

Cytotoxicity Effect of Cold Atmospheric Plasma on Melanoma (B16-F10), Breast (MCF-7) and Lung (A549) Cancer Cell Lines Compared with Normal Cells

Zahra Yazdani¹,
Pooyan Mehrabanjoubani²,
Pourya Biparva³,
Alireza Rafiei⁴

¹ MSc in Cellular and Molecular Biology, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 10, 2018 ; Accepted December 15, 2019)

Abstract

Background and purpose: Cancer is one of the major health challenges in the world. The efficacy of current treatments is low but their side effects are high. Cold atmospheric plasma (CAP) is a new modality for cancer treatment. This study aimed to compare the cytotoxicity effect of CAP on the cell line models of common cancers and normal cells.

Materials and methods: In this experimental study, argon based CAP was used to treat mouse melanoma (B16-F10), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (A549) cell lines, and compared with normal mouse fibroblast cells (L929), and human immortalized normal respiratory epithelial cell (Beas). We cultivated 4 groups in each cancer and normal cell lines: untreated cells; CAP exposed cells for 20 seconds, 30 seconds, and 40 seconds. The morphological alterations and proliferation rate of the cells were evaluated after 24 and 48 hours.

Results: The viability of CAP-treated cancer cells significantly decreased compared to that of the untreated cells. The viability of A549 and MCF-7 cell lines decreased to 33.9% and 49.5%, 24 hours after CAP therapy for 30 seconds. In addition, 40 seconds exposure to CAP reduced viability of B16-F10 melanoma cells to 37.9%. Whereas the CAP had no detrimental cytotoxic effect on normal L929 cells. The maintenance effect of CAP had a time dependent pattern and its cytotoxicity effect increased from 24 to 48 hour incubation.

Conclusion: This study showed that the effect of CAP on cancer cells is a selective effect that is largely dependent on the radiation dose and duration of exposure of cells to compounds produced by CAP. We can use CAP in treatment of cancer because of its cytotoxicity and selectivity on cancer cells.

Keywords: cold atmospheric plasma, cancer, cell cytotoxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (187): 38-48 (Persian).

* **Corresponding Author:** Alireza Rafiei - Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: rafiei1710@gmail.com)

تاثیر پلاسمای اتمسفری سرد در معانعت از رشد و تکثیر رده های سلولی سرطان ملانوما (B16-F10، سرطان پستان (MCF-7)، سرطان ریه (A549) در مقایسه با سلول های نرمال

زهرا یزدانی¹

پویان مهربان جوبنی¹

پوریا بیپروا¹

علیرضا رفیعی²

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یکی از چالش های مهم سلامت در جهان می باشد. درمان های رایج این بیماری عمدتاً موفقیت آمیز نبوده و با عوارض جانبی متعددی همراه است. پلاسمای اتمسفری سرد (CAP) موضوع تحقیق جدیدی در درمان سرطان می باشد. این مطالعه باهدف ارزیابی تأثیر سمیت CAP بر مدل های سلولی سرطان های شایع در مقایسه با سلول های طبیعی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، از دستگاه CAP گاز آرگون برای تیمار رده های سلولی سرطان های ملانوما موشی (B16-F10)، رده سرطانی انسانی پستان (MCF-7) و ریه انسانی (A549) در مقایسه با سلول های نرمال فیروبلست موشی (L929) و اپیتلیال تنفسی نامیرا شده انسانی (Beas) استفاده شد. برای هر رده سلولی نرمال و یا سرطانی، تیمارها به این صورت انجام شد: گروه بدون درمان، تحت درمان با CAP به مدت 20 ثانیه، 30 ثانیه و گروه آخر به مدت 40 ثانیه تحت تابش قرار گرفتند و مورفولوژی و قابلیت تکثیر سلول ها در فاصله زمانی 24 و 48 ساعت بعد از مواجهه با CAP ارزیابی شد.

یافته ها: درصد زنده ماندن سلول های سرطانی تیمار شده با CAP به طور معنی داری نسبت به سلول های تیمار نشده کاهش یافت. پس از 24 ساعت تیمار 30 ثانیه ای با CAP زنده ماندن رده های سلولی A549 و MCF-7 به ترتیب به 33/9 و 49/5 درصد کاهش یافت. همچنین تیمار، باعث کاهش زنده ماندن سلول های B16-F10 به 37/9 درصد شد، اما CAP سمیت ناچیزی بر سلول های L929 داشت. به علاوه تأثیر CAP تا حدود زیادی وابسته به زمان تأثیر است و سمیت آن از 24 به 48 ساعت افزایش می یابد.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد تأثیر CAP بر سلول های سرطانی یک تأثیر انتخابی می باشد و وابسته به دوز تابