

## اثر پلاسمای سرد اتمسفری بر بقای سلول‌های سرطانی سینه (MDA-MB-231) و دهانه‌ی رحم (Hela)

محیا امین رعیای جزه<sup>۱</sup> (M.Sc)، محمدرضا خانی<sup>۱</sup> (Ph.D)، حسن نیک‌نژاد<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، بابک شگری<sup>۱</sup> (Ph.D)

۱- پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۵

niknejad@sbmu.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۹۶۹

### چکیده

هدف: اخیراً گزارشاتی در زمینه استفاده از پلاسمای سرد اتمسفری در درمان سرطان منتشر شده است. در این مطالعه اثرات انتخابی پلاسمای سرد بر سلول‌های سرطانی سینه (MDA-MB-231) و دهانه رحم (Hela) به عنوان یک روش درمانی جدید سرطان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پلاسمای سرد اتمسفری توسط جت پلاسما تولید گردید و طیف‌سنجی نوری به منظور بررسی رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط پلاسما به کار گرفته شد. همچنین اثرات ترکیب‌های گازی هلیوم و اکسیژن و بازه‌های زمانی تابش پلاسما بر زیست‌پذیری سلول‌های MDA-MB-231 و Hela با فاصله ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تابش توسط تست MTT تعیین شدند. به منظور بررسی اثرات انتخابی پلاسما، روش تیمار مستقیم بر زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیبروبلاست مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی نتایج طیف‌سنجی نوری نشان داد که با کاهش فاصله‌ی نمونه از نازل تابش و افزایش ولتاژ کاری رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط پلاسما افزایش می‌یابند. افزایش زمان تابش مستقیم پلاسما از یک تا پنج دقیقه سبب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی گردید. بیش‌ترین پاسخ ضد سرطانی ۴۸ ساعت پس از تابش پلاسما و در ترکیب گازی هلیوم-اکسیژن مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که سلول‌های سرطانی به تیمار با پلاسما نسبت به سلول‌های نرمال فیبروبلاست حساس‌تر هستند. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج امیدبخش این مطالعه در کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی و اثر سمی کم‌تر بر سلول‌های نرمال، روش درمانی پلاسمای سرد می‌تواند به عنوان یک روش جدید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای سرد اتمسفری مستقیم (CAP)، رادیکال آزاد، سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم (Hela)، سلول‌های سرطان سینه (MDA-MB-231)، زیست‌پذیری

### مقدمه

شیمی‌درمانی و پرتودرمانی علاوه بر پیچیدگی، داشتن اثرات سوء بر روی سایر سلول‌ها و بافت‌ها، هزینه‌های زیادی را بر بیماران تحمیل می‌کنند و در برخی موارد، منجر به نتیجه مطلوب نمی‌شود [۵]. با توجه به درمان‌های معمول و عوارض جانبی آن نیاز به روشی جدید برای درمان سرطان به منظور بهبود بقا و کاهش عوارض جانبی وجود دارد. از جمله روش‌هایی که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است می‌توان به سلول‌درمانی با انواع سلول‌های بنیادی به‌ویژه سلول‌های مشتق از پرده آمیون اشاره کرد [۶، ۷]. یکی دیگر از روش‌های مورد استقبال، استفاده از پلاسمای سرد به منظور مقابله با سلول‌های سرطانی می‌باشد.

پلاسمای سرد اتمسفری نیز اخیراً به منظور درمان سرطان به دلیل اثر محدود بر سلول‌های نرمال در مقابل سلول‌های سرطانی

بنابر پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی بروز سرطان تا سال ۲۰۳۰ موجب ۱۳ میلیون مرگ در سراسر دنیا می‌شود و در ایران نیز در سال ۱۳۹۹ بروز سرطان به حدود ۸۶۰۰۰ مورد در کل جمعیت و میزان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان به حدود ۶۳۰۰۰ مورد خواهد رسید. [۲، ۱] سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است که پس از سرطان ریه دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان است [۳]. همچنین سرطان دهانه رحم پنجمین سرطان شایع زنان در ایران است و چهارمین سرطان شایع بین (۴۵-۱۵) سال در زنان ایرانی است [۴].

این گزارش‌ها نشان می‌دهد که توجه ویژه‌ای باید به این بیماری مبذول داشت. روش‌های متداول درمانی شامل: جراحی،

بود. فرکانس ۲۵ کیلوهرتز به عنوان فرکانس بهینه و کاری انتخاب و تمامی آزمایشات در این فرکانس صورت گرفت. هلیوم خالص و هلیوم/اکسیژن به عنوان گاز کاری انتخاب شدند. جریان گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹٪ در طول آزمایشات توسط یک کنترل‌کننده جرمی مدل (APEX, AX-MC) (SSLPM-D) کنترل گردید. یک بار از گاز هلیوم با فلوی ۴ لیتر بر دقیقه استاندارد (SLM) و بار دیگر از ترکیب گازی ۴ SLM هلیوم و ۰/۵٪ اکسیژن که معادل ۲۰ سانتی‌متر مکعب بر دقیقه استاندارد (SCCM) است، استفاده شد. فرکانس بهینه ۲۵ کیلوهرتز و ولتاژ کاری در هنگام استفاده از هلیوم ۵ کیلوولت و در زمان استفاده از گاز هلیوم و ۰/۵٪ اکسیژن ۶ کیلوولت بود، زیرا ضریب یونش اکسیژن بیش از هلیوم است و افزودن اکسیژن باعث کاهش طول شعله و افزایش ولتاژ کاری می‌شود.

#### طیف‌سنجی و اندازه‌گیری دما:

امروزه پلاسمای سرد اتمسفری به دلیل تولید گونه‌های فعال نیتروژنی و اکسیژنی کاربرد فراوانی در زمینه‌ی پلاسمای پزشکی یافته است. یک تکنیک مناسب برای اندازه‌گیری و بررسی خواص مختلف جت پلاسمای در یک روش غیر مخرب، استفاده از آنالیز طیف‌سنجی گسیل نوری (OES) است. سیستم OES شامل یک طیف‌سنج مدل Ocean optic- HR4000 بوده است که دارای محدوده فرکانسی آن ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر و با رزولوشن ۰/۲۷ نانومتر و توان تفکیک ۰/۶ - ۰/۷ نانومتر (Avaspec-3648-USB2) بود. در این مطالعه میزان گونه‌های فعال پلاسمای هلیوم در فواصل ۱، ۱/۵ و ۲ سانتی‌متر و در ولتاژها ۳، ۴ و ۵ کیلوولت توسط طیف‌سنجی گسیل نوری مورد بررسی قرار گرفت. دمای محیط کشت نیز در پلیت ۹۶ خانه پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم و هلیوم + ۰/۵٪ اکسیژن توسط دوربین حرارتی مدل FLIR E4 اندازه‌گیری شد که دارای کیفیت تصویر ۸۰×۶۰ پیکسل و حساسیت ۰/۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود [۲۳].

#### کشت سلول:

رده‌های سلولی (NCBI C115) Hela (MDA-MB-231) و (NCBI C578) normal human dermal fibroblast و (NCBI C646) از بانک سلولی انسیتوپاستور ایران خریداری شدند. سلول‌های سرطانی Hela (MDA-MB-231) و normal human dermal fibroblast در محیط کشت RPMI-1640 و DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک (Penicillin-streptomycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از این‌که سلول‌ها به تعداد مورد نیاز گسترش یافتند، سلول‌های Hela، MDA-MB-231 و human dermal fibroblast به میزان ۱×۱۰<sup>۴</sup> سلول به هر خانه پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد [۲۸-۳۰] و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷

مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه به بررسی اثر پلاسمای سرد بر دو رده‌ی سلولی سرطانی مربوط به دو سرطان رایج در میان زنان می‌پردازیم. پلاسمای گازی یونیزه است و از طریق دادن انرژی به گاز خنثی تولید می‌شود. پلاسمای شامل الکترون‌ها، فوتون‌ها، یون‌های مثبت/منفی، رادیکال‌های آزاد، میدان‌های الکتریکی ناپایدار و اشعه‌ی فرابنفش است [۸-۱۰]. دمای پلاسمای سرد اتمسفری نزدیک دمای اتاق است و برای پردازش بافت‌های حساس به گرما مناسب است [۱۱]. گروه‌های مختلف تحقیقاتی سازوکارهای مختلفی از جمله آپتوتوز به واسطه‌ی گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی پلاسمای، واکنش گونه‌های فعال اکسیژنی با آمینواسیدها که می‌تواند باعث آسیب غشای سلولی شود، فعال‌سازی سیگنالینگ‌های داخل سلولی منجر به آپتوتوز به واسطه‌ی گونه‌های اکسیژنی، فعال‌سازی پروتئین P53، فعال‌سازی مهارکننده p21 CKS و توقف چرخه سلولی را برای توضیح اثر پلاسمای بر سلول‌های سرطانی پیشنهاد داده‌اند [۱۲-۱۵]. پلاسمای سرد اتمسفری درمان موثری بر روی رده‌های سلولی سرطانی ریه [۱۶، ۱۷]، معده [۱۸]، کبد [۱۹]، پانکراس [۲۰]، روده بزرگ [۲۱] و پوست [۲۲، ۲۳] است.

به طور کلی عوامل مؤثر در شکل‌گیری پلاسمای را می‌توان به صورت هندسه‌ی سیستم، نوع گاز، فشار، فلوی گاز، استفاده از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی و نوع منبع تغذیه خلاصه کرد. با توجه به نکات گفته شده، پلاسمای سرد اتمسفری می‌تواند در تحقیقات زیست‌پزشکی استفاده شود [۲۴]. گونه‌های فعال زیادی شامل رادیکال‌های اکسیژنی، رادیکال‌های نیتروژنی و اجزای دیگر در پلاسمای سرد تولید می‌شود [۲۵]. این شیمی پیچیده منجر به برهمکنش‌های بی‌شمار بین پلاسمای و سیستم‌های بیولوژیکی می‌گردد [۲۵-۲۷].

در این مطالعه تاثیر مدت زمان‌های مختلف تابش پلاسمای ترکیب گاز حامل و فاصله‌های زمانی متفاوت بین پردازش توسط پلاسمای و آنالیز روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم و سینه مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین به منظور بررسی اثرات انتخابی پردازش توسط پلاسمای، تابش پلاسمای روی زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیبروبلاست (normal human dermal fibroblast) مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

جت پلاسمای در این مطالعه از پلاسمای جت متشکل از لوله و حلقه‌ی مسی به عنوان الکترود استفاده شد که به منبع تغذیه ولتاژ بالا متصل شده بود. ولتاژ اعمالی به شکل متناوب و سینوسی

بر دقیقه استاندارد (۲۰ sccm) اکسیژن و در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری ثبت شد (شکل ۲، ب) و وجود گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی توسط طیف‌سنجی مورد تایید قرار گرفتند. افزایش ۵٪ گاز اکسیژن به گاز حامل نیز همان‌طور که در طیف‌های ثبت شده مشخص است موجب افزایش گونه‌های اکسیژنی می‌شود.

