela)

طاهره طیبی^۱، محیا امین‌رعیای جزه^۲، محمدرضا خانی^۳، بابک شکری^۴، حسن نیک‌نژاد^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان و سومین عامل مرگ و میر در ایران است. روش‌های درمانی بسیاری برای مقابله با سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری و محیط فعال شده توسط آن، یکی از روش‌های تحقیقاتی نوین در زمینه‌ی درمان سرطان است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی القای آپوپتوز توسط پلاسمای سرد اتمسفری به عنوان مکانیسم مرگ سلولی در رده‌ی سلولی سرطان دهانه‌ی رحم (Hela) انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی ابتدا اثرات پلاسمای اتمسفری هلیوم + اکسیژن و محیط فعال شده توسط آن‌ها (Plasma activated medium) یا PAM بر روی زیست‌پذیری سلول‌های Hela مورد بررسی قرار گرفت. سپس، میزان H_2O_2 محیط و همچنین، میزان پروتئین‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۸، Bcl-2 B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) و Bcl-2-associated X (Bax) در هر دو روش تایش مستقیم پلاسمای و PAM به ترتیب از طریق MTT assay و Western Blot analysis و Medium H_2O_2 assay مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها در روش تایش مستقیم پلاسمای بیش از محیط فعال شده توسط آن بود ($P < 0/001$) و افزودن اکسیژن به پلاسمای باعث افزایش مرگ سلولی گردید. میزان H_2O_2 محیط در روش مستقیم بیش از روش محیط فعال شده بود ($P < 0/001$). همچنین، سطح بیان پروتئین‌های کاسپاز ۳- و کاسپاز ۸- در روش مستقیم، بالاتر از روش PAM بود ($P < 0/010$). افزایش نسبت Bcl-2/Bax نیز القای آپوپتوز را به عنوان مکانیسم اثر نشان داد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: پلاسمای سرد اتمسفری، منبعی برای تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی است و باعث تولید رادیکال‌های آزاد مانند H_2O_2 در محیط مایع می‌شود که نقش مهمی در مرگ سلول‌های سرطانی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پلاسمای مستقیم و PAM از طریق القای آپوپتوز، باعث مرگ سلولی می‌گردد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، زیست‌پذیری سلولی، گونه‌های فعال اکسیژن، گونه‌های فعال نیتروژن

ارجاع: طاهره، امین‌رعیای جزه، محیا، خانی محمدرضا، شکری بابک، نیک‌نژاد حسن. بررسی القای آپوپتوز توسط پلاسمای سرد اتمسفری به عنوان مکانیسم مرگ سلولی در رده‌ی سلولی سرطان دهانه‌ی رحم (Hela). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۵۶): ۱۳۶۰-۱۳۵۴

را دارا می‌باشد (۱-۲). در ایران نیز بعد از بیماری‌های قلبی - عروقی و تصادفات رانندگی، سرطان سومین عامل مرگ و میر می‌باشد و سرطان دهانه‌ی رحم، پنجمین سرطان شایع در زنان ایرانی است (۳). روش‌های درمانی معمول شامل جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی به دلیل غیر انتخابی بودن عملکردشان دارای عوارض بسیاری می‌باشند. بنابراین، استفاده از یک روش

مقدمه

بعد از بیماری‌های قلبی - عروقی، سرطان دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان است. طبق نتایج GLOBOCAN، سرطان‌های رایج در بین زنان در جهان شامل سینه (۲۵/۲ درصد)، کولورکتال (۹/۲ درصد)، ریه (۸/۷ درصد)، دهانه‌ی رحم (۷/۹ درصد) و معده (۴/۸ درصد) است و در این بین، سرطان دهانه‌ی رحم رتبه‌ی چهارم

۱- دانشجوی دکتری، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مهندس پلاسمای، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسمای، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیار، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسمای، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استاد، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسمای، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسن نیک‌نژاد

Email: niknejad@sbmu.ac.ir

درمانی که به صورت انتخابی موجب مرگ سلول‌های سرطانی شود، نتایج مؤثرتری در درمان سرطان خواهد داشت. یکی از روش‌هایی که به تازگی مورد توجه محققان قرار گرفته است، استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری و محیط فعال شده توسط آن (Plasma activated medium یا PAM) برای درمان سرطان است. پلاسمای سرد که شامل اتم‌ها، یون‌ها، مولکول‌های فعال و امواج الکترومغناطیسی می‌باشد، با اعمال یک میدان الکتریکی به یک گاز خنثی یا ترکیب گازها تولید می‌شود. اثر اشعه‌ی ماورای بنفش، گرما و همچنین، میدان الکترومغناطیسی روی محیط ناچیز است. دمای محیط کشت بعد از پردازش توسط پلاسمای سرد به حدود ۲۳-۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌رسد که از ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (دمای انکوباتور) کمتر است (۴-۶).

مشاهده‌ی پاسخ سلولی به پردازش توسط پلاسمای سرد در محیط *In vitro* ممکن است اغلب به دلیل تشکیل گونه‌های فعال (اکسیژنی و نیتروژنی) مختلف توسط پلاسمای سرد باشد (۶). گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive oxygen species یا ROS) مانند H_2O_2 (۷-۸) و گونه‌های فعال نیتروژنی (Reactive nitrogen species یا RNS) مانند NO_2^- (۹-۱۱) و $ONOO^-$ (۱۳) به طور گسترده‌ای در محیط فعال شده توسط پلاسمای سرد و دیگر محلول‌های آبی تیمار شده توسط پلاسمای شناسایی شده‌اند. محیط با غلظت به اندازه‌ی کافی بالای H_2O_2 برای سلول‌های سرطانی سمی است (۱۳-۱۴).

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد، موجب فعال شدن هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز به ویژه مسیر داخلی، از طریق اثر مستقیم بر میتوکندری و نشست سیتوکروم C می‌شوند (۱۵-۱۶). ROS از مسیرهای مختلف مرگ سلولی را القا می‌کند که از آن جمله می‌توان به آپوپتوز، نکروز و القای بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز نظیر Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) و Bcl-2-associated X (Bax) اشاره کرد. Bax، یک پروتئین پروآپوپتوزی است که مسیر میتوکندریایی مرگ سلولی را در مواجهه با استرس پیش می‌برد. در مقابل، Bcl-2 یک پروتئین آنتی‌آپوپتوزی است که از طریق مهار Bax آپوپتوز را مهار می‌کند. نسبت Bax/Bcl-2 به عنوان یک نشانگر مولکولی قوی جهت تعیین میزان مرگ سلولی از طریق آپوپتوز به کار می‌رود (۱۷).

در مطالعات پیشین، نشان داده شد که پلاسمای سرد به واسطه‌ی تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی، موجب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی در هر دو روش تیمار مستقیم و PAM می‌شود (۶). در این مطالعه، فرایند آپوپتوز به عنوان مکانیسم احتمالی مرگ سلولی القا شده توسط افزایش H_2O_2 در محیط پس از تیمار با تابش مستقیم پلاسمای و محیط فعال شده بررسی گردید. هدف از انجام این مطالعه، بررسی القای آپوپتوز توسط پلاسمای سرد

