

The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Apoptotic Genes in Breast Cancerous Cells

Hadis Ahmadi¹, Mahdi Shariat², Mahdi Mahmoodi³, Soudeh Falahatipour¹,
Mohammad Reza Hajizadeh¹, Mohammad Reza Mirzaei¹, Hassan Ahmadinia⁴

Received: 04.04.2021

Accepted: 10.05.2021

Published: 06.07.2021

Abstract

Background: Breast cancer is one of the most malignant cancers in the world. Cold micro plasma jet (CMPJ) Known as cold atmospheric jet microplasma, it has recently been introduced as an alternative way to overcome the challenges of finding an effective cancer treatment. Numerous studies have reported promising results, so our aim of this study was to investigate how this method affects cell death and its role on the expression of apoptotic genes in the MCF-7 cancer cell line.

Methods: In this study, helium gas was used to generate plasma at room temperature in the form of point radiation at different times of 30, 60, 90 and 120 seconds and at different distances of 1 cm. Flow cytometry will be used to examine the extent of apoptosis and necrosis. Genes involved in apoptosis P53, P21, Bax and Bcl-2 were measured by real-time PCR.

Results: Our Studie indicate that the mechanism of action of cold plasma on cancer cells is related to generation of reactive oxygen species with possible induction of the apoptosis pathway. The percentages of necrotic and late apoptotic cells following treatment with different times plasma (0, 30, 60, 90 and 120 s) were about 0.55 ± 0.06 , 20.13 ± 0.01 , 20.12 ± 0.03 , 26.81 ± 0.04 and 17.51 ± 0.05 . The mRNA expression of bcl-2 showed a decrease of 90s of plasma while the mRNA expression of p53, bax and caspase-8 genes increased compared to untreated cells.

Conclusion: In general, research in the last decade has confirmed the ability of CMPJ as an effective anti-cancer tool. Therefore, it may be used to help treat cancer. However, its clinical application requires much further studies to determine the severity and duration of exposure to CMPJ for effective treatment based on the type of cancer.

Keywords: Apoptosis, Cold plasma, Breast cancer, MCF-7 cells

Citation: Ahmadi H, Shariat M, Mahmoodi M, Falahatipour S, Hajizadeh MR, Mirzaei MR, et al. **The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Apoptotic Genes in Breast Cancerous Cells.** J Zabol Med Sch 2021; 4(2): 44-51.

1- Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Department of Physics, School of Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3- Department of Clinical Biochemistry, Afzalipoor School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- PhD Student of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, Medical School, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Corresponding Author: Mehdi Mahmoodi, **Email:** mahmoodies@yahoo.com



تأثیر پلاسما سرد اتمسفری بر بیان ژن‌های آپوپتوتیک در

سلول‌های سرطانی پستان

حدیث احمدی‌راد^۱، مهدی شریعت^۲، مهدی محمودی^۳، محمدرضا میرزایی^۱،
سوده فلاحتی^۱، محمدرضا حاجی‌زاده^۱، حسن احمدیان^۴

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۴/۱۵

مقدمه: سرطان پستان، یکی از بدخیم‌ترین سرطان‌ها در جهان است. CMPJ (Cold micro plasma jet) به عنوان میکروپلاسما جت اتمسفری سرد شناخته می‌شود، به تازگی یک روش جایگزین برای غلبه بر چالش‌های موجود در یافتن یک درمان مؤثر سرطان معرفی شده است. تحقیقات متعددی نتایج امیدوارکننده از آن را گزارش نموده‌اند، به همین جهت هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر این روش بر مرگ سلولی و نقش آن بر بیان ژن‌های آپوپتوزی در رده‌ی سلولی سرطانی MCF-7 بود.