پارامترهای مختلفی می‌توانند بر روی مقدار گونه‌های فعال تولیدی اثر بگذارند. از جمله این‌که افزایش فاصله از راکتور باعث کاهش گونه‌های فعال می‌شود (شکل ۳، الف). ولتاژ نیز عامل موثر دیگر در تولید گونه‌های فعال است. افزایش ولتاژ متناظر با افزایش تولید گونه‌های فعال است (شکل ۳، ب).

بررسی دما. به دلیل اهمیت اثر حرارتی تابش مستقیم پلاسما بر روی سلول‌ها، دمای محیط کشت در چاهک پلیت ۹۶ خانه قبل و پس از ۵ دقیقه تابش پلاسما هلیوم و هلیوم + ۵٪ اکسیژن توسط دوربین فروسرخ اندازه‌گیری شد. دمای محیط کشت قبل از تابش پلاسما  $20/36 \pm 0/145$  درجه‌ی سانتی‌گراد بود (شکل ۴، الف) و پس از ۵ دقیقه تابش پلاسما هلیوم به  $21/0 \pm 1/115$  درجه‌ی سانتی‌گراد (شکل ۴، ب) و پس از ۵ دقیقه تابش پلاسما هلیوم + ۵٪ اکسیژن به  $21/63 \pm 0/088$  درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت (شکل ۴، ج).

نتایج روش تابش مستقیم بر روی سلول‌های **MDA-MB-231**. اعمال پلاسما سرد به صورت مستقیم روی سلول‌های **MDA-MB-231** در زیست‌پذیری سلول‌ها رفتاری وابسته به مدت زمان پردازش توسط پلاسما را نشان داد. به این معنی که با افزایش مدت زمان تابش پلاسما به سلول‌ها زیست‌پذیری سلول‌ها کاهش یافت. بیش‌ترین اثر بر روی سلول‌های سرطانی پس از ۵ دقیقه مشاهده گردید (شکل ۵). هم‌چنین مدت زمان در معرض قرار گرفتن سلول‌های سرطانی با مدیوم‌های حاوی گونه‌های فعال رابطه‌ی مستقیم با میزان مرگ سلولی داشت. بلافاصله پس از پردازش سلول‌ها توسط پلاسما فقط در زمان‌های ۴ و ۵ دقیقه و با ترکیب گازی هلیوم تغییرات معنادار زیست‌پذیری مشاهده شد (شکل ۵، الف). پس از گذشت ۲۴ ساعت از پردازش توسط پلاسما کاهش معنادار زیست‌پذیری سلول‌ها از زمان ۳ دقیقه به بعد ایجاد شد. که با افزایش زمان تابش پلاسما زیست‌پذیری نیز کاهش بیش‌تری داشت. هم‌چنین در زمان‌های ۴ و ۵ دقیقه ترکیب گازی هلیوم + ۵٪ اکسیژن نتایج بهتری نسبت به گاز هلیوم را نشان داد (شکل ۵، ب). با گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها را در زمان‌های ۵-۲ دقیقه مشاهده شد. همان‌طور که قبلاً ذکر شد این کاهش زیست‌پذیری وابسته به افزایش مدت زمان در معرض پلاسما قرار گرفتن است. در ۴۸ ساعت پس از درمان با

درجه سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵٪ انکوبه شدند و سپس تیمار سلول‌ها توسط پلاسما سرد به روش تابش مستقیم پلاسما انجام شد. به منظور پردازش سلول‌ها به روش تابش مستقیم فاصله‌ی نازل و سطح مورد پردازش روی ۱ سانتی‌متر تنظیم شد (شکل ۱).

تست **MTT**. سلول‌های چسبیده به کف پلیت در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه تحت تابش پلاسما قرار گرفتند و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پردازش با پلاسما سرد آنالیز **MTT** انجام شد. هم‌چنین در هر گروه آزمایشی یک گروه کنترل که هیچ تابش پلاسمایی دریافت نکرده بود هم قرار داده شد. هر گروه به منظور آنالیز آماری دقیق‌تر شامل ۳ تکرار بود. به منظور انجام آنالیز **MTT** به هر چاهک پلیت که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط **RPMI** برای سلول‌های سرطانی و **DMEM** برای سلول‌های فیروپلاست بود، مقدار ۱۵ میکرولیتر محلول **MTT** ۵ mg/ml اضافه گردید و پس از گذشت ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و به دور از روشنایی، به آرامی محلول رویی برداشته شد و به کریستال‌های حاصل ۲۰۰ میکرولیتر **DMSO** اضافه شد و در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر جذب نمونه خوانده شد [۳۱، ۳۲].

آنالیز آماری داده‌ها. نتایج این مطالعه به صورت  $Mean \pm SEM$  گزارش گردید. هر آزمون بر روی ۵ نمونه مستقل و هر بار ۳ مرتبه تکرار شد. آنالیز آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس (**ANOVA**) و پس آزمون **Tukey** توسط نرم‌افزار **Graph pad prism** انجام شد. سطح معناداری کوچک‌تر از ۰/۰۵ ( $P < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.



شکل ۱. تابش پلاسما سرد به سلول‌های سرطانی

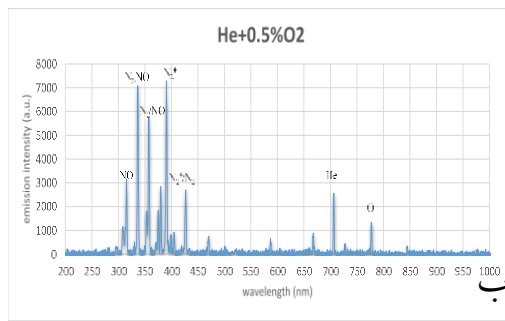
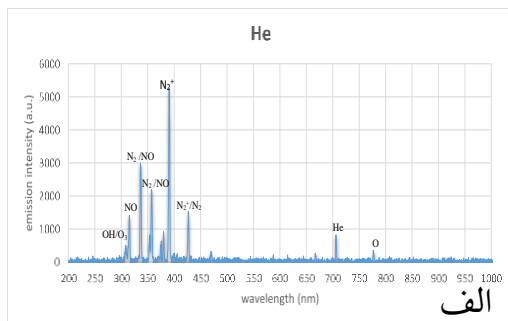
## نتایج