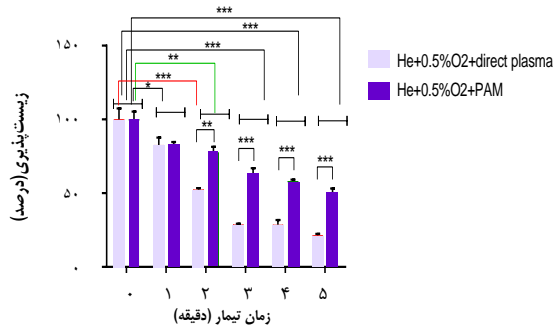
روش‌ها

جت پلاسمای: در این مطالعه‌ی تجربی بهینه‌سازی پلاسمای مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی تنظیم شد (۱۸، ۶). به طور خلاصه، جت مورد استفاده در این مطالعه شامل یک لوله‌ی مسی توخالی به عنوان الکترود مرکزی بود که به منبع ولتاژ بالای AC متصل شده بود. همچنین، از یک حلقه‌ی مسی به عنوان الکترود زمین و از یک استوانه از جنس (Acrylonitrile butadiene styrene یا ABS) به عنوان دی‌الکتریک بین دو الکترود استفاده گردید. فرکانس بهینه‌ی دستگاه ۲۵ کیلوهرتز و ولتاژ اعمالی ۶ کیلوولت بود. گازهای حامل پلاسمای ترکیب هلیوم با فلوی ۴ لیتر/دقیقه و ۰/۵ درصد اکسیژن با فلوی ۲۰ سانتی‌متر مکعب/دقیقه اکسیژن بودند.

کشت سلول: رده‌ی سلولی Hela از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) حاوی ۱۰ درصد (FBS) Fetal bovine serum و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (Penicillin-streptomycin) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس، میزان 1×10^4 سلول به هر خانه‌ی پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سلول‌ها در روش مستقیم با استفاده از پلاسمای هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری از نازل به مدت ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه مورد پردازش قرار گرفتند. در روش PAM نیز ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت در چاهک پلیت ۱۲ خانه و در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه مورد پردازش قرار گرفت و سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از این محیط فعال شده، جایگزین محیط روی سلول‌ها شدند. به منظور واکاوی آماری هر گروه شامل ۳ تکرار بودند و ۴۸ ساعت پس از تیمار نمونه‌ها توسط هر دو روش، آزمایش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) انجام گردید.

آزمایش MTT جهت بررسی زنده‌مانی سلول‌ها، آزمایش MTT انجام شد. بدین منظور، پس از تیمار سلول‌ها با هر دو روش، محیط کشت سلول‌ها تعویض و مقدار ۱۵ میکرولیتر محلول MTT ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، در محیط تاریکی، محیط رویی با ۲۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) جایگزین و به مدت ۱۵ دقیقه روی Shaker قرار داده شد. سپس، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر

فعال شده توسط آن کاهش یافت و با افزایش مدت زمان تیمار، این کاهش بیشتر شد. همچنین، پلاسما مستقیم نسبت به PAM باعث کاهش بیشتر زیست پذیری شد.

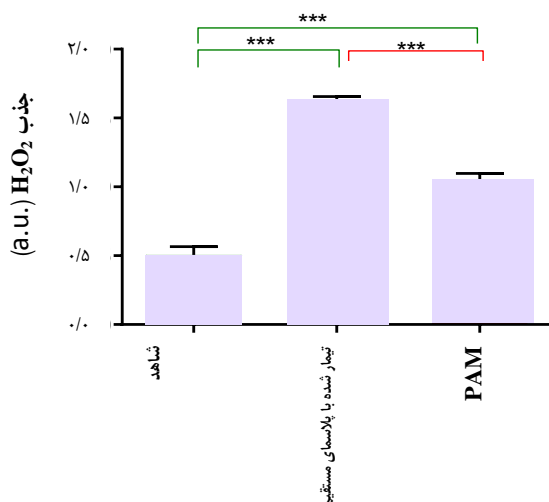


شکل ۱. زیست پذیری سلول‌های HeLa ۴۸ ساعت پس از تیمار با

پلاسما مستقیم و محیط فعال شده با پلاسما

$P < 0.05$; $***$; $P < 0.01$; $^{\circ}$; $P < 0.10$.

سنجش H_2O_2 به منظور بررسی تشکیل رادیکال‌های آزاد در محیط‌های تیمار شده، روش فلورومتری مورد استفاده قرار گرفت. همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، میزان جذب H_2O_2 پس از ۵ دقیقه تیمار با پلاسما مستقیم (مؤثرترین مدت زمان تیمار) به شکل معنی‌داری از جذب محیط PAM بیشتر بود و جذب H_2O_2 در هر دو محیط، بسیار بیشتر از محیط گروه شاهد بود.



شکل ۲. جذب H_2O_2 در گروه شاهد (تیمار نشده)، تیمار شده با

پلاسما مستقیم و تیمار شده با Plasma activated medium

(PAM) ($***P < 0.001$)

(Model 680; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) خوانش گردید.

سنجش H_2O_2 ارزیابی وجود H_2O_2 در محیط گروه شاهد (بدون هر نوع تیمار)، گروه تیمار مستقیم با پلاسما و گروه تیمار با PAM (۵ دقیقه تیمار در هر دو گروه)، با استفاده از کیت سنجش فلورومتری یک H_2O_2 (Sigma-Aldrich, MAK165-1KT) و بر اساس دستورالعمل شرکت تولید کننده‌ی کیت انجام شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از محیط حاصل از کشت سلول‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و جذب H_2O_2 با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج‌های ۴۵۰ و ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

واکاوی Western-Blot. برای بررسی بیان پروتئین‌های دخیل در فرایند آپتوز، از تکنیک Western-Blot استفاده شد. سلول‌ها پس از تیمار با پلاسما مستقیم و PAM جهت انجام واکاوی پروتئینی جمع‌آوری شدند و با استفاده از بافر لیز کننده‌ی Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) (Santa Cruz Biotechnology, USA) حاوی مهارکننده‌های پروتئاز و ۰.۳ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) تجزیه شد. پروتئین‌ها با روش Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (BIO-RAD) جداسازی و پس از انتقال روی غشاهای نیتروسولوزی، با استفاده از محلول ۵ درصد سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) بلوکه شدند. پس از این مرحله، غشاهای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ (به ترتیب با غلظت ۱:۳۰۰ و ۱:۲۰۰) (R&D Systems, USA) و Bax و Bcl-2 (هر دو با غلظت ۱:۱۵۰) (Cell Signaling, USA) انکوبه شدند. سپس، غشاهای شستشو داده و در محلول حاوی آنتی‌بادی‌های ثانویه مناسب کانزوگه با HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) قرار داده شدند. پروتئین بتا-آکتین (1:300, Abcam, USA) به عنوان پروتئین کنترل جهت طبیعی سازی کردن پروتئین‌های هدف در نظر گرفته شد. ایمونوبات‌ها با استفاده از دستگاه کمی لومینسانس مشاهده و شدت هر باند با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد.

واکاوی آماری داده‌ها: واکاوی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA در نرم‌افزار GraphPad prism نسخه‌ی ۸ انجام گردید و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

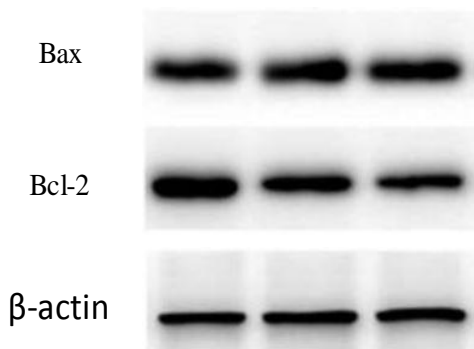
یافته‌ها

تأثیر پلاسما بر زیست‌پذیری سلول‌های HeLa همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی HeLa پس از ۴۸ ساعت از تیمار با تابش مستقیم پلاسما و همچنین، محیط

همچنین، نتایج ارزیابی بیان پروتئین پروآپوپتوتیک Bax و پروتئین آنتی آپتوتیک Bcl-2 نشان داد که در هر دو روش تیمار، بیان Bax افزایش و بیان Bcl-2 کاهش داشته و در تنظیم بیان این دو پروتئین نیز تیمار با پلاسمای مستقیم مؤثرتر بوده است. افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 منجر به افزایش نسبت Bax/Bcl-2 به عنوان یک اندیکاسیون مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز شده است (شکل ۴).