شیوه‌ی مطالعه: در این مطالعه، از گاز هلیوم برای ایجاد پلاسما در دمای اتاق به صورت تابش نقطه‌ای در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه و در فاصله‌ی متفاوت ۱ سانتی‌متر استفاده شد و از روش فلوسیتومتری میزان آپوپتوز و نکروز، مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های مؤثر در آپوپتوز P53، P21، Bax و Bcl-2 به روش real-time PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که مکانیسم عملکرد پلاسما سرد بر روی سلول‌های سرطانی، مربوط به تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر با القای احتمالی مسیر آپوپتوز است. درصد سلول‌های نکروتیک و آپوپتوز دیررس پس از درمان با زمان‌های مختلف پلاسما (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه) در حدود ۰/۵۵ ± ۰/۶، ۰/۱۳ ± ۰/۱، ۰/۱۲ ± ۰/۰۳، ۰/۸۱ ± ۰/۰۴ و ۰/۵۱ ± ۰/۰۵ بود. بیان Bcl-2 mRNA کاهش ۹۰٪ پلاسما را نشان داد در حالی که بیان mRNA ژن‌های p53، Bax و caspase-8 در مقایسه با سلول‌های درمان نشده افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: به طور کلی تحقیقات انجام شده در دهه‌ی اخیر، قابلیت CMPJ را به عنوان یک ابزار ضد سرطان مؤثر تأیید نموده‌اند. بنابراین، شاید بتوان از آن در درمان سرطان کمک گرفت. با این حال، کاربرد بالینی آن مستلزم انجام مطالعات بیشتر در جهت تعیین شدت و مدت زمان مواجهه با CMPJ برای درمان مؤثر بر اساس نوع سرطان می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرطان، آپوپتوز، رده‌ی سلولی MCF-7

ارجاع: احمدی‌راد حدیث، شریعت مهدی، محمودی مهدی، میرزایی محمدرضا، فلاحتی سوده، حاجی‌زاده محمدرضا، احمدیان حسن. **تأثیر پلاسما سرد اتمسفری بر بیان ژن‌های آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی پستان.** مجله دانشکده پزشکی زابل ۱۴۰۰؛ ۴(۲): ۵۱-۴۴.

مقدمه

شیمی‌درمانی از روش‌های معمول درمان سرطان پستان است که برای مقابله با بیماری استفاده می‌شود. با این حال، تمام این تکنیک‌ها محدودیت‌هایی دارند. برداشتن جراحی که معمولاً برای کالبد شکافی تومور استفاده می‌شود، ممکن است سلول‌های سرطانی باقی‌مانده را برجای بگذارد. پرتودرمانی، برای بافت طبیعی، خطر اشعه دارد، در حالی که شیمی‌درمانی هم باعث نورروپاتی می‌شود، هم سلول‌های «سالم» را در مجاورت

سرطان پستان، یکی از بدخیم‌ترین تومورها در جهان است و دومین علت اصلی مرگ سرطان در زنان می‌باشد (۱). در سال‌های اخیر، میزان بروز سرطان پستان در آسیا افزایش یافته است (۲). سرطان پستان، اثرات روحی و روانی شدیدتری نسبت به سایر انواع سرطان‌ها در زنان دارد. پیشرفت‌های گسترده‌ای در زمینه‌ی درمان این نوع سرطان صورت گرفته است. جراحی، پرتودرمانی و

۱- مرکز تحقیقاتی پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- دانشکده‌ی فیزیک، دانشگاه ولیعصر رفسنجان، رفسنجان، ایران

۳- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۴- دانشجوی دکتری آمار زیستی، دانشکده‌ی اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

بیوفیلیم (۱۶-۱۸)، درمان دندان‌پزشکی (۱۹-۲۱) و سرطان‌درمانی (۲۲-۲۵).

تحقیقات قبلی در مورد استفاده از داروهای پلازما در درمان سرطان در زیرمجموعه‌ای از سرطان‌ها نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده است. Kim و همکاران (۲۶) از پلاسمای سرد مبتنی بر فیبر برای ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه استفاده کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که به دلیل قطر کم و سرعت جریان گاز پایین، دستگاه‌های جت میکروپلازما باعث آپوپتوز می‌شوند اما نکروز نیستند.

Weiss و همکاران (۲۷) از پلاسمای سرد بر روی سرطان پروستات برای بررسی اثر ضد تکثیر پلازما توسط مسیرهای سیگنالینگ اکسیداسیون و کاهش استفاده کردند.

در مطالعه‌ی حاضر، روش جدیدی برای درمان سرطان به نام CMPJ (Cold micro plasma jet) معرفی شده است. می‌توان از میکرو پلازماجت سرد برای انجام درمان پلازما در داخل بدن انسان استفاده کرد. برنامه‌های کاربردی به عنوان پلاسمای سرد برای درمان سرطان در داخل بدن نیز به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۲۸، ۲۹).

استفاده از اثرات جت پلاسمای سرد بر سلول‌های سرطانی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نتایج حاصل از چندین مطالعه بر روی گروه‌ها نشان می‌دهد که جت پلاسمای سرد، می‌تواند درمانی مناسب برای سرطان‌درمانی باشد. پلازما، در غلظت‌های پایین، رشد سلول‌ها را متوقف می‌کند و باعث مرگ سلول در غلظت‌های زیاد می‌شود (۱۹). از جت پلاسمای سرد در شرایط *in vivo* و *in vitro* استفاده شده است. برای از بین بردن سلول‌های سرطانی بدون آسیب رساندن به سلول‌های سالم، می‌توان از جت پلازما استفاده کرد (۲۰). با توجه به اینکه کارهای قبلی که بیشتر جنبه‌های فیزیکی داشته و تاکنون کمتر روی پزشکی متمرکز بوده، سعی شده است، تأثیر CMPJ بر بیان و ژن‌های درگیر در آپوپتوز مانند P53، P21، Bax و Bcl-2 بررسی شود. در رده‌ی سلولی سرطان پستان، مکانیسم عملکرد این گاز برای حذف سلول‌های تومور تعیین می‌شود.

مواد و روش‌ها

پیکربندی جت پلازما: در جت پلاسمای میکرو (MPJ)، از یک لوله کوارتز به عنوان سد دی الکتریک با قطر داخلی

تومورها از بین می‌برد و هم عوارض جانبی را ایجاد می‌کند. علاوه بر این، همه‌ی این تکنیک‌ها دارای بازده درمانی پایین هستند. محققان و پزشکان به دنبال یک درمان «Magic-bullet» هستند که در عین حفظ سلول‌های سالم اطراف، باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود.

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به عنوان یک روش محافظت شده تحت کنترل ژن‌هایی است که برای از بین بردن سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری موجودات زنده استفاده می‌شود و در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی یا بیماری‌ها دخالت می‌کند (۳). از ویژگی‌های اصلی آپوپتوز می‌توان به چین و چروک سلولی، آسیب به غشاء چگالش کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA اشاره کرد (۴). چندین مولکول در روند آپوپتوز نقش دارند. تحریک مولکول‌های مؤثر در آپوپتوز یا مهار عوامل ضد آپوپتوز به نوع سلول و محرک بستگی دارد. دو مسیر اصلی آپوپتوز، مسیر خارجی یا مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندری است (۵).

پزشکی پلازما، یک زمینه‌ی نوظهور است که کاربرد پلاسمای فیزیکی در سرطان‌درمانی را بررسی می‌کند و از پلاسمای فشار اتمسفر غیر حرارتی استفاده شده است. پلازما مخلوطی از مولکول‌های یونیزه شده، گونه‌های واکنش نیتروژن، گونه‌های واکنش اکسیژن مانند OH، $2O_2H$ ، $2N$ ، NO و $2O$ و فوتون‌ها است. پلاسمای سرد یا غیر گرمایی، نوعی پلازما است که توسط منبع برق تولید می‌شود. این نوع پلازما غیر تعادلی است، یعنی تعادل ترمودینامیکی موضعی، با الکترون‌های حداکثر 1 eV یون‌های سرد و گونه‌های خنثی، که درجه‌ی حرارت آن‌ها در محدوده‌ی دمای اتاق است، از نظر ماکروسکوپی، این یک پلاسمای دمای پایین است. این ویژگی حیاتی پلاسمای فشار جو باعث می‌شود که بتوان از آن در فرآوری مواد حساس به حرارت و بافت‌های زنده در صنعت و دارو استفاده کرد (۱۳-۱۵).

یکی از جدیدترین و مهم‌ترین روش‌های تخلیه‌ی پلازما، استفاده از پلاسمای غیر گرمایی است. اخیراً پلازما پتانسیل زیادی را برای استفاده در زیست‌شناسی و پزشکی نشان داده است. کاربردهای پزشکی متعددی جمله عقیم‌سازی سطحی (۱۰-۱۲)، اصلاح سطح (۱۳)، انعقاد خون (۱۴)، ترمیم زخم (۱۵)، غیرفعال‌سازی

کشت را در فلاسک قرار داده شد و فلاسک کشت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید، رطوبت نسبی ۹۵ درصد بود و هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ پس از رسیدن سلول به بیش از ۷۰ درصد از عبور سلول به شرح زیر قرار می‌گیرد. محیط، تخلیه و سپس دوبار با PBS شسته شد و ۱ تا ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین به آن افزوده و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ، تریپسین دور می‌ریزیم و محیط کشت کامل به سلول‌ها اضافه می‌کنیم. سوسپانسیون حاصل بین ۲ تا ۴ فلاسک جدید تقسیم شد و سپس فلاسک‌ها را به دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد) منتقل نمودیم.

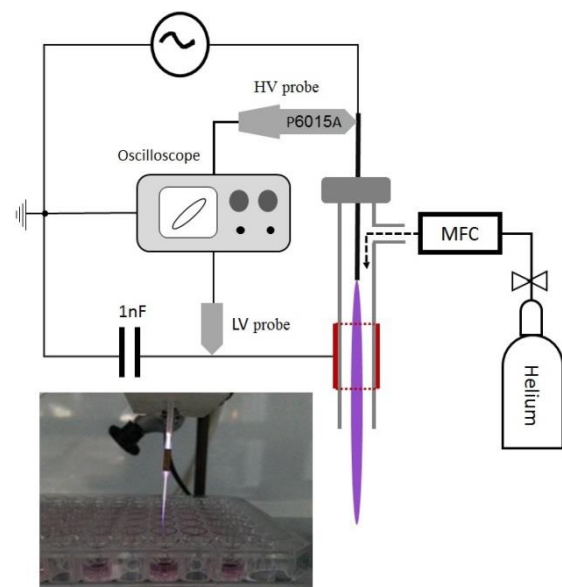
ارزیابی آپوپتوز

Annexin-V-FITC و یدید پروپیدوم برای تجزیه و تحلیل آپوپتوز: یکی از خصوصیات اولیه‌ی سلول‌های آپوپتوز، از بین رفتن غشای پلاسما است. Annexin V / PI می‌تواند آپوپتوز را در مراحل قبل از آزمایش‌های وابسته به تغییر هسته شناسایی کند. سلول‌های YMCF- توسط پلاسما (s۳۰، s۶۰، s۹۰، s۱۲۰ و s۱۵۰) ۲۴ ساعت پس از درمان، تحت درمان قرار گرفتند و سپس سلول‌های تحت درمان با Annexin V / PI رنگ‌آمیزی شدند، برای تجزیه و تحلیل آپوپتوز سلول‌های سرطانی پستان، از فلوسیتومتری استفاده شده است (۳۰).

بیان ژن‌ها

Real-Time PCR: به منظور ارزیابی بیان ژن P21، Bax، P53 و Bcl-۲ در نمونه‌ها، RNA کل سلول با استفاده از یک کیت تصفیه RNA (کیت بایونیر) جدا شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز در آگارز و یک درصد رنگ‌آمیزی با رنگ سبز مشاهده شد و جذب نور در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید. DNase برای از بین بردن احتمالی مورد استفاده قرار گرفت، رشته‌های cDNA توسط آنزیم معکوس ترانس کریپتاز سنتز شده از تمام مولکول‌های mRNA در نمونه ساخته شد. از آغازگر OligoT و (کیت سنتز cDNA بایونیر) برای ساخت cDNA استفاده شد. با کمک آغازگرهای اختصاصی و RT-PCR، بیان ژن‌ها تعیین گردید. شرایط

و خارجی ۰/۸ میلی‌متر و ۱/۷ میلی‌متر استفاده شد. MPJ توسط منبع تغذیه‌ی AC با فرکانس ۱۸ کیلوهرتز و ولتاژ ثابت ۵ کیلو ولت ایجاد شده است. شکل ۱ نشان دهنده‌ی یک نمودار از تنظیمات آزمایشی و عکس مربوطه است. گاز هلیوم (۹۹/۹۹۹ درصد) از طریق لوله‌ی کوارتز تزریق شد. میزان جریان گاز با استفاده از یک کنترل‌کننده جریان جرم (slpm۵، Alicat) در ۱ لیتر استاندارد در دقیقه (SLPM) ثابت شد. هلیوم، برای تولید پلاسما یکنواخت و همگن در ولتاژهای پایین انتخاب شده است. یک لوله از فولاد ضد زنگ (با قطر خارجی ۰/۳ میلی‌متر) به عنوان الکتروود قدرت در مرکز لوله‌ی کوارتز و یک نوار تسمه مس با عرض ۱ سانتی‌متر نزدیک به انتها به عنوان الکتروود زمین استفاده شد. محلول آبی حاوی سلول سرطانی همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده، با ستون پلاسما تیمار شده است. فاصله‌ی بین نازل جت پلاسما و سطح محلول حدود ۱۰ میلی‌متر ثابت شده است. علاوه بر این، ولتاژ راکتور پلاسما با استفاده از یک پروب ولتاژ بالا (A۴۱۱۵P، Tektronix) و یک اسیلوسکوپ اندازه‌گیری شد (GWINSTEK، ۳۵۱۲GDS).



شکل ۱: طرح و عکس از تنظیمات آزمایشگاهی برای پردازش مایعات پلاسما

رده‌ی سلولی و شرایط کشت سلولی: MCF-۷
 رده‌ی سلولی سرطانی پستان انسان، از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. در ابتدا، کل محیط کشت از یک محیط RPMI- حاوی ۱۰ درصد FBS، پنی‌سیلین- استریپتومایسین ۱۰۰ U / ml تهیه شد و سپس کل محیط

(۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰s) تحت درمان قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد سلول‌های تیمار شده با آنکسین V و دید پروپیدیوم رنگ‌آمیزی شدند و اثر آپوپتوتیک عصاره‌ی پلاسما بر سلول‌های Mcf-7 توسط فلوسیتومتری تشخیص داده شد. نتایج تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری نشان داد که آپوپتوز ناشی از پلاسما در سلول‌های Mcf-7 تیمار شده در مقایسه با شاهد نشان دهنده‌ی مرگ سلول آپوپتوتیک در سمیت ناشی از پلاسما نقش دارد (شکل a-d۲).

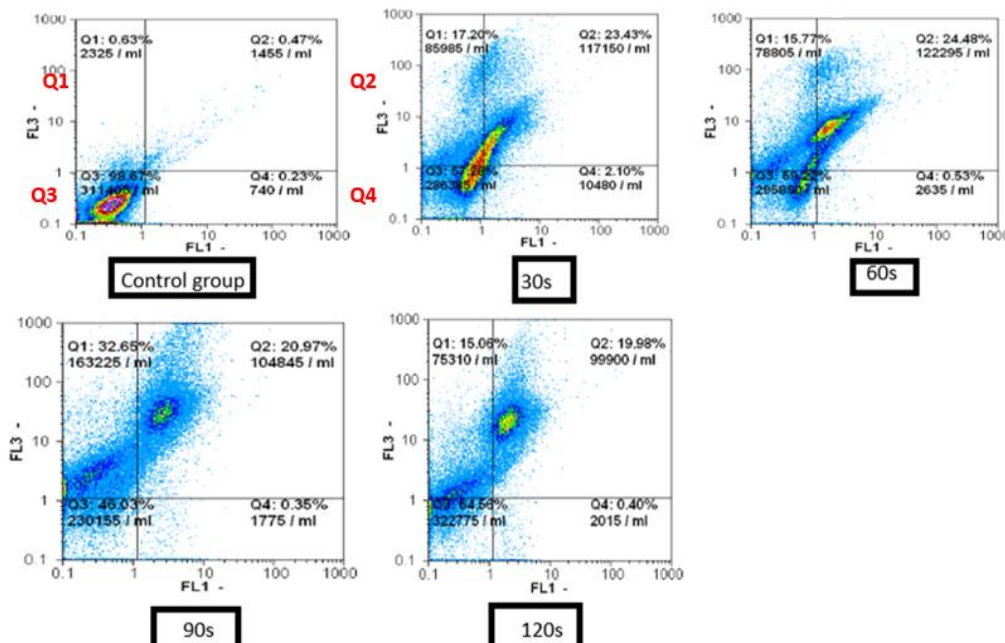
سلول‌های زنده‌ی طبیعی در منطقه‌ی Q3 مشاهده شدند (شکل ۲ الف-د). سلول‌های آپوپتوز اولیه با مجموع سلول‌های Q4 مشخص شد و سلول‌های آپوپتوز دیررس و نکروز به ترتیب بیشتر در مناطق Q2 و Q1 ظاهر شدند (شکل a-d۲). میانگین و واریانس سلول‌های آپوپتوتیک اولیه پس از درمان با زمان‌های مختلف پلاسما (۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه) 0.47 ± 0.02 ، 0.53 ± 0.02 ، 0.47 ± 0.02 ، 0.4 ± 0.01 و 0.35 ± 0.01 بود. میانگین و واریانس سلول‌های نکروزه و آپوپتوز دیرنگام به ترتیب 0.06 ± 0.01 ، 0.55 ± 0.01 ، 0.13 ± 0.01 ، 0.13 ± 0.03 و 0.12 ± 0.04 بود.

دمای (RT-PCR) ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه جهت دناتوراسیون اولیه بود، ۴۰ چرخه انجام شد، هر یک حاوی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه برای دناتوراسیون، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای بازپخت و گسترش. در این مطالعه از ژن (β اکتین) به عنوان کنترل خانه‌داری استفاده شد. بیان هر ژن با توجه به ژن‌های کنترل کننده‌ی ct و ct آن در فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ رسم شده است، و تفاوت در تعداد نسخه‌های ژن هدف ژن کنترل، که β اکتین است، محاسبه می‌شود.

بیان این ژن‌ها پس از سه تکرار در سه صفحه‌ی جداگانه و میانگین مقدار با استفاده از Fold Formula ct محاسبه شد. داده‌ها به نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ محاسبه شدند. داده‌ها به نرم‌افزار SPSS (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) وارد شدند. برای مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌های مختلف در گروه‌های مختلف و در غلظت‌های مختلف، از آزمون t دو نمونه و آنالیز واریانس مکرر استفاده شد. در تمام آزمون‌ها، سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سلول‌های Mcf-7 توسط زمان‌های مختلف پلاسما



شکل ۲: القای آپوپتوز در سلول‌های Mcf-7 توسط پلاسما. سلول‌ها با زمان‌های مختلف تحت درمان قرار گرفتند.

یک گروه کنترل، ۳۰s، ۶۰s، ۹۰s، پلاسما ۱۲۰s، با Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) و دید پروپیدیوم (PI) آغشته شده است. پس از آن، سلول‌های آپوپتوتیک و نکروزه توسط فلوسیتومتری کمی شدند. زیرمجموعه‌های مختلف به عنوان Annexin V Q1 منفی اما PI مثبت، یعنی سلول‌های نکروتیک، Q2 Annexin V / PI دو برابر مثبت، یعنی سلول‌های آپوپتوتیک اواخر Annexin V / PI Q3 دو برابر منفی، یعنی سلول‌های زنده‌ی طبیعی تعریف شدند. Annexin V مثبت اما PI منفی، یعنی سلول‌های آپوپتوز اولیه. $0.05 \leq p \leq 0.002$ تفاوت معنی‌داری با سلول‌های کنترل نشان می‌دهد. مقایسه‌ی آپوپتوز واضح و دیررس و همچنین نکروز در سلول‌های Mcf-7 تحت درمان با پلاسما در زمان‌های مختلف.

جدول ۱: میزان آپوپتوز سلول‌های MCF-7 با زمان‌های مختلف پلاسما (درصد، $X \pm S$)

میزان آپوپتوز	زمان‌های مختلف پلاسما			
	۰	۳۰	۶۰	۹۰
میزان آپوپتوز اولیه	$0/47 \pm 0/02$	$2/10 \pm 0/05$	$0/53 \pm 0/02$	$0/35 \pm 0/06$
نکروز/ میزان آپوپتوز دیررس	$0/55 \pm 0/06$	$20/13 \pm 0/01$	$20/12 \pm 0/03$	$26/81 \pm 0/04$

مطالعه‌ی حاضر، اثرات آپوپتوز و نکروز پلاسما در رده‌های سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان مثال، پلاسما شامل گونه‌های واکنشی است که برای استفاده در پزشکی مناسب است. اخیراً، چند آزمایش بالینی موفق در مورد سرطان‌درمانی انجام شده است که بر سلول‌های طبیعی تأثیر نمی‌گذارد.

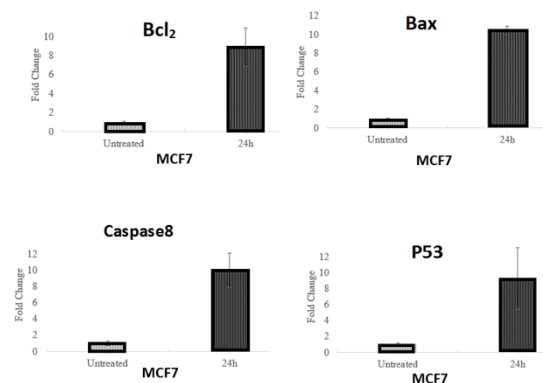
توسط بسیاری از دانشمندان کشف شده است که جت پلاسما، با فشار اتمسفر می‌تواند امید به یک درمان ضد سرطان جدید مؤثر را افزایش دهد (۲۲). در مطالعات *in vitro* نشان داده شده است که دوز کم APPJ قادر به کاهش و حتی توقف رشد سلول‌های سرطانی و القاء مرگ‌های آپوپتوز و نکروز بود. CMPJ به دلیل تولید گونه‌های نیتروژن واکنش‌پذیر (Reactive nitrogen species) RNS مانند اکسید نیتریک که مسئول سیگنالینگ سلولی است و اکسیژن واکنش‌پذیر (Reactive oxygen species) ROS مانند هیدروکسیل (OH) که مسؤول القای مرگ سلولی هستند، به طور گسترده‌ای در زیست‌شناسی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳).

حرکت سلول‌ها در این سه مرحله، آپوپتوز را تأیید می‌کند. افزایش آپوپتوز و نکروز سلول‌ها پس از قرار گرفتن در معرض پلاسما در (شکل ۳) نشان داده شده است. درصد تعداد سلول توسط فلوسیتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با گذشت زمان، میزان نکروز و آپوپتوز افزایش می‌یابد و پس از مدتی میزان آپوپتوز کاهش یافته و نکروز افزایش می‌یابد. یکی از مکانیسم‌های القای آپوپتوز، آسیب DNA است. آسیب می‌تواند با اتصال الکترون یا اکسیداسیون توسط ROS ایجاد شود. از آنجا که ROS به طور کلی با القای مرگ سلولی در ارتباط است، غنای این گونه‌ها ممکن است باعث شود پلاسما با He استفاده از نسبت مناسب افزودنی ۲۰ در درمان سرطان مناسب‌تر باشد. نتایج نشان داد که با افزایش ولتاژ منبع تغذیه، ماندگاری سلول به شدت کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است که با افزایش ولتاژ منبع تغذیه، منطقه خالی گسترده‌تر می‌شود. همچنین نشان داد که با افزایش زمان درمان، پلاسما باعث کاهش دوام سلول‌های سرطانی

ارزیابی برخی از بیان ژن‌های آپوپتوز در MCF-7

در مطالعه‌ی حاضر در مسیر آپوپتوز، تجزیه و تحلیل RT-PCR با SYBR Green را انجام دادیم. بیان mRNA برخی از ژن‌های *pro/anti-apoptotic* مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات در میزان بیان mRNA با بیان *act* اکتین استاندارد شد. سطح بیان *act* اکتین تحت درمان با CMPJ در مقایسه با سایر ژن‌ها مورد بررسی قرار نگرفت. بنابراین از آن به عنوان یک ژن مناسب خانه‌داری برای تجزیه و تحلیل رونویسی استفاده شد.

بیان *bcl-2* mRNA ۲ افزایش ۹۰٪ پلاسما را نشان داد (شکل ۳)، در حالی که بیان mRNA *P53*، *Bax* و *caspase-8* در مقایسه با سلول‌های درمان نشده افزایش یافت.



شکل ۳: سطح بیان mRNA برخی از ژن‌های *pro/antiapoptotic* در سلول‌های MCF-7 تحت درمان با پلاسما. بیان mRNA ژن‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز، *Bax*، *Bcl-2*، *P53*، *Caspase-8* با استفاده از RT-PCR شناسایی و به کنترل داخلی، *b-actin* نرمال شد. $0/05 \pm 0/03 p < 0/001$ در سلول‌های MCF-7 پس از درمان با پلاسما در ۹۰ ساعت به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با سلول گروه شاهد (MCF-7 درمان نشده)

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان، یکی از بیماری‌های در حال رشد است که سلامت جهانی را تهدید می‌کند. مدت‌هاست که از محصولات طبیعی برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود. بنابراین آن‌ها کاندیداهای مناسبی برای تولید داروهای ضد سرطان هستند (۲۱). در

ذکر است که اختلاف بین میزان آپوپتوز با زمان درمان ممکن است از شرایط مختلف آزمایش اولیه مانند پروب جت پلاسمای، منبع تغذیه و غیره افزایش یابد. اکسیژن اتمی را به عنوان عامل مسؤوول جدا شدن سلول‌های سرطانی از بستر برای سرطان کبد انسان معرفی کرده‌اند (۲۶). جداسازی به وضوح می‌تواند در منطقه خالی تشکیل شده در سلول‌های سرطانی مشاهده شود. علاوه بر این، نتایج آپوپتوز نشان داد که با افزودن اکسیژن به پلاسمای هلیوم، مرگ آپوپتوز در زمان کم‌تری نسبت به پلاسمای هلیوم اتفاق می‌افتد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح پژوهشی از مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان اجرا گردیده است. در این راستا از زحمات کلیه اعضای هیأت علمی مرکز که به منظور انجام این مطالعه و ارائه گزارش نهایی آن تلاش بسیار کردند و دانشجویان عزیز که جهت شرکت در این مطالعه کمال همکاری را ابراز نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌شود. نتایج نشان داد که حداکثر آپوپتوز در تیمار با پلاسمای ۳۰ ثانیه (با عامل سه) مشاهده شد در حالی که با افزایش زمان درمان، فعالیت آپوپتوز کاهش یافته و به کمتر از درمان دارویی می‌رسد. می‌توان از روش MTT و Caspase-Glo در زمان‌های درمان اولیه (۳۰ و ۶۰ ثانیه) مرگ سلول‌ها ناشی از آپوپتوز نتیجه گرفت در حالی که با افزایش زمان درمان، روند مرگ سلول ناشی از روش‌های دیگر آپوپتوز مانند نکروز نشان می‌دهد که پلاسمای اکسیژن اثر آپوپتوز بیشتری نسبت به پلاسمای هلیوم و آرگون به سلول‌های سرطانی پستان القاء می‌کند. آن‌ها دریافتند که بیشترین تأثیر آپوپتوز در مرحله کم زمان ایجاد می‌شود. نتایج ما نیز پدیده مشابهی را نشان می‌دهد. با این حال، ما دریافتیم که با افزایش زمان درمان پس از حداکثر آپوپتوز، مرگ سلول توسط نکروز اتفاق می‌افتد (۲۴). همچنین، این درمان‌ها هیچ تأثیری بر سلول‌های طبیعی ندارند (۲۰). تأثیر میکروپلاسمای سرد را بر اثر آپوپتوز سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد. آن‌ها دریافتند که با افزایش زمان درمان، اثر آپوپتوتیک سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد که با نتایج ما سازگار بود (۲۵). لازم به

