

Effect of Cold Atmospheric Plasma on Gene Expression and Methylation of Genes Involved in Colorectal Cancer

Parisa Zafari¹,
Zahra Yazdani¹,
Haleh Akhavan-Niaki²,
Alireza Rafiei³

¹ PhD Student in Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Genetics, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

³ Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 31, 2021 ; Accepted October 18, 2021)

Abstract

Background and purpose: Colorectal cancer (CRC) is ranked as the second most common cancer in men and the third most common cancer in women worldwide. Routine treatments have many side effects and little efficiency. The aim of this study was to investigate the effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on epigenetic changes of some genes involved in CRC progression.

Materials and methods: Proliferation rate of cells after 40 s treatment was analyzed using MTT assay. Gene expressions of Beclin-1, Runx3, and AIM2 were measured using Real time PCR and methylation alternations of mentioned genes were evaluated with quantitative Methylation-Specific PCR (Q-MSP).

Results: The viability of CAP-treated C26 cells significantly decreased compared to that of the L929 cells. The viability of C26 cell line decreased to 75%, 52.2%, and 34% following 12, 24, and 48 hours of CAP therapy for 40 seconds. CAP therapy decreased the AIM2 expression (fold change=0.12) and increased the Runx3 gene expression (fold change=2.66) in C26 cell line. Also, treatment with CAP decreased the methylation level of Runx3 gene in CAP-treated cells compared with untreated cells (33.45% vs 63.24%).

Conclusion: This study confirmed the selective effect of CAP on cancer cells which is an ultimate goal of cancer therapy approach. Also, CAP treatment was found to affect gene expression and methylation level of critical players of CRC.

Keywords: cold atmospheric plasma, colorectal cancer, methylation, epigenetics

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (204): 26-39 (Persian).

* **Corresponding Author: Alireza Rafiei** - Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
(E-mail: rafiei1710@gmail.com)

اثر پلاسمای اتمسفری سرد بر میزان بیان و متیلاسیون ژن‌های دخیل در پاتوژنز سرطان کولورکتال

پریسا ظفری^۱
زهرا یزدانی^۱
هاله اخوان نیکی^۲
علیرضا رفیعی^۳

چکیده

سابقه و هدف: سرطان کولورکتال دومین سرطان شایع در مردان و سومین سرطان شایع در زنان در سراسر دنیا محسوب می‌شود. درمان‌های روتین کنونی اثرات جانبی زیادی داشته و کارایی پایینی دارند. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر پلاسمای اتمسفری سرد بر تغییرات اپی ژنتیک ژن‌هایی است که در بیماری‌زایی سرطان کولون نقش دارند.

مواد و روش‌ها: میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT به دست آمد. برای هر دو رده، تیمار به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد و ارزیابی بیان ژن‌های Beclin-1، Runx3 و AIM2 با کمک روش Real-time PCR محاسبه شد. همچنین میزان متیلاسیون ژن‌های نامبرده با تکنیک Quantitative methylation specific PCR (Q-MSP) به دست آمد.

یافته‌ها: بقای سلول‌های C26 پس از تیمار با CAP (Cold atmospheric Plasma) به صورت معناداری نسبت به سلول‌های L929 کاهش یافت. بقای سلول‌های C26 به ۷۵٪ درصد، ۵۲٪ درصد و ۳۴٪ درصد طی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت با تیمار ۴۰ ثانیه‌ای CAP کاهش یافت. میزان بیان ژن AIM2 کاهش (۰/۱۲ برابر) و بیان ژن Runx3 نسبت به گروه تیمار نشده افزایش (۲/۶۶ برابر) نشان داد. هم‌چنین تیمار با CAP، میزان متیلاسیون ژن Runx3 را نسبت به سلول‌های تیمار نشده کاهش داد (۳۳/۴۵ درصد در مقابل ۶۳/۲۴ درصد).

استنتاج: این مطالعه اثر انتخابی تیمار با CAP بر سلول‌های سرطانی که هدف نهایی در درمان سرطان می‌باشد را تأیید می‌کند. همچنین نشان داده شد که تیمار با CAP بر میزان بیان ژن و متیلاسیون ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی سرطان کولورکتال اثر گزار است.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای اتمسفری سرد، سرطان کولورکتال، متیلاسیون، اپی ژنتیک

مقدمه

رایج‌ترین یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها محسوب می‌شود و لازم است هر چه سریع‌تر درمان‌های مؤثرتری برای این نوع سرطان شناسایی شود. امروزه شناسایی ژن‌های دخیل در پاتوژنز بیماری و یافتن راهی برای دست‌کاری آن‌ها گزینه‌ی مناسبی برای

سرطان کولورکتال، سومین سرطان رایج و دومین علت مرگ در دنیا محسوب می‌شود (۱). در کشور ایران شیوع بیش‌تری از این بیماری نسبت به میانگین جهانی وجود دارد. میزان بقای ۵ ساله این سرطان در زنان و مردان به ترتیب ۴۵ و ۳۹ درصد می‌باشد (۲).

E-mail: rafiei1710@gmail.com

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

۱. دانشجوی دکتری ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳. استاد، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۳/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۸/۲۶

سرطان هاست (۲۳،۲۲) هرچند که رابطه‌ی بین این دو به‌خوبی شناخته‌نشده است. استرس‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد موجب افزایش متیلاسیون ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور و کاهش متیلاسیون کلی ژنوم می‌شود (۲۴،۲۳). برخلاف شواهد آزمایشگاهی مختلف در زمینه‌ی اثر پلاسما بر بیان ژن و فعالیت سلولی، مطالعات کمی به‌منظور بررسی تأثیر آن بر تغییرات اپی ژنتیکی مثل متیلاسیون که یکی از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در ایجاد تومور است صورت گرفته است (۲۵). بر این اساس در زمینه اپی ژنتیک سرطان، اکثر مطالعات بر نقش و ارتباط بالینی هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور تمرکز یافته‌اند. متیلاسیون DNA در نواحی CpG در تنظیم اپی ژنتیکی فعالیت ژن عمل کرده که طی آن سرکوب‌کننده‌های تومور یا انکوژن‌ها به ترتیب دچار افزایش متیلاسیون یا کاهش متیلاسیون در مرحله‌ی ایجاد تومور می‌شوند (۲۶). با همه‌ی بررسی‌های صورت گرفته اتیولوژی و پیشروی بسیاری از تومورها از جمله سرطان کولون مبهم است، اما عوامل مختلفی را در پاتوژنز این بیماری دخیل دانسته‌اند (۲۷). فاکتور نسخه‌برداری Runx3 یک سرکوب‌کننده‌ی تومور است که هایپرمتیله شده و بیان آن کاهش می‌یابد. پیشنهاد شده است که مکانیسم‌های تنظیمی اپی ژنتیکی ناشی از متیلاسیون القا شده در اثر ROS می‌تواند در کاهش بیان Runx3 نقش داشته باشد (۲۸). AIM2 یکی دیگر از فاکتورهایی است که بیان آن در سرطان کولون کاهش یافته است. به نظر می‌رسد که این فاکتور نقش خود را در پیشروی سرطان از طریق مهار پروتئین کیناز وابسته به DNA (DNA-PK) و به دنبال آن مهار فعال‌سازی Akt انجام می‌دهد (۲۹). علاوه بر این، فرضیات بسیاری در مورد نقش اتوفاژی در سرطان‌ها مطرح شده و نقش دوگانه‌ای برای آن در نظر گرفته شده است. اتوفاژی از طریق افزایش مقاومت دارویی، ممانعت از مرگ سلولی و القاء بقای سلول‌های توموری در مرحله‌ی خاموش، نقش کمکی در ایجاد تومور و از طریق حذف

یافتن درمان گسترده‌ی زیادی از بیماری‌ها محسوب می‌شود. از طرف دیگر درمانی را می‌توان به‌عنوان یک درمان مؤثر تلقی کرد که در ضمن جلوگیری از رشد و پیشروی تومور، کم‌ترین اثر را بر سلول‌ها و بافت‌های نرمال داشته باشد (۳). شیمی‌درمانی و پرتودرمانی کاربرد زیادی در درمان انواع بدخیمی‌ها دارند اما هر دو روش اثرات جانبی سیستمیک دارند، از جمله این که علاوه بر از بین بردن سلول‌های سرطانی موجب مرگ سلول‌های نرمال اطراف بافت بدخیم می‌شوند (۴). هم چنین بعضی از سرطان‌ها به این درمان‌ها مقاوم شده و به رشد و بقای خود ادامه می‌دهند (۵،۶). به تازگی استفاده از cold atmospheric plasma (CAP) به‌عنوان یک درمان جایگزین در سرطان‌های مختلف گزارش شده است (۷-۱۰). CAP به‌وسیله‌ی یک دستگاه اختصاصی (jets or dielectric barrier discharges) و با استفاده از گازهای هلیوم یا آرگون از طریق مکانیسم‌های پیش آپوپتوتیک موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۱،۱۰). با تنظیم مقاومت و ولتاژ خروجی از دستگاه و با تغییر شدت و قدرت انتشار پلاسما، یک دوز ملایم با قدرت تخلیه بار مناسب توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی و در عین حال حفظ سلول‌های نرمال را دارد (۱۲،۱۳). تاکنون موفقیت‌های چشم‌گیری در استفاده از CAP به‌صورت *in vitro* و *in vivo* در درمان سرطان‌های مختلف شامل سرطان سینه (۱۴)، شش (۱۵،۱۶)، کبد (۱۷) نوروبلاستوما (۱۸)، معده (۱۹،۲۰)، کولون (۲۱) و ... گزارش شده است. گونه‌های فعال اکسیژن^۱ ($^{\bullet}O_2$, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) (ROS) و نیتروژن^۲ ($ONOO^{\bullet}$, NO) (RNS) توسط خود دستگاه jet یا پس از تیمار در سلول‌های هدف تولید شده و یک شروع‌کننده‌ی کلیدی در خاصیت ضد سرطانی بودن CAP محسوب می‌شوند (۲۲). افزایش سطح ROS و متیلاسیون DNA مشخصه‌ی بسیاری از انواع

1. Reactive oxygen species
2. Reactive nitrogen species

در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر CAP بر میزان بیان و درصد متیلاسیون ژن‌های دخیل در پاتوژنز و پیشروی سرطان کولون با استفاده از رده‌ی سلولی C26 پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک بررسی آزمایشگاهی در گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد و کلیه‌ی مراحل کار طبق دستورالعمل‌های کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است (کد اخلاق: IR.MAZUMS..REC.1398.883).

کشت سلولی

رده‌ی سلولی سرطان کولون موشی و رده‌ی نرمال فیروبلاست موشی به ترتیب شامل C26 و L929 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شده و در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۵ درصد از گاز کربن دی‌اکسید (CO₂) نگهداری شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تعداد کافی و اطمینان از عدم آلودگی میکروبی، سلول‌ها با استفاده از محلول تریسین-EDTA از کف فلاسک جداسازی و جمع‌آوری شده و در دور 500g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده برای شمارش با استفاده از لام نوبار مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از محلول MTT

به منظور بررسی اثر سمیت CAP بر روی رده‌های C26 و L929، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول از هر رده در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به صورت ۳ چاهک هم‌تا در چاهک‌های پلیت کشت سلولی ۹۶ تایی کشت داده شده و سپس به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO₂ انکوبه شدند. برای هر رده تیمار با CAP به صورت زیر انجام شد: گروه بدون درمان و گروه با تابش CAP به

ارگانل‌های مخرب، کاهش آسیب DNA و محدود کردن التهاب در حفظ سلول‌های نرمال از بدخیم شدن نقش دارد (۳۰).

Beclin-1 پروتئینی ضروری در شکل‌گیری اتوفاگوزوم در طی مکانیسم اتوفاژی است. به نظر می‌رسد که این پروتئین نقش مهمی در رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی کولون دارد و کاهش آن نیز از طریق ممانعت از آپوپتوز پیش‌آگهی بدی در این بیماران دارد (۳۱) اما تاکنون نقش آن و عوامل تحریک‌کننده‌ی بیان آن که ممکن است تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون باشند به درستی شناسایی نشده است. برخلاف تغییرات ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیکی اغلب برگشت‌پذیر هستند که موجب می‌شود که مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی زمینه‌ی جذابی برای رویکردهای درمانی جدید فراهم آورد که از آن به عنوان اپی‌ژنتیک تراپی یاد می‌شود (۳۲). بر این اساس می‌توان با دست‌کاری میزان متیلاسیون DNA قبل از شروع پروسه‌های درمانی احتمال افزایش پاسخ به درمان را در روش‌های درمانی مختلف بالا برد (۳۳). با توجه به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن که CAP تولید می‌کند و نقش این عامل در تغییر متیلاسیون ژن‌ها و به دنبال آن در بیان آن‌ها، به نظر می‌رسد که تغییرات اپی‌ژنتیکی ژن‌ها به عنوان یک مکانیسم ویژه‌ی این درمان‌ها در نظر گرفته شود (۳۴،۳۵). در مطالعات انجام شده بر سرطان پستان نیز ثابت شده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن حاصل از CAP، تغییراتی در متیلاسیون نواحی CPG ژن‌های درگیر در متاستاز و بقای سلول‌های سرطانی ایجاد کرده و باعث کاهش بیان این ژن‌ها و در نتیجه افزایش آپوپتوز و کاهش متاستاز در رده‌های سلولی سرطانی می‌شوند (۳۵،۲۱). با توجه به روند رو به رشد سرطان در جوامع و نیاز مبرم به روش‌های درمانی که حداقل اثرات جانبی را برای بیمار به همراه داشته باشد، شناخت مکانیسم‌های درمانی رایج و توسعه‌ی روش‌های جدیدتر به منظور رسیدن به بهترین درمان با بیش‌ترین تأثیر بر سلول‌های سرطانی ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو

به مدت ۱۷۵ دقیقه. غلظت DNA های تیمار شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و انتخاب "ssDNA" ارزیابی شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت یکتا تجهیز و بر اساس پروتکل کیت انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. در ادامه سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت یکتا تجهیز و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. مقدار ۱ میکروگرم RNA در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای oligodT و Random hexamer مورد استفاده قرار گرفت. cDNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه برای ادامه‌ی آزمایش‌ها نگهداری شد.

ارزیابی بیان ژن به روش Real-time PCR

پرایمرهای بیان ژن با استفاده از نرم افزار آنالیز Oigocalc و Oligoanalyzer طراحی شد. پرایمرها و طول محصولات PCR در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. صحت و اختصاصیت پرایمرها با استفاده از وبسایت National Center for Biotechnology Information (NCBI) چک شد (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

آنالیز بیان ژن به حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر cDNA، 0.5mM از پرایمرهای forward و Reverse و ۷/۵ میکرولیتر از مستر میکس حاوی Sybergreen شرکت amplicon و ۴/۵ میکرولیتر H₂O انجام شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR شرایط دمایی (۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، و نمودار ذوب به صورت ۹۵°C به مدت ۵ ثانیه و ۶۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و ۹۵°C به مدت ۵ ثانیه) صورت گرفت. نمونه‌ها به صورت سه تایی جهت

مدت ۴۰ ثانیه (۳). تابش با ولتاژ ۱۴/۵ ولت و ارتفاع ۳ سانتی متری دهانه‌ی تابش دستگاه جت از پلیت قرار گرفت که توسط مطالعات قبلی محقق تنظیم شده بود (۳۶، ۳۷). پس از تیمار سلول‌ها و سپری شدن زمان انکوباسیون در هر یک از بازه‌های زمانی مربوطه، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] با غلظت 5mg/ml به محیط کشت داخل چاهک‌ها اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از خارج سازی محیط کشت، به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد تا بلورهای فورمازان ناشی از رنگ MTT حل شود، سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا قرائت شد (۳۸). نتایج حاصل از دستگاه به صورت درصد بقای سلولی حاصل از (تقسیم جذب نوری سلول تیمار شده بر جذب نوری کنترل و ضرب عدد به دست آمده در ۱۰۰) محاسبه شد. درصد سمیت CAP به صورت اختلاف عدد ۱ از درصد بقای سلولی گزارش شد. به منظور ارزیابی اثر CAP بر سلول‌های C26 و L929، میانگین درصد بقای سه بار تکرار هر سلول در هر حالت تیمار شده با حالت تیمار نشده مقایسه شد.

استخراج DNA و تیمار بی سولفیت

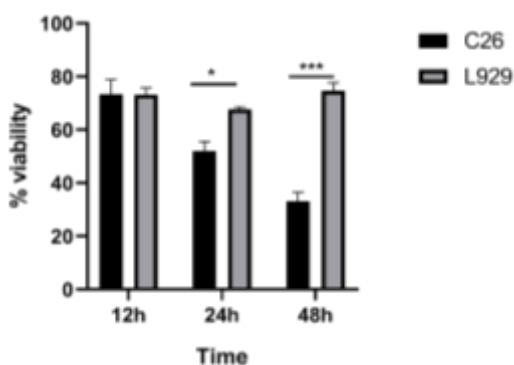
استخراج DNA به روش Salting out با استفاده از متد استاندارد از پیش ثابت شده انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. مقدار یکسانی DNA از هر گروه مورد مطالعه (۶۰۰-۵۰۰ ng) بر اساس دستورالعمل کیت بی سولفیت EpiTect جهت تیمار بی سولفیت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf مورد استفاده قرار گرفت. پارامترهای دمایی برای انجام این تیمار به صورت زیر است: ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۶۰°C به مدت ۲۰ دقیقه، ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۶۰°C به مدت ۸۵ دقیقه، ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و ۶۰°C

دو سلول استفاده شد. هم‌چنین برای مقایسه‌ی نتایج در سه زمان مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (Anova) برای مقایسه‌ی آن‌ها استفاده شد. در نهایت نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graphpadprism 8 ترسیم شد.

یافته‌ها

ارزیابی اثر سمیت CAP بر سلول‌های توموری C26 و سلول‌های نرمال L929

به‌منظور بررسی این اثر، پس از تابش CAP بر سلول‌ها در مقاطع زمانی مختلف، از آزمون بررسی تکثیر سلولی استفاده شد. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: تأثیر سمیت CAP بر رده‌ی سلولی سرطانی C26 و رده نرمال فیروبلاستی L929. پس از تیمار ۴۰ ثانیه‌ای سلول‌ها با CAP و انکوباسیون ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعته‌ی سلول‌ها، درصد بقا به ۷۵، ۵۲، ۲ و ۳۴ درصد به ترتیب کاهش یافت.