نتایج طیف‌سنجی. طیف جت پلاسما هلیوم در فرکانس بهینه‌ی ۲۵ کیلوهرتز، ولتاژ ۵ کیلوولت، فلوی ۴ لیتر بر دقیقه استاندارد و در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲، الف). هم‌چنین طیف پلاسما هلیوم و ۵٪ اکسیژن نیز در فرکانس بهینه‌ی ۲۵ کیلوهرتز، ولتاژ کاری ۶ کیلوولت، با فلوی ۴ لیتر بر دقیقه استاندارد (۴slm) هلیوم و ۲۰ سانتی‌متر مکعب

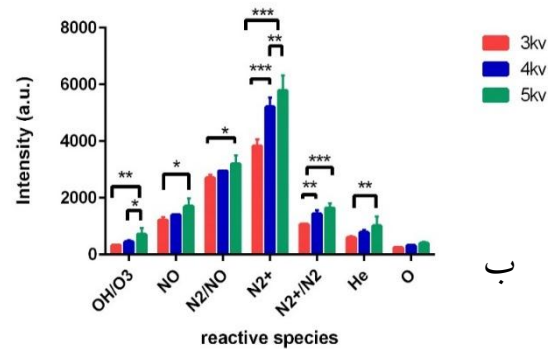
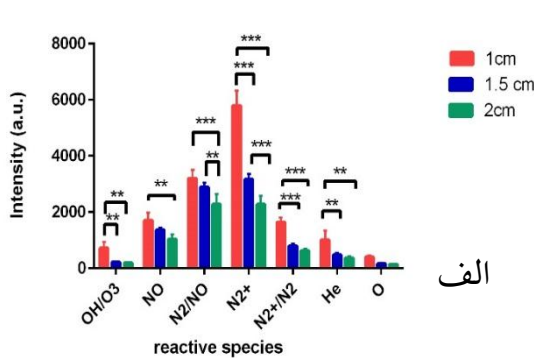
شد، همچنین در این زمان‌ها تفاوت معناداری در زیست‌پذیری سلول‌ها بین استفاده از ترکیب گازی هلیوم و ترکیب گازی هلیوم + ۰/۵٪ اکسیژن وجود داشت (شکل ۶، ب). با گذر ۴۸ ساعت از تابش پلاسمای کاهش معنادار زیست‌پذیری این بار در زمان‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه تابش پلاسمای مشاهده شد و در زمان‌های درمانی ۲ و ۳ دقیقه بین ترکیب گازی هلیوم و هلیوم + ۰/۵٪ اکسیژن تفاوت معناداری در کاهش زیست‌پذیری وجود داشت. همچنین با گذشت ۴۸ ساعت از ۵ تابش پلاسمای به سلول‌های سرطانی کاهش بیش از ۶۰٪ سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۶، ج).

پلاسمای تفاوت معناداری بین دو گروه ترکیب گازی مشاهده نشد، همچنین با گذشت ۴۸ ساعت از تابش پلاسمای به سلول‌های سرطانی کاهش بیش از ۷۰٪ در زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی مشاهده شد (شکل ۵، ج).

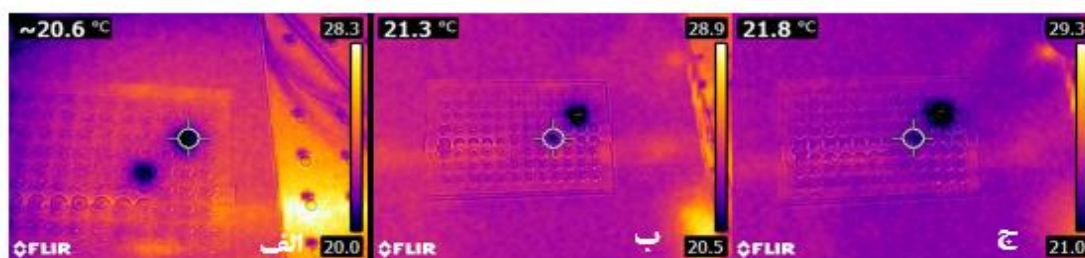
روش مستقیم روی سلول‌های **Hela** به کارگیری پلاسمای به صورت مستقیم بر روی سلول‌های **Hela** بلافاصله پس از پردازش توسط پلاسمای هلیوم و هلیوم + ۰/۵٪ اکسیژن هیچ‌گونه کاهش معناداری در زیست‌پذیری سلول‌ها را نشان نداد (شکل ۶، الف). ولی با گذشت ۲۴ ساعت از درمان توسط ترکیب‌های گازی مختلف پلاسمای در مدت زمان‌های ۴ و ۵ دقیقه تابش پلاسمای کاهش معناداری در زیست‌پذیری سلول‌ها مشاهده



شکل ۲. الف) طیف ثبت شده از جت پلاسمای هلیوم در ولتاژ ۵ کیلو ولت و گونه‌های فعال (ب) طیف ثبت شده از جت پلاسمای هلیوم و ۰/۵٪ اکسیژن در ولتاژ ۶ کیلو ولت و گونه‌های فعال