References

1. Abdulrahman GO, Rahman GA. Epidemiology of breast cancer in Europe and Africa. *J Cancer Epidemiol* 2012; 2012: 915610.
2. Lam WW, Fielding R, Ho EYY. Predicting psychological morbidity in Chinese women after surgery for breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103(3): 637-46.
3. Lavrik IN. Systems biology of apoptosis. Berlin, Germany: Springer Science & Business Media; 2012.
4. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
5. Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 2009; 48(6): 811-21.
6. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013; 15(1): 2-8.
7. Bradner JE. Cancer: An essential passenger with p53. *Nature* 2015; 520(7549): 626-7.
8. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(9): a004887.
9. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Essential cell biology. New York, NY: Garland Science; 2013.
10. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* 2015; 89(3): 289-317.
11. Cavalli F, Kaye SB, Hansen HH, Armitage JO, Piccart-Gebhart M. Textbook of medical oncology. London: CRC Press; 2009.
12. Fitzpatrick R. Introduction to plasma physics. The University of Texas at Austin; 2008. p. 242.
13. Radetić M, Jocić D, Jovančić P, Trajković R, Petrović ZL. The Effect of Low-Temperature Plasma Pretreatment on Wool Printing. *Textile Chemist & Colorist & American Dyestuff Reporter* 2000; 32(4): 55-60.
14. Georgescu N. High voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets: electrical characterization. *Romanian Reports in Physics* 2008; 60(4): 1025-32.
15. Laroussi M, Tendero C, Lu X, Alla S, Hynes WL. Inactivation of bacteria by the plasma pencil. *Plasma Processes and Polymers* 2006; 3(6-7): 470-3.
16. Antoniu A, Nakajima T, Kurita H, Mizuno A. RETRACTED: Safety evaluation of nonthermal atmospheric pressure plasma liquid treatment: Single DNA molecule-based method. *Journal of Electrostatics* 2014; 72(3): 210-17.
17. Kuo SP. Air plasma for medical applications. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 2012; 5(9): 481-95.
18. Xiong Z, Cao Y, Lu X, Du T. Plasmas in tooth root canal. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2011; 39(11): 2968-9.
19. Schlegel J, Körtzer J, Boxhammer V. Plasma in

- cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* 2013; 1(2): 2-7.
20. 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.
21. Bhandari PR. *Crocus sativus* L.(saffron) for cancer chemoprevention: a mini review. *J Tradit Complement Med* 2015; 5(2): 81-7.
22. Metelmann HR, Nedrelow DS, Seebauer C, Schuster M, von Woedtke T, Weltmann KD, et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine* 2015; 3(1): 17-23.
23. Herrmann HW, Henins I, Park J, Selwyn GS. Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). *Physics of Plasmas* 1999; 6(5): 2284-9.
24. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; 37(11): 719-27.
25. Mirpour S, Ghomi H, Piroozmand S, Nikkhah M, Tavassoli SH, Azad SZ. The selective characterization of nonthermal atmospheric pressure plasma jet on treatment of human breast cancer and normal cells. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2014; 42(2): 315-22.
26. Kim JY, Ballato J, Foy P, Hawkins T, Wei Y, Li J, et al. Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosensors and Bioelectronics* 2011; 28(1): 333-8.
27. Weiss M, Gumbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, et al. Cold atmospheric plasma treatment induces anti-proliferative effects in prostate cancer cells by redox and apoptotic signaling pathways. *PLoS One* 2015; 10(7): e0130350.