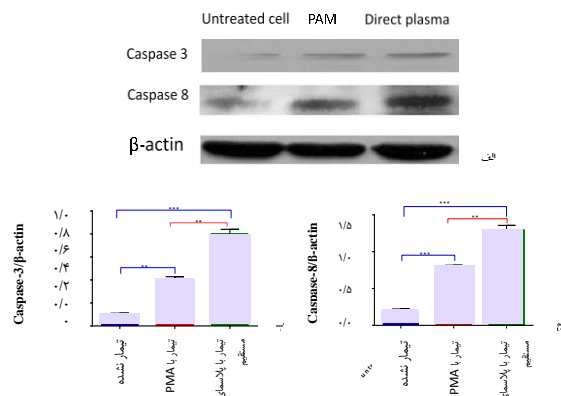
بحث

استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری و محیط فعال شده توسط آن در سال های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در مطالعه ای که به تازگی توسط این گروه انجام شده، گونه های اکسیژنی و نیتروژنی پلاسمای تعیین و مشخص شد که افزودن اکسیژن، موجب افزایش این گونه ها می شود. همچنین، اثرات وابسته به دز (زمان تیمار) پلاسمای مستقیم و PAM و اثر تأخیری این دو روش در کاهش زیست پذیری سلول های سرطانی نشان داده شد (۱۸، ۶). Keidar و همکاران نشان دادند که سلول های طبیعی نسبت به سلول های سرطانی مقاومت بیشتری نسبت به تیمار با پلاسمای سرد اتمسفری نشان می دهند (۱۹). Kang و همکاران مشاهده کردند که پلاسمای سرد اتمسفری در محیط *In vitro* روی سلول های سرطان سر و گردن باعث مرگ سلولی با الگوی وابسته به دز می شود (۲۰). Vandamme و همکاران، در محیط *In vivo* بعد از ۵ روز تیمار با پلاسمای، کاهش زیست پذیری سلولی از طریق بیولومینسانس همراه با کاهش حجم تومور در U87 گلیوما را مشاهده کردند (۲۱).



الف

واکاوای بیان پروتئین با تکنیک Western-Blot. بررسی بیان پروتئین های آپوپتوزی با تکنیک Western-Blot نشان داد که هر دو روش تیمار پلاسمای مستقیم و PAM، موجب افزایش بیان پروتئین های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ نسبت به گروه شاهد شدند و بیان هر دو پروتئین در گروه تیمار با پلاسمای مستقیم در مقایسه با گروه PAM افزایش بیشتری داشت (شکل ۳).



شکل ۳. الف) واکاوای Western-Blot کاسپاز-۳ و کاسپاز-۸

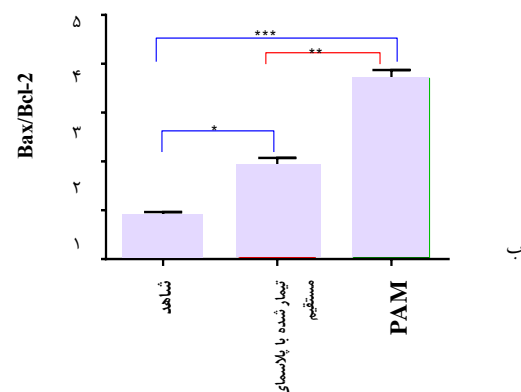
سلول های تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و

Plasma activated medium (PAM) (ب) نمودار نسبت

Caspase-3/ β -actin در سلول های تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و PAM (ج) نمودار نسبت Caspase-8/ β -actin در سلول های

تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و PAM

$P < 0.001$; *** ; $P < 0.01$; **



ب

شکل ۴. الف) واکاوای Western-Blot برای Bcl-2-associated X (Bax) و B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) سلول های تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و Plasma activated medium (PAM)، (ب) نمودار نسبت Bax/Bcl-2 در سلول های تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و PAM، (ج) نمودار نسبت Bax/Bcl-2 در سلول های تیمار نشده، تیمار شده با پلاسمای مستقیم و PAM

$P < 0.05$; *** ; $P < 0.01$; ** ; $P < 0.001$; *

Tanaka و همکاران نیز سلول‌های تومور گلیوبلاستوما و سلول‌های طبیعی Astrocytes را با محیط فعال شده با پلازما تحت درمان قرار دادند و مشاهده کردند که سلول‌های گلیوبلاستوما به صورت انتخابی توسط این محیط کشته می‌شوند (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر، از پلاسمای هلیم + ۰/۵ درصد اکسیژن به عنوان گاز حامل استفاده گردید؛ چرا که افزودن اکسیژن، باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی پلازما می‌گردد (۶). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، هر چه مدت زمان تیمار سلول‌ها توسط پلازما افزایش یابد و یا در روش PAM محیط برای فعال سازی مدت زمان بیشتری در معرض پلازما قرار گیرد، موجب کاهش بیشتر زیست‌پذیری سلول‌ها می‌گردد.