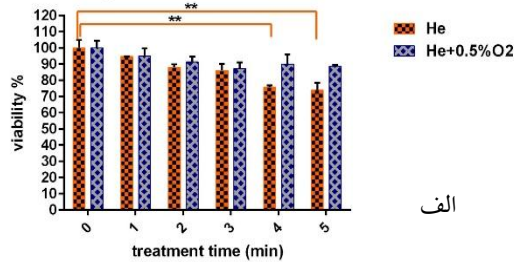


شکل ۳. الف) تاثیر فاصله از راکتور بر تولید گونه‌های فعال (ب) تاثیر ولتاژ بر تولید گونه‌های فعال. (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)



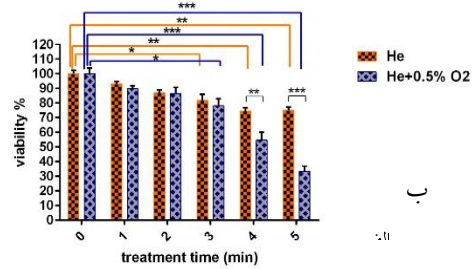
شکل ۴. اندازه‌گیری دمای محیط کشت توسط دوربین مادون قرمز (الف) قبل از تابش پلاسمای هلیوم (ب) پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم (ج) پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم + ۰/۵٪ اکسیژن

0 h after direct plasma treatment of MDA-MB-231 cells



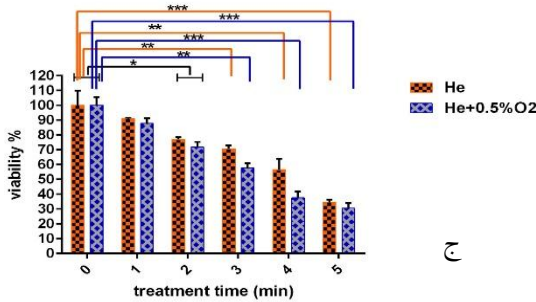
الف

24 h after direct plasma treatment of MDA-MB-231 cells



ب

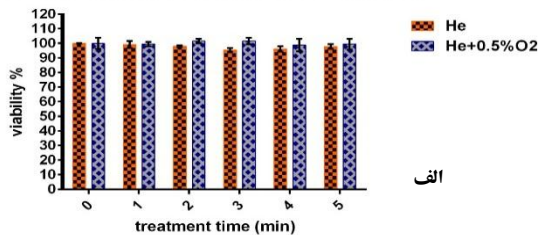
48 h after direct plasma treatment of MDA-MB-231 cells



ج

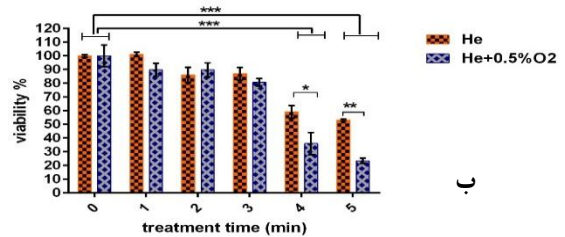
شکل ۵. الف) زیست پذیری سلول‌های MDA-MB-231 صفر ساعت پس از درمان با تابش مستقیم پلاسما (ب) زیست پذیری سلول‌های MDA-MB-231 ۲۴ ساعت پس از درمان با تابش مستقیم پلاسما (ج) زیست پذیری سلول‌های MDA-MB-231 ۴۸ ساعت پس از درمان با تابش مستقیم پلاسما (P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

0 h after direct plasma treatment of Hela cells



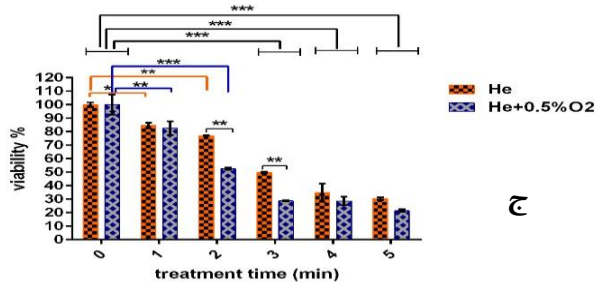
الف

24 h after direct plasma treatment of hela cells



ب

48 h after direct plasma treatment of hela cells



ج

شکل ۶. الف) زیست پذیری سلول‌های Hela صفر ساعت پس از درمان توسط پلاسما سرد مستقیم (ب) زیست پذیری سلول‌های Hela ۲۴ ساعت پس از درمان توسط پلاسما سرد مستقیم (ج) زیست پذیری سلول‌های Hela ۴۸ ساعت پس از درمان توسط پلاسما سرد مستقیم. (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*) P < 0.01, (\*) P < 0.05

کاهش ۲۵ درصدی در زیست‌پذیری سلول‌ها و گاز هلیوم +۵٪ اکسیژن موجب کاهش ۳۰ درصدی سلول‌ها شد (شکل ۷) و این میزان به مراتب کم‌تر از کاهش زیست‌پذیری در سلول‌های سرطانی است (شکل ۵ و ۶، ج).

روش تابش مستقیم پلاسما روی سلول‌های نرمال فیبروبلاست *normal human dermal fibroblast* از آنجا که بیش‌ترین اثر تابش مستقیم پلاسما پس از گذشت ۴۸ ساعت از پردازش نمایان شد به بررسی اثر پلاسما مستقیم روی زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیبروبلاست پس از گذشت ۴۸ ساعت پرداختیم. نتایج نشان داد که با تابش مستقیم پلاسما به مدت ۵ دقیقه پس از گذشت ۴۸ ساعت گاز هلیوم تنها موجب

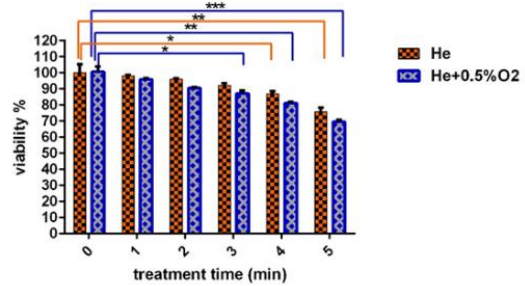
می‌تواند موجب کاهش بیش‌تر زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی در مدت زمان کم‌تر (۲۴ ساعت پس از تابش پلاسما) شود. پلاسمای هلیوم نتایج مشابه را با گذشت ۴۸ ساعت از تابش پلاسما نشان داد (شکل ۵ و ۶).