کاهش خطای تکنیکی ارزیابی شد. بیان نسبی ژن با استفاده از متد Livak (۳۹) و نسبت به بیان ژن house keeping نرمال‌سازی شد. بیان نسبی mRNA با استفاده از فرمول ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) به دست آمد.

PCR کمی مخصوص ارزیابی متیلاسیون (Q-MSP)

Quantitative methylation specific PCR (Q-MSP)، با استفاده از مستر میکس Sybergreen انجام شد. پرایمرهای متیله و غیرمتیله ژن‌های Beclin-1 و Runx3 با استفاده از نرم‌افزار آنالیز MethPrimer طراحی شد (جدول شماره ۲). (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR مقدار ۲۵ pmol از پرایمرهای forward و reverse متیله و غیر متیله و مقدار ۱۰۰-۵۰ ng از DNA تیمار شده انجام شد. میزان دمتیلاسیون ژن‌ها با استفاده از فرمول $100\% / [1 + 2^{(CtTG - CtCG)}] \times 100\%$ در آن Ct، CtTG حاصل از پرایمرهای دمتیله و Ct، CtCG حاصل از پرایمرهای متیله بود (۴۰، ۴۱). به دست آمد.

آنالیز آماری

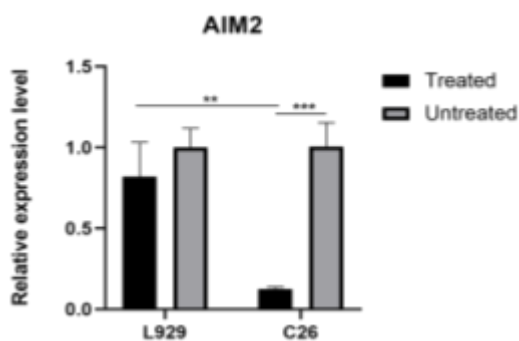
پس از اطمینان از نرمال بودن نتایج به دست آمده از آزمون Paired-t test برای مقایسه‌ی قبل و بعد از treatment سلول‌ها و آزمون t test برای مقایسه‌ی نتایج

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در ارزیابی بیان ژن

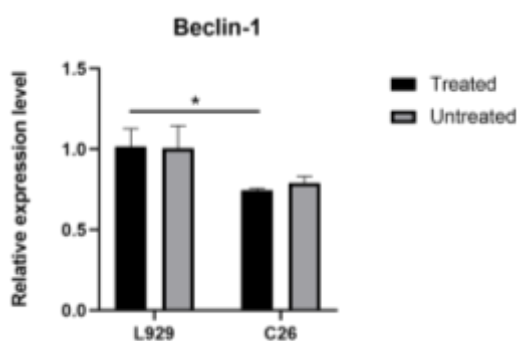
| PCR product size | Reverse primer | Forward primer | ژن |
|------------------|------------------------|------------------------|---------|
| ۱۶۵ | GGATCAGCCTAGATACAATAGC | GAGGACTTGATTCAGGAGAC | AIM2 |
| ۱۰۱ | ATAACGGCAACTCCTTAGAT | CAATAAGATGGGTCTGAAGTTT | Beclin1 |
| ۱۳۱ | TTGGTCTGGTCTTCTATCTTCT | AGTTTCACGCTCACAATCAC | Runx3 |
| ۱۱۴ | TTACTGGCAACATCAACAGG | GGGATTGGAATCAGTTTGTG | HPRT |

جدول شماره ۲: پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی میزان متیلاسیون ژن‌ها

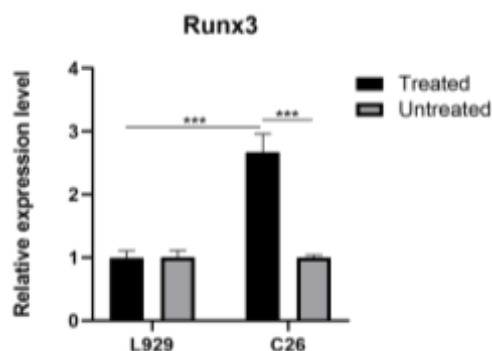
| PCR product size | Demethylated primer | Methylated primer | ژن |
|------------------|--|---|----------|
| ۱۳۲ | F: GAGAAAATTGTTTGGGTGTTATT R: AATTTC AACCTCCTAACTACAAC | F: AGAAAATCGTTTGGGTGTTATC R: AATTTC AACCTCCTAACTACGAC | Runx3 |
| ۱۵۸ | F: GTGGGATGATATTAAGAGGATTTGT R: AACTCTAAAATAAAAAACATCAA | F: GAGTGGGATGATATTAAGAGGATTC R: AACTCTAAAATAAAAAACGTCGAA | Beclin-1 |



نمودار شماره ۲: بیان ژن AIM2 در سلول های L929 و C26 پس از تیمار با CAP. تیمار با CAP بیان AIM2 را در سلول های C26 به میزان ۱۲ درصد کاهش می دهد ولی در سلول های فیروبلاست نرمال L929 تفاوت معناداری پس از مواجهه با CAP دیده نمی شود.



نمودار شماره ۳: بیان ژن Beclin-1 در سلول های L929 و C26 پس از تیمار با CAP. تیمار با CAP بیان Beclin-1 را در سلول های C26 به صورت معناداری تغییر نمی دهد اما بیان نسبی آن در مقایسه با سلول های L929 تیمار شده کاهش محسوسی دارد.



نمودار شماره ۴: بیان ژن Runx3 در سلول های L929 و C26 پس از تیمار با CAP. تیمار با CAP بیان Runx3 را در سلول های C26 به میزان ۲.۶۶ برابر افزایش می دهد. همچنین بیان آن نسبت به سلول های فیروبلاست نرمال به میزان ۲٫۶۸ برابر افزایش بیان دارد.