مطالعات مختلف گزارش کرده‌اند که چندین گونه‌ی فعال اکسیژنی نظیر H_2O_2 (۷-۸) و گونه‌های فعال نیتروژنی نظیر NO_2 (۹-۱۱) و $ONOO^-$ (۱۲) به طور گسترده‌ای در محیط کشت فعال شده توسط پلازما و دیگر محلول‌های آبی تیمار شده توسط پلازما وجود دارند. محیط با غلظت به اندازه‌ی کافی بالای H_2O_2 برای سلول‌های سرطانی سمی است (۱۳-۱۴).

بررسی تفاوت اثر تیمار مستقیم با پلاسمای سرد و تیمار با PAM نشان داده است که اثرات پلاسمای سرد مستقیم از دو طریق شامل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن نظیر H_2O_2 در محیط خارج سلولی و افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به این گونه‌های فعال اعمال می‌شود (۲۳). به علاوه، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که پلاسمای مستقیم در مقایسه با PAM میزان بیشتری H_2O_2 در محیط تولید کرده است (شکل ۲). این نتایج، مطابق با نتایج مطالعه‌ی Yan و همکاران می‌باشد که نشان داده‌اند تیمار با پلاسمای مستقیم علاوه بر افزایش H_2O_2 در محیط، موجب تولید H_2O_2 توسط سلول‌ها نیز می‌گردد. بنابراین، مقدار نهایی H_2O_2 تولید شده در محیط در روش پلاسمای مستقیم بیشتر از PAM است (۲۴) و همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، روش مستقیم، موجب کاهش بیشتر زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی شده است.

فرایند آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول)، از دو مسیر خارجی و داخلی فعال می‌شود. فعال شدن مسیر خارجی، وابسته به اتصال گیرنده‌های غشایی به لیگاند اختصاصی و سپس، فعال شدن کاسپاز ۸ می‌باشد؛ در حالی که مسیر داخلی در اثر نشت سیتوکروم C از غشای میتوکندری و فعال شدن کاسپاز ۹ شروع می‌شود (۲۵). گونه‌های فعال اکسیژن از مسیرهای مختلف منجر به القای مرگ سلولی می‌شوند که از آن جمله، می‌توان به آپوپتوز و القای بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز نظیر Bax و Bcl-2 اشاره کرد (۲۶). فعال

شدن مسیرهای آپوپتوزی از طریق رادیکال‌های آزاد درون سلولی از جمله O_2^- که به واسطه‌ی H_2O_2 تولید شده‌اند، در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (۱۶-۱۵). برای بررسی مرگ سلولی از طریق مکانیسم آپوپتوز، روش Western-Blot انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که بیان دو پروتئین آپوپتوزی کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در مقایسه با گروه شاهد افزایش چشم‌گیری داشته است (شکل ۳).

بررسی بیان کاسپاز ۳ به عنوان کاسپاز اجرایی هر دو مسیر داخلی و خارجی، در این مطالعه نشان می‌دهد که مرگ سلولی از طریق آپوپتوز صورت می‌گیرد و مسیرهای دیگری مانند نکروز در مرگ سلولی دخیل نبوده‌اند. رادیکال‌های آزاد، مسیر داخلی آپوپتوز را از طریق اثر مستقیم بر غشای میتوکندری و نشت سیتوکروم C انجام می‌دهند. به علاوه، در این مطالعه فعال شدن مسیر خارجی نیز با بررسی بیان کاسپاز ۸ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان می‌دهد مسیر خارجی آپوپتوز نیز فعال شده است. همان‌طور که نتایج مطالعه نشان می‌دهد، در روش تیمار مستقیم که H_2O_2 درون سلولی نیز تشکیل شده است، میزان مرگ سلولی بیشتر از روش غیر مستقیم می‌باشد که در آن، H_2O_2 فقط در محیط اطراف سلول‌ها وجود داشته است. این نتایج، مؤید این هستند که در گروه تیمار مستقیم، هر دو مسیر داخلی و خارجی فعال می‌باشند.