کاهش زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیبروبلاست در تابش مستقیم پلاسما به مراتب کم‌تر از کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی مذکور بوده است. این مساله خاصیت انتخابی پلاسما را نشان می‌دهد (شکل ۷). درک چنین اثر ضد سرطانی انتخابی یکی از نکات چالش برانگیز در این زمینه است. این اثر انتخابی ممکن است، عمدتاً به دلیل مشاهده‌ی گسترده‌ی افزایش قابل توجه ROS به طور انتخابی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم، در شرایط دریافت مشابه پلاسمای سرد، باشد [۳۷-۳۳].

برای توضیح این مساله می‌توان گفت، که افزایش متفاوت ROS در بافت سرطانی و سالم بسته به سطوح ROS داخل سلولی متفاوت بین سلول‌های سرطانی و نرمال است [۳۸، ۲۷]. به دلیل متابولیسم قوی سلول‌های سرطانی، سطح پایه‌ی ROS در سلول‌های سرطانی بالاتر از سلول‌های نرمال است [۴۰، ۳۹]. هنگامی که استرس ROS اضافی مانند گونه‌های فعال تولید شده توسط پلاسمای سرد روی سلول‌ها اعمال می‌شود ROS در سلول‌های سرطانی از مرز بسیار راحت‌تر از سلول‌های نرمال عبور می‌کنند [۳۸، ۲۷]. در نتیجه سلول‌های سرطانی آپوپتوز بیش‌تری نسبت به سلول‌های نرمال پس از درمان با پلاسما، تجربه می‌کنند [۴۱].

در مطالعاتی که در سال‌های قبل انجام شده نیز، فریدمن و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از درمان پلاسما روی سلول‌های سرطان ملانوم استفاده کردند. دوز پایین پلاسمای سرد اتمسفری باعث آپوپتوز بعد از چندین ساعت می‌شود در حالی که دوز بالای پلاسمای سرد اتمسفری باعث نکروز می‌شود [۱۲]. Thyagarajan و همکارانش اشاره کردند که پلاسمای سرد اتمسفری مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی خون leukemia به صورت وابسته به دوز القا می‌کند. [۴۲، ۱۲] Keidar و همکارانش در سال ۲۰۱۱ موش با سرطان مثانه زیر جلدی و سلول‌های ملانوم B16 را با پلاسما مورد درمان قرار دادند و به مدت پنج دقیقه پلاسمای سرد فشار اتمسفری را به موش‌های دارای سرطان مثانه اعمال کردند، تومورهای کوچک‌تر به طور کامل برداشته شدند، در حالی که تومورهای بزرگ‌تر سائزشان کاهش یافت. تومورهای برداشته شده دیگر باز نگشتند، در حالی که تومورهای بزرگ بعد از یک هفته دوباره شروع به رشد کردند، اما حتی بعد از سه هفته از درمان به سائز اصلی خود برنگشتند. موش‌های دارای ملانوم نیز با پلاسمای سرد اتمسفری برای پنج دقیقه درمان شدند که همراه با کاهش قابل توجه رشد تومور و

48 h after direct plasma treatment of normal fibroblast cells



شکل ۷. زیست‌پذیری سلول‌های normal human dermal fibroblast ۴۸ ساعت پس از پردازش با پلاسمای هلیوم و هلیوم+۰٫۵٪ اکسیژن (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*)  $P < 0.01$ , (\*)  $P < 0.05$

### بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پس از بررسی نتایج طیف سنجی نوری (OES) و تعیین ولتاژ مناسب و فاصله‌ی بهینه‌ی نازل پلاسما جت از نمونه، پتانسیل ضد سرطانی پلاسمای سرد اتمسفری مستقیم روی دو رده‌ی سلولی MDA-MB-231 و HeLa بررسی شد. نتایج طیف‌سنجی مشخص کرد که افزایش فاصله از راکتور به دلیل این‌که فرآیند باز ترکیب بر فرآیندهای یونش و برانگیختگی غلبه دارد، باعث کاهش گونه‌های فعال می‌شود (شکل ۳، الف) [۲۳] و افزایش ولتاژ نیز متناظر با افزایش تولید گونه‌های فعال است، زیرا هر چه ولتاژ بالاتر باشد، انرژی ذرات بیش‌تر شده، به طبع تعداد و انرژی برخورد‌ها افزایش می‌یابد، نرخ یونش بیش‌تر شده و در نتیجه گونه‌های فعال بیش‌تری تولید می‌شود (شکل ۳، ب) [۲۳]. از این رو فاصله‌ی نازل پلاسما جت از نمونه روی ۱ سانتی‌متر و ولتاژ اعمالی روی ۵ کیلوولت تنظیم شد (شکل ۱). از آن‌جا که افزودن ۰٫۵٪ اکسیژن موجب افزایش گونه‌های اکسیژنی شد (شکل ۲)، اثرات پلاسمای هلیوم و ۰٫۵٪ اکسیژن نیز علاوه بر پلاسمای هلیوم بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال بررسی شد. اندازه‌گیری دمای محیط کشت سلول‌ها پس از ۵ دقیقه تابش پلاسما هلیوم و پلاسمای هلیوم + ۰٫۵٪ اکسیژن نشان داد که دمای محیط کشت در هر دو حالت زیر ۳۷ درجه (دمای انکوباتور) بود. بنابراین پلاسمای مورد استفاده اثر حرارتی نامطلوب روی سلول‌ها نداشت (شکل ۴).