بر این اساس، اثر سمیت CAP بر سلول های C26، از ۷۵ درصد پس از ۱۲ ساعت از تابش CAP به ۵۲/۲ درصد و ۳۴ درصد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب کاهش یافت. در حالی که تغییر محسوسی در بقای سلول های L929 در هیچ یک از بازه های زمانی حاصل نشد. در ادامه برای بررسی بیان ژن و میزان میتلاسیون زمان ۲۴ ساعت پس از تابش در نظر گرفته شد.

ارزیابی اثر CAP بر میزان بیان ژن های Beclin-1، Runx3 و AIM2

در این بررسی، میزان بیان ژن های نامبرده نسبت به میزان بیان ژن HPRT به عنوان ژن house keeping نرمال سازی شد. نتایج آماری حاکی از کاهش معنی دار بیان AIM2 در ردهی C26 پس از تابش CAP بود (P = ۰/۰۰۰۳، Fold change = ۰/۱۲). هم چنین تفاوت معنی داری بین بیان این ژن در مقایسه با سلول های L929 مشاهده شد و سلول های L929 بیان بالاتری از AIM2 نسبت به سلول های C26 داشتند (Fold change = ۶/۵۹، P = ۰/۰۰۱۴) (نمودار شماره ۲).

برخلاف AIM2، بیان ژن Beclin-1 در سلول های C26 پس از تابش CAP تفاوت معنی داری نشان نداد (P = ۰/۹۹۹) در حالی که بیان آن در سلول های C26 نسبت به سلول های L929 (Fold change = ۰/۷۶، P = ۰/۰۲۸) کاهش بیان معنی داری نشان داد. بیان آن در سلول های C26 تیمار نشده نسبت به سلول های L929 تیمار نشده نیز کاهش یافته بود اما از لحاظ آماری معنی دار نبود (P = ۰/۵۲) (نمودار شماره ۳).

در مورد بیان ژن Runx3، بررسی های آماری نشان داد که بیان آن در سلول های C26 پس از تابش CAP (P = ۰/۰۰۰۶، Fold change = ۲/۶۶) و در مقایسه با سلول های L929 (P = ۰/۰۰۰۵، Fold change = ۲/۶۸) افزایش بیان دارد. (نمودار شماره ۴).

پس از تیمار با CAP، تیمار با CAP میزان متیلاسیون ژن Runx3 را در مقایسه با سلول‌های C26 تیمار نشده و سلول‌های L929 تیمار شده کاهش می‌دهد.

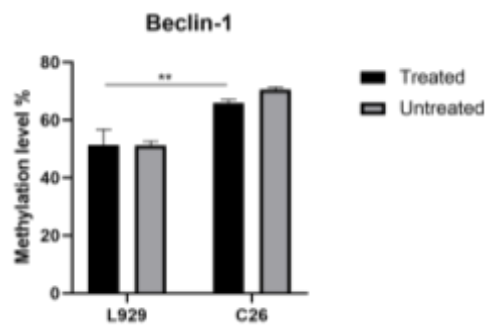
بحث

پلاسمای اتمسفری سرد^۳ (CAP) یک گاز یونیزه است که یک منبع قابل کنترل برای گونه‌های فعال، ذرات خنثی، پرتوهای الکترومغناطیسی و اشعه‌ی فرابنفش محسوب می‌شود و در عین حال اثرات ضد توموری آن در *in vitro* و *in vivo* مشخص شده است (۴۲). مشخص شده است که CAP می‌تواند تغییرات اپی ژنتیک مختلفی در ژن‌ها ایجاد کند (۴۳). اپی ژنتیک از جمله تغییرات ارثی و قابل برگشت در ژن است که بدون تغییر در توالی DNA، بیان ژن مربوطه را کاهش یا افزایش می‌دهد. افزایش متیلاسیون باعث سرکوب بیان ژن‌ها و کاهش آن موجب فعال شدن آن‌ها می‌شود (۴۴). تغییر الگوی متیلاسیون در بسیاری از سرطان‌ها رخ می‌دهد و منجر به کاهش و افزایش بسیاری از ژن‌های کلیدی می‌شود (۴۵-۴۷). با توجه به ضرورت نیاز به شناسایی درمان مؤثر برای سرطان‌ها و عدم وجود درمانی که به صورت اختصاصی تنها بر سلول‌های سرطانی اثر بگذارد، هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی اثر CAP بر بیان و تغییرات اپی ژنتیکی ژن‌هایی است که در پاتوژنز سرطان کولون نقش بارزی دارند. در این مطالعه مشخص شد که CAP تأثیر بسزایی در مهار رشد و بقای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال دارد. به طوری که پس از ۴۰ ثانیه مواجهه با CAP، بقای سلول‌ها از ۷۵ درصد به ۳۲ درصد پس از ۴۸ ساعت از زمان تیمار رسید. در حالی که بقای سلول‌های نرمال تغییر چندانی پیدا نکرد که نشان‌دهنده‌ی انتخاب‌پذیری بالای CAP در مواجهه با سلول‌های سرطانی است. جالب توجه است که با افزایش مدت زمان انکوباسیون سلول‌ها پس از تیمار با CAP، میزان بقای

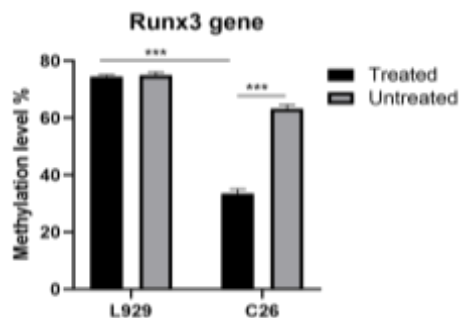
ارزیابی میزان اثر تابش CAP بر متیلاسیون ژن‌های *Beclin-1* و *Runx3*

DNA تیمار شده با بی سولفیت برای ارزیابی میزان متیلاسیون بر اساس پرایمرهای متیله و غیر متیله مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی‌ها نشان داد که تابش CAP بر میزان متیلاسیون ژن *Beclin-1* در سلول‌های C26 نسبت به سلول‌های تیمار نشده اثر محسوسی ندارد اما میزان متیلاسیون آن نسبت به سلول‌های L929 تیمار شده بالاتر است (۶۵/۹ درصد در مقابل ۵۱/۴۳ درصد، $P = 0/001$) (نمودار شماره ۵).