آپوپتوز توسط پروتئین‌های دیگری نظیر Bax و Bcl-2 نیز تنظیم می‌شود. Bax یک پروتئین پروآپوپتوزی است که مرگ سلولی را از طریق فعال کردن مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی) القا می‌کند. در مقابل، Bcl-2 یک پروتئین آنتی آپوپتوز است و فعالیت پروتئین Bax را مهار می‌کند. نسبت Bax/Bcl-2 به عنوان یک نشانگر مولکولی برای بیان میزان مرگ سلولی در نظر گرفته می‌شود (۱۷). بر طبق نتایج این مطالعه، بیان پروتئین Bax پس از هر دو روش تیمار، به ویژه با پلاسمای مستقیم، افزایش داشته است؛ در حالی که سطح پروتئین Bcl-2 کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد و این الگوی بیان، منجر به افزایش نسبت Bax/Bcl-2 شده است (شکل ۴).

مجموع این نتایج، اثبات می‌کند که تیمار با پلاسمای سرد اتمسفری، از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر H_2O_2 موجب مرگ سلول‌های سرطانی با القای آپوپتوز می‌شود.



تشکر و قدردانی

این مطالعه، با حمایت مالی مؤسسه‌ی ملی توسعه‌ی تحقیقات علوم پزشکی کشور (نیماد) در قالب گرنت پژوهشگر فرهیخته به شماره‌ی ۹۷۱۲۵۳ و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است.

References

1. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Geneva Switzerland: WHO; 2014.
2. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Online]. [cited 2012]; Available from: URL: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-2012>
3. Hajiesmaeil M, Tafvizi F, Sarmadi S. The association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cervical cancer. *Koomesh* 2016; 17(3):651-659. [In Persian].
4. Panggom K, Baik KY, Nam MK, Han JH, Rhim H, Choi EH. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis* 2013; 4: e642.
5. Kaushik N, Kumar N, Kim CH, Kaushik NK, Choi EH. Dielectric barrier discharge plasma efficiently delivers an apoptotic response in human monocytic lymphoma. *Plasma Process Polym* 2014; 11(12): 1175-87.
6. Aminraya Jezeh M, Khani M, Shokri B, Niknejad H. The effects of plasma-activated medium on the viability of breast (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cell lines. *J Isfahan Med Sch* 2019; 37(526): 493-9. [In Persian].
7. Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, et al. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PLoS One* 2014; 9(1): e86173.
8. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J, et al. Principles of using cold atmospheric plasma stimulated media for cancer treatment. *Sci Rep* 2015; 5: 18339.
9. Yan D, Sherman JH, Cheng X, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Appl Phys Lett* 2014; 105(22): 224101.
10. Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee KW, et al. 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.
11. Gibson AR, Graham W, O'Connell D, McCarthy H, Ali A. Effect of a non-thermal atmospheric pressure plasma effluent on liquid chemistry and cellular response. *Proceedings of 39th IEEE International Conference on Plasma Science*; 2012 Jul 8-12; Edinburgh, Scotland, UK. 2012.
12. Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I, Clupek M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxydinitrate through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Sci Technol* 2014; 23(1): 015019.
13. Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 2007; 252(1): 1-8.
14. Nathan CF, Cohn ZA. Antitumor effects of hydrogen peroxide in vivo. *J Exp Med* 1981; 154(5): 1539-53.
15. Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Suzuki-Karasaki Y. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 863-72.
16. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(12): 2977-92.
17. Khodapasand E, Jafarzadeh N, Farrokhi F, Kamalidehghan B, Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran Biomed J* 2015; 19(2): 69-75.
18. Aminraya Jezeh M, Khani M, Shokri B, Niknejad H. The effect of cold helium and helium-oxygen plasma on viability of breast (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cells. *Koomesh* 2019. [Unpublished].
19. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer* 2011; 105(9): 1295-301.
20. Kang SU, Cho JH, Chang JW, Shin YS, Kim KI, Park JK, et al. Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: The potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1056.
21. Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, et al. Antitumor effect of plasma treatment on u87 glioma xenografts: Preliminary results. *Plasma Process Polym* 2010; 7(34): 264-73.
22. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, et al. Plasma-activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by down-regulating a survival signaling molecule, AKT kinase. *Plasma Med* 2011; 1(3-4): 265-77.
23. Yan D, Xu W, Yao X, Lin L, Sherman JH, Keidar M. The cell activation phenomena in the cold atmospheric plasma cancer treatment. *Sci Rep* 2018; 8(1): 15418.
24. Yan D, Cui H, Zhu W, Talbot A, Zhang LG, Sherman JH, et al. The strong cell-based hydrogen peroxide generation triggered by cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10831.
25. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: A new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy* 2014; 16(1): 33-40.
26. Gomez Sarosi LA, Rieber MS, Rieber M. Hydrogen peroxide increases a 55-kDa tyrosinase concomitantly with induction of p53-dependent p21 waf1 expression and a greater Bax/Bcl-2 ratio in pigmented melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312(2): 355-9.