پلاسمای سرد اتمسفری مستقیم به واسطه گونه‌های فعال اکسیژنی و نیتروژنی موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شود که با افزایش زمان تابش پلاسمای سرد به سلول‌های مورد بررسی میزان مرگ سلولی نیز افزایش می‌یابد. هم‌چنین پلاسمای سرد اثر تاخیری در از بین بردن سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهد، به این معنا که با افزایش زمان در معرض قرار گرفتن سلول‌های سرطانی با مدیوم‌های حاوی گونه‌های فعال زیست‌پذیری سلول‌ها کاهش بیش‌تری می‌یابد. هم‌چنین اضافه کردن ۰٫۵٪ اکسیژن به واسطه‌ی افزایش گونه‌های اکسیژنی،

- [8] Fridman A. Plasma chemistry: Cambridge university press; 2008.
- [9] Cooper M, Fridman G, Staack D, Gutsol AF, Vasilets VN, Anandan S, et al. Decontamination of surfaces from extremophile organisms using nonthermal atmospheric-pressure plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci* 2009; 37: 866-871.
- [10] Sun P, Sun Y, Wu H, Zhu W, Lopez JL, Liu W, et al. Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy. *Applied Physics Letters*. 2011;98(2):021501.
- [11] Mitra A, Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Isbary G, Schmidt H-U, et al. Applications in plasma medicine: a SWOT approach. *Composite Interfaces*. 2012;19(3-4):231-8.
- [12] Babington P, Rajjoub K, Canady J, Siu A, Keidar M, Sherman JH. Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer. *Biointerphases*. 2015;10(2):029403.
- [13] Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G 1 arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;545:133-40.
- [14] Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Nakamura K, Utsumi F, et al. Plasma medical science for cancer therapy: Toward cancer therapy using nonthermal atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2014;42(12):3760-4.
- [15] 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. *Scientific reports*. 2015;5.
- [16] Huang J, Chen W, Li H, Wang X-Q, Lv G-H, Khohsa ML, et al. Deactivation of A549 cancer cells in vitro by a dielectric barrier discharge plasma needle. *Journal of Applied Physics*. 2011;109(5):053305.
- [17] Akhlaghi M, Rajaei H, Mashayekh AS, Shafiae M, Mahdikia H, Khani M, et al. Determination of the optimum conditions for lung cancer cells treatment using cold atmospheric plasma. *Physics of Plasmas*. 2016;23(10):103512.
- [18] Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, et al. Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric cancer*. 2015;18(3):635-43.
- [19] Yonson S, Coulombe S, Leveille V, Leask R. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2006;39(16):3508.
- [20] Brullé L, Vandamme M, Riès D, Martel E, Robert E, Lerondel S, et al. Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model. *PLoS one*. 2012;7(12):e52653.
- [21] Lupu A-R, Georgescu N, Călugăru A, Cremer L, Szegli G, Kerek F. The effects of cold atmospheric plasma jets on B16 and COLO320 tumoral cells. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2009;68(3):136-44.
- [22] Iida M, Yajima I, Ohgami N, Tamura H, Takeda K, Ichihara S, et al. The effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *European Journal of Dermatology*. 2014;24(3):392-4.
- [23] Mashayekh S, Rajaei H, Akhlaghi M, Shokri B, Hassan ZM. Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). *Physics of Plasmas*. 2015;22(9):093508.
- [24] Park G, Park S, Choi M, Koo I, Byun J, Hong J, et al. Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications. *Plasma Sources Science and Technology*. 2012;21(4):043001.
- [25] Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: an introductory review. *new Journal of Physics*. 2009;11(11):115012.
- [26] Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Transactions on plasma science*. 2009;37(6):714-25.
- [27] 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.
- [28] Simsek E, Imir N, Aydemir EA, Gokturk RS, Yesilada E, Fiskin K. Caspase-mediated apoptotic effects of Ebenus boissieri barbey extracts on human cervical cancer cell line hela. *Pharmacognosy magazine*. 2017;13(50):254.
- [29] Kong JN, He Q, Wang G, Dasgupta S, Dinkins MB, Zhu G, et al. Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin

افزایش متوسط بقا از ۲۴/۵ روز به ۳۳/۵ روز در مقایسه با گروه کنترل بود [۴۳]. Rafael و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۴ در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کردند که پلاسماهای سرد خطوط سلولی کارسینومای سلول سنگفرشی JHU-028 و SCC25 را به صورت انتخابی هدف قرار می‌دهند، در حالی که اثر متوسط روی سلول‌های JHU-022 و JHU-029 و یک اثر حداقل روی خطوط سلولی نرمال اپیتلیال دهان دارد [۴۴].

پلاسماهای سرد به صورت تابش مستقیم در زمینه‌ی پلاسما پزشکی پتانسیل ضد سرطانی خوبی را نشان داده است و توانایی از بین بردن بیش‌تر سلول‌های سرطانی در مقابل سلول‌های سالم را دارد، ولی به دلیل ترکیب پیچیده‌ی پلاسما و ماهیت پیچیده‌ی سیستم‌های بیولوژیکی هنوز سازوکار دقیق عملکرد ضد سرطانی آن شناخته نشده است. همچنین از جمله محدودیت‌های درمان توسط تابش مستقیم پلاسما می‌توان به نیاز آن به ادوات فیزیکی اشاره کرد. همچنین تابش مستقیم پلاسماهای سرد می‌تواند تنها موجب مرگ سلولی در ۳-۵ لایه‌ی بالایی بافت تحت تماس با پلاسماهای سرد شود [۴۵]. بنابراین به منظور به کارگیری پلاسما به عنوان درمانی برای بیماران سرطانی نیاز به شناخت بیش‌تر مکانیسم عملکرد پلاسما و نحوه‌ی تقابل آن با سیستم‌های بیولوژیکی حس می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه شهید بهشتی است. بدین وسیله از راهنمایی‌های خانم دکتر طاهره طیبی و خانم دکتر شراره شریفی و همکاری خانم آمنه آرمند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