نتایج آماری نشان داد که میزان متیلاسیون ژن *Runx3* در سلول‌های C26 پس از تابش CAP به صورت معنی‌داری کاهش یافت (۳۳/۴۵ در مقابل ۶۳/۲۴، $P < 0/0001$). همچنین این کاهش در مقایسه با سلول‌های L929 تیمار شده نیز مشاهده شد (۳۳/۲۴ در مقابل ۷۴/۵۰، $P < 0/0001$) (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۵: میزان متیلاسیون ژن *Beclin1* در سلول‌های C26 و L929 پس از تیمار با CAP. تیمار با CAP میزان متیلاسیون ژن *Beclin1* را در سلول‌های C26 در مقایسه با سلول‌های L929 تیمار شده افزایش می‌دهد.



تصویر شماره ۶: میزان متیلاسیون ژن *Runx3* در سلول‌های C26 و L929

آن‌ها بیشتر کاهش می‌یابد. اثرات ضد توموری CAP در مقایسه با سایر داروهای ضد توموری مانند مشتق انیدروبین، دی سولفیرام که ماکزیمم بر ۳۰ درصد سلول‌ها اثر می‌گذارند، قابل توجه است (۴۸-۵۰). در مطالعات قبلی محقق نیز اثرات ضد توموری CAP بر رده‌های مختلف توموری گزارش شده است (۵۱،۳۷،۳).

در مطالعه‌ی صورت گرفته در سال ۲۰۲۰، پس از تیمار رده‌های سرطان ریه A549، سرطان پستان MCF-7، و ملانوما B16 با CAP مشخص شد که نه تنها با افزایش مدت‌زمان مواجهه با CAP از ۲۰ تا ۴۰ ثانیه بقای سلول‌ها کاهش می‌یابد، بلکه هیچ اثر سمیتی بر سلول‌های نرمال L929 مشاهده نمی‌شود (۳). این اثر مهارى در بسیاری از مطالعات دیگر مانند مطالعه‌ی جلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۵۲) و Park و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۳۴) بر روی رده‌ی سرطانی MCF-7، مطالعه‌ی Kim و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۵۳) و مطالعه‌ی Huang و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۵۴) بر رده‌ی A549، هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. مهم‌ترین جنبه این مشاهدات تأثیر بسیار ناچیز CAP بر سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی است که می‌توان آن را به چندین مورد نسبت داد. ابتدا این که سلول‌های سرطانی به دلیل متابولیسم بالاتر سطح ROS بیش‌تری نسبت به سلول‌های نرمال دارند و بنابراین در مواجهه با CAP زودتر به آستانه‌ی سطح ROS رسیده و دچار آپوپتوز می‌شوند (۵۶،۵۵،۱۵). از طرفی، به دلیل بالاتر بودن تعداد کانال‌های آکوپورین در غشای سلول‌های سرطانی، این سلول‌ها نسبت به سلول‌های نرمال نفوذپذیرتر هستند و مقدار بیشتری ROS وارد سلول‌ها می‌شود (۵۸،۵۷،۵۵). در ادامه به‌منظور بررسی اثر CAP بر بیان ژن‌های دخیل در پاتوژنز سرطان کولون و ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی ناشی از آن، بررسی‌هایی صورت گرفت. ژن AIM2 در سرطان‌های مختلف نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کند (۵۹). نشان داده شده است که بیان AIM2 در سرطان کولون کاهش یافته است و این کاهش با افزایش متاستاز سلولی و سایر

تومور مرتبط است (۶۰). در این مطالعه مشخص شد که AIM2 بیان نسبتاً مشابهی در سلول‌های نرمال و سرطانی دارد، اما بعد از تابش CAP به‌طور محسوسی بیان آن کاهش می‌یابد که این کاهش در سلول‌های نرمال قابل توجه نبود و نشان می‌دهد که CAP اثر منفی بر بیان AIM2 در سلول‌های C26 دارد. تاکنون مطالعه‌ای با هدف ارزیابی اثر CAP بر بیان AIM2 انجام نشده است. اما به نظر می‌رسد که ROS های تولیدشده طی درمان با CAP اثر معکوسی بر بیان AIM2 دارند. با این وجود در مطالعه‌ی Dan Liu و همکاران مشخص شده است که مهار کردن AIM2 اثرات آنتی توموری CAR-T cell را تقویت می‌کند (۶۱). بنابراین به نظر می‌رسد که AIM2 نقش دوگانه‌ای در مهار تومور ایفا می‌کند.

Beclin-1 یکی از عناصر ضروری در اتوفازی است که برای شکل‌گیری اتوفازگوزوم موردنیاز است. مطالعات مختلفی نشان داده است که در سلول‌های سرطانی پروموتور این ژن در نواحی CpG متیله شده و بیان آن کاهش می‌یابد (۶۲) که کاهش بیان این ژن می‌تواند فعالیت اتوفازی و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار کند (۶۳،۶۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز مشخص شد که تیمار با CAP، می‌تواند بیان Beclin-1 را در سلول‌های سرطانی کاهش دهد که این کاهش در سلول‌های نرمال دیده نشد. در ادامه همچنین برای ارزیابی اثر CAP بر میزان متیلاسیون این ژن، مشخص شد که کاهش بیان Beclin-1 در سلول‌های سرطانی هم‌راستا با افزایش متیلاسیون این ژن می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که CAP می‌تواند از طریق تغییر در میزان متیلاسیون ژن Beclin-1 بیان آن را کاهش دهد که این خود می‌تواند گزینه‌ی درمانی مناسبی تلقی شود. هم‌چنین در ادامه، بیان ژن Runx3 به‌عنوان یک مهارکننده‌ی توموری ارزیابی شد (۶۵،۶۶). تحقیقات نشان داد که پرموتور این ژن در نمونه‌های توموری چندین سرطان از جمله معده، کولورکتال، پروستات، ریه و ... هایپر متیله شده و بیان آن کاهش می‌یابد (۶۷-۶۹). جالب توجه است که بیان این ژن

سلول‌های توموری می‌شود (۳۴). هم‌چنین مطالعه Lee و همکاران مشخص کرد که CAP باعث هایپرمتیلاسیون در نواحی CpG پرموتر miR-19a و در نتیجه مهار این oncomiR و افزایش بیان ژن‌های هدف آن از جمله ABCA1 و PTEN و کاهش بقا و تکثیر در سلول‌های سرطانی می‌شود (۳۵).