Evaluation of Inducing Apoptosis as Cell Death Mechanism by Cold Atmospheric Plasma in Cervix Cancer Cell Line (Hela)

Tahereh Tayebi¹, Mahya Aminrayajezeh², Mohammad Reza Khani³,
Babak Shokri⁴, Hassan Niknejad⁵

Original Article

Abstract

Background: Cancer is the second leading cause of death in the world and third in Iran. Various methods have been investigated for cancer treatment in which the use of cold atmospheric plasma and plasma-activated medium (PAM) are two new research methods in the field of cancer therapy. This study aimed to evaluate the inducing of apoptosis as cell death mechanism by cold atmospheric plasma in cervix cancer cell line (Hela)

Methods: At first, the effects of helium and helium + oxygen atmospheric plasma and PAM on the viability of Hela cell line were investigated. Then, the rate of H₂O₂ in the medium, and the levels of caspase-3, caspase-8, Bcl-2-associated X (Bax), and B-cell lymphoma protein 2 (Bcl₂) proteins in both direct plasma and PAM treatments were evaluated using MTT assay, medium H₂O₂ assay, and Western Blot analysis, respectively.

Findings: The decrease of cells viability in direct plasma treatment group was more than PAM group ($P < 0.001$), and adding oxygen to plasma increased the rate of cell death. The H₂O₂ level in medium in direct method was more than PAM ($P < 0.001$). Moreover, the expression of caspase-3 and caspase-8 proteins in direct plasma were higher than PAM ($P < 0.010$). Higher ratio of Bcl-2/Bax showed the induction of apoptosis in cancer cells ($P < 0.001$).

Conclusion: Cold atmospheric plasma is a source of oxygen and nitrogen reactive species, which can produce free radicals such as H₂O₂ in medium that plays an important role in the treatment of cancer. Moreover, direct plasma and PAM induce apoptosis in cancer cells, as a probable mechanism of cell death.

Keywords: Apoptosis, Cell viability, Reactive oxygen species, Reactive nitrogen species

Citation: Tayebi T, Aminrayajezeh M, Khani MR, Shokri B, Niknejad H. **Evaluation of Inducing Apoptosis as Cell Death Mechanism by Cold Atmospheric Plasma in Cervix Cancer Cell Line (Hela)**. J Isfahan Med Sch 2020; 37(556): 1354-60.

1- PhD Candidate, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Plasma Engineering, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4- Professor, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
5- Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hassan Niknejad, Email: niknejad@sbmu.ac.ir