## منابع

- [1] Abdollahzadeh R, Moodi M, Khanjani N. Investigating the mental experience of patients suffering from cancer. *Jundishapur J Chronic Dis Care* 2017; 6.
- [2] Shademani M, Nassiri Koopaei N, Shirzad Yazdi N, Azizian H, Mousavi Z, Salimi M, et al. Anti-proliferative effects of new synthesized hydrazone derivatives on breast, colon and hepatic cancer cells. *Koomesh* 2018; 20: 725-730. (Persian).
- [3] Sarizadeh MS, Mozaffari S, Rahimian boogar I. Effectiveness of acceptance and commitment therapy on the fear of cancer recurrence and post-traumatic growth among patients with breast cancer. *Koomesh* 2018; 20: 626-632. (Persian).
- [4] Hajiesmaeil M, Tafvizi F, Sarmadi S. The association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cervical cancer. *Koomesh* 2016; 17: 651-659. (Persian).
- [5] Ratovitski EA, Cheng X, Yan D, Sherman JH, Canady J, Trink B, et al. Anti-cancer therapies of 21st century: novel approach to treat human cancers using cold atmospheric plasma. *Plasma Process Polym* 2014; 11: 1128-1137.
- [6] Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. *Cell Tissue Res* 2016; 363: 599-608.
- [7] Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypotheses* 2014; 82: 488-489. (Persian).

- [37] Kim SJ, Chung T. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Scientific reports*. 2016;6:20332.
- [38] Keidar M. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Science and Technology*. 2015;24(3):033001.
- [39] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579-91.
- [40] Cairns R, Harris I, McCracken S, Mak T, editors. *Cancer cell metabolism. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 2011: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [41] Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins. *Biointerphases*. 2015;10(4):040801.
- [42] Thiyagarajan M, Alexeff I, Parameswaran S, Beebe S. Atmospheric pressure resistive barrier cold plasma for biological decontamination. *IEEE Transactions on plasma science*. 2005;33(2):322-3.
- [43] 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. *British journal of cancer*. 2011;105(9):1295-301.
- [44] Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(4):941-6.
- [45] Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC cancer*. 2012;12(1):1..
- resistance in MDA-MB-231 cells. *International journal of cancer*. 2015;137(7):1610-20.
- [30] Santhanam RK, Ahmad S, Abas F, Safinar Ismail I, Rukayadi Y, Tayyab Akhtar M, et al. Bioactive constituents of *Zanthoxylum rhetsa* bark and its cytotoxic potential against B16-F10 melanoma cancer and normal human dermal fibroblast (HDF) cell lines. *Molecules*. 2016;21(6):652.
- [31] Pérez ZEJ, Mathiyalagan R, Markus J, Kim Y-J, Kang HM, Abbai R, et al. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their in vitro antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:709.
- [32] Guerra FS, de Oliveira RG, Fraga CAM, dos Santos Mermelstein C, Fernandes PD. ROCK inhibition with Fasudil induces beta-catenin nuclear translocation and inhibits cell migration of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):13723.
- [33] Ja Kim S, Min Joh H, Chung T. 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.
- [34] Kaushik NK, Kaushik N, Park D, Choi EH. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. *PLoS one*. 2014;9(7):e103349.
- [35] Ishaq M, Evans MD, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 anti-oxidant system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014;1843(12):2827-37.
- [36] Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, et al. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(9):1523-31.



## Effects of cold atmospheric plasma on viability of breast (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cells

Mahya Aminraya Jezeh (M.Sc)<sup>1</sup>, Mohammad Reza Khani (Ph.D)<sup>1</sup>, Hassan Niknejad (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Babak Shokri (Ph.D)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> -Laser and Plasma Reserch Insititute, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran

<sup>2</sup> -Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21 22439969

niknejad@sbmu.ac.ir

Received: 7 May 2018; Accepted: 14 Apr 2019

**Introduction:** There are many reports published about the use of cold atmospheric plasma in cancer treatment recently. In this way, the selective effects of cold plasma on the breast (MDA-MB-231) and cervical (Hela) cancer cells were studied as a new cancer treatment method.

**Materials and Methods:** In this study, cold atmospheric pressure plasma was generated using a plasma jet reactor and also optical emission spectroscopy (OES) was used to investigate the free radicals produced by the plasma. Futhermore, the effects of helium and helium-oxygen gas mixtures and the time of plasma radiation on the viability of MDA-MB-231 and Hela cells immediately, 24 and 48 hours after radiation were determined by MTT assay. In this account, in order to investigate the selective effects of plasma, direct treatment method was used to evaluate the viability of normal fibroblast cell line.

**Results:** The results of optical emission spectroscopy showed that decreasing the sample distance from the plasma jet nozzle and increasing operating voltage increased the free radicals produced by plasma. Increasing the time of direct plasma radiation from one to five minutes reduced the vitality of the cancer cells. The most anti-cancer response was observed 48 hours after plasma irradiation and in the helium-oxygen gas mixture. Also, the results showed that cancer cells are more sensitive than normal fibroblast cells to plasma treatment.

**Conclusion:** According to the promising results of this study, reducing the viability of cancer cells and fewer toxic effect on normal cells, cold plasma therapy can be considered as a new method for cancer therapy.

**Keywords:** Cold Atmospheric Plasma (CAP), Free Radical, Breast Cancer Cells (MDA-MB-231), Cervical Cancer Cells (Hela), Viability.