به‌طور کلی مطالعه‌ی حاضر اثر انتخابی درمان CAP بر سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال تأیید می‌کند. از آن‌جا که بررسی مکانیسم اثرهای CAP بر سلول‌های سرطانی به‌طور کامل مشخص نشده است، بر اساس یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های اثر CAP بر سلول‌های سرطانی می‌تواند اثر بر میزان بیان ژن‌های دخیل در پاتوژنز آن از طریق ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند که از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت‌های مالی این طرح تشکر نمایند (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1398.883).

References

1. WHO, Int Agency Res Cancer. Colorectal Cancer Awareness Month 2021. Available at: <https://www.iarc.who.int/featured-news/ccam2021/>.
2. basi M, Asgari S, Pirdehghan A, Sedighi Pashaki AA, Esna-Ashari F. Survival Rate of Colorectal Cancer and Its Effective Factors in Iran. Acta Medica Iranica 2021; 59(5): 290-297.
3. Yazdani Z, Mehrabanjoubani P, Biparva P, Rafiei A. Cytotoxicity Effect of Cold Atmospheric Plasma on Melanoma (B16-F10), Breast (MCF-7) and Lung (A549) Cancer Cell Lines Compared with Normal Cells. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(187): 38-48 (Persian).
4. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. Sci Rep 2012; 2(1): 1-10.
5. Daeschlein G, Scholz S, Lutze S, Arnold A, Podewils S, Kiefer T, et al. Comparison between cold plasma, electrochemotherapy and combined therapy in a melanoma mouse model. Exp Dermatol 2013; 22(9): 582-586.
6. Fogarty GB, Hong A. Radiation therapy for advanced and metastatic melanoma. J Surg Oncol 2014; 109(4): 370-375.

7. Yan D, Sherman JH, Keidar M. The application of the cold atmospheric plasma-activated solutions in cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 2018; 18(6): 769-775.
8. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette J-P, Laurencin-Dalicieux S, et al. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: A concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol* 2018; 10: 1758835918786475.
9. Yan D, Malyavko A, Wang Q, Lin L, Sherman JH, Keidar M. Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment, a Critical Review. *Applied Sciences* 2021; 11(16): 7757.
10. Graves DB. Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for cancer therapy. *Plasma Process Polymer* 2014; 11(12): 1120-1127.
11. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8(9): 15977.
12. Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M, Zhang LG. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PloS one* 2013; 8(9): e73741.
13. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 2012; 2(636).
14. Keidar M. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sources Sci Technol* 2015; 24(3): 033001.
15. 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): 1295-1301.
16. Li W, Yu H, Ding D, Chen Z, Wang Y, Wang S, et al. Cold atmospheric plasma and iron oxide-based magnetic nanoparticles for synergetic lung cancer therapy. *Free Radic Biol Med* 2019; 130: 71-81.
17. Zhang X, Li M, Zhou R, Feng K, Yang S. Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. *Appl Phys Lett* 2008; 93(2): 021502.
18. Walk RM, Snyder JA, Srinivasan P, Kirsch J, Diaz SO, Blanco FC, et al. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2013; 48(1): 67-73.
19. Tavares-da-Silva E, Pereira E, Pires AS, Neves AR, Braz-Guilherme C, Marques IA, et al. Cold atmospheric plasma, a novel approach against bladder cancer, with higher sensitivity for the high-grade cell line. *Biology (Basel)* 2021; 10(1): 41.
20. Chen Z, Lin L, Cheng X, Gjika E, Keidar M. Treatment of gastric cancer cells with nonthermal atmospheric plasma generated in water. *Biointerphases* 2016; 11(3): 031010.
21. Schneider C, Arndt S, Zimmermann JL, Li Y, Karrer S, Bosserhoff AK. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells. *Biol Chem* 2019; 400(1): 111-122.
22. 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(12): 1128-1137.
23. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* 2017; 387: 95-105.
24. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266(1): 6-11.
25. Wu Q, Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr*

- drug Targets 2015; 16(1): 13-19.
26. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128(4): 683-692.
 27. Shree A, Islam J, Sultana S. Quercetin ameliorates reactive oxygen species generation, inflammation, mucus depletion, goblet disintegration, and tumor multiplicity in colon cancer: Probable role of adenomatous polyposis coli, β -catenin. *Phytother Res* 2021; 35(4): 2171-2184.
 28. Kang KA, Zhang R, Kim GY, Bae SC, Hyun JW. Epigenetic changes induced by oxidative stress in colorectal cancer cells: methylation of tumor suppressor RUNX3. *Tumor Biol* 2012; 33(2): 403-412.
 29. Wilson JE, Petrucelli AS, Chen L, Koblansky AA, Truax AD, Oyama Y, et al. Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nature Med* 2015; 21(8): 906-913.
 30. Burada F, Nicoli ER, Ciurea ME, Uscatu DC, Ioana M, Gheonea DI. Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. *World J Gastrointest Oncol* 2015; 7(11): 271-284.
 31. Koukourakis M, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter K, Harris A. Beclin 1 over-and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *Br J Cancer* 2010; 103(8): 1209-1214.
 32. Saleem M, Abbas K, Manan M, Ijaz H, Ahmed B, Ali M, Hanif M, et al. Epigenetic therapy for cancer. *Pak J Pharm Sci* 2015; 28(3): 1023-1032.
 33. Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genet Epigenet* 2014; 6: 9-19.
 34. Park S-B, Kim B, Bae H, Lee H, Lee S, Choi EH, et al. Differential epigenetic effects of atmospheric cold plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *PloS one* 2015; 10(6): e0129931.
 35. Lee S, Lee H, Bae H, Choi EH, Kim SJ. Epigenetic silencing of miR-19a-3p by cold atmospheric plasma contributes to proliferation inhibition of the MCF-7 breast cancer cell. *Sci Rep* 2016; 6(1): 1-10.
 36. Alimohammadi M, Golpur M, Sohbatzadeh F, Hadavi S, Bekeschus S, Niaki HA, et al. Cold Atmospheric Plasma Is a Potent Tool to Improve Chemotherapy in Melanoma In Vitro and In Vivo. *Biomolecules* 2020; 10(7): 1011.
 37. Rafiei A, Sohbatzadeh F, Hadavi S, Bekeschus S, Alimohammadi M, Valadan R. Inhibition of murine melanoma tumor growth in vitro and in vivo using an argon-based plasma jet. *Clin Plasma Med* 2020; 19-20(11): 100102.
 38. Kardan M, Yazdani Z, Morsaljahani Z, Ebrahimzadeh MA, Rafiei A. Cytotoxic effect of methanolic extracts of *Fritillaria imperialis* bulbs and *Eryngium caucasicum* leaves on hepatoma and colon cancer cells. *Asian Pacific J Trop Biomed* 2019; 9(8): 353-538.
 39. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-1108.
 40. Cottrell S, Jung K, Kristiansen G, Eltze E, Semjonow A, Ittmann M, et al. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *J Urol* 2007; 177(5): 1753-1758.
 41. Dav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory

- T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 2012; 209(10): 1713-1722.
42. 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.
43. Park J, Suh D, Tang T, Lee HJ, Roe J-S, Kim GC, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces epigenetic modifications that activate the expression of various cytokines and growth factors in human mesoderm-derived stem cells. *Free Radic Biol Med* 2020; 148: 108-122.
44. Morgan A, Davies TJ, Mc Auley MT. The role of DNA methylation in ageing and cancer. *Proc Nutr Soc* 2018; 77(4): 412-422.
45. Ghavifekr Fakhr M, Farshdousti Hagh M, Shanehbandi D, Baradaran B. DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer. *Genet Res Int* 2013; 2013.
46. Akhavan-Niaki H, Samadani AA. DNA methylation and cancer development: molecular mechanism. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(2): 501-513.
47. Dehan P, Kustermans G, Guenin S, Horion J, Boniver J, Delvenne P. DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9(7): 651-657.
48. Barezzi N, Laroussi M. Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. *J Phys D: Appl Phys* 2012; 45(42): 422002.
49. Yan X, Xiong Z, Zou F, Zhao S, Lu X, Yang G, et al. Plasma-induced death of HepG2 cancer cells: intracellular effects of reactive species. *Plasma Process Polym* 2012; 9(1): 59-66.
50. Stoffels E, Kieft I, Sladek R, Van den Bedem L, Van der Laan E, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sources Sci Technol* 2006; 15(4): S169.
51. Alimohammadi M, Golpour M, Sohbatazadeh F, Hadavi S, Bekeschus S, Niaki HA, et al. Cold atmospheric plasma is a potent tool to improve chemotherapy in melanoma in vitro and in vivo. *Biomolecules* 2020; 10(7): 1011.
52. Jalili A, Irani S, Mirfakhraie R. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5911-5917.
53. Kim SJ, Chung T. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep* 2016; 6(1): 20332.
54. Huang J, Li H, Chen W, Lv G-H, Wang X-Q, Zhang G-P, et al. Dielectric barrier discharge plasma in Ar/O₂ promoting apoptosis behavior in A549 cancer cells. *Appl Phys Lett* 2011; 99(25): 253701.
55. 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 (Review). *Biointerphases* 2015; 10(4): 040801.
56. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(12): 1875-1884.
57. Almasalmeh A, Krenc D, Wu B, Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS J* 2014; 281(3): 647-656.
58. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107(36): 15681-1586.

59. Karki R, Man SM, Kanneganti T-D. Inflammasomes and cancer. *Cancer Immunol Res* 2017; 5(2): 94-99.
60. Xu M, Wang J, Li H, Zhang Z, Cheng Z. AIM2 inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of Gli1. *Aging (Albany NY)* 2020; 13(1): 1017-1031.
61. Liu D, Xu X, Dai Y, Zhao X, Bao S, Ma W, et al. Blockade of AIM2 inflammasome or α 1-AR ameliorates IL-1 β release and macrophage-mediated immunosuppression induced by CAR-T treatment. *J Immunother Cancer* 2021; 9(1): e001466.
62. Li Z, Chen B, Wu Y, Jin F, Xia Y, Liu X. Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC cancer* 2010; 10(1): 1-12.
63. Liu L, Zhao WM, Yang XH, Sun ZQ, Jin HZ, Lei C, et al. Effect of inhibiting Beclin-1 expression on autophagy, proliferation and apoptosis in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2017; 14(4): 4319-4324.
64. Zheng H-c, Zhao S, Xue H, Zhao E-h, Jiang H-m, Hao C-l. The Roles of Beclin 1 Expression in Gastric Cancer: A Marker for Carcinogenesis, Aggressive Behaviors and Favorable Prognosis, and a Target of Gene Therapy. *Front Oncol* 2020; 10(2897).
65. Chen LF. Tumor suppressor function of RUNX3 in breast cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113(5): 1470-1477.
66. Chen F, Wang M, Bai J, Liu Q, Xi Y, Li W, et al. Role of RUNX3 in suppressing metastasis and angiogenesis of human prostate cancer. *PLoS one* 2014; 9(1):e86917.
67. Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008; 180(3): 1141-1145.
68. Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang Y-J, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84(4): 479-484.
69. Reis RSd, Santos JAd, Abreu PMd, Dettogni RS, Santos EdVWd, Stur E, et al. Hypermethylation status of DAPK, MGMT and RUNX3 in HPV negative oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Biol* 2020; 43(3): e20190334.
70. Nishio M, Sakakura C, Nagata T, Komiyama S, Miyashita A, Hamada T, et al. RUNX3 promoter methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2673-2682.
71. Shin EJ, Kim HJ, Son MW, Ahn TS, Lee HY, Lim DR, et al. Epigenetic inactivation of RUNX3 in colorectal cancer. *Ann Surg Treat Res* 2018; 94(1): 19-25.
72. Soong R, Shah N, Peh B, Chong P, Ng S, Zeps N, et al. The expression of RUNX3 in colorectal cancer is associated with disease stage and patient outcome. *Br J Cancer* 2009; 100(5): 676-679.
73. im BR, Kang MH, Kim JL, Na YJ, Park SH, Lee SI, et al. RUNX3 inhibits the metastasis and angiogenesis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2016; 36(5): 2601-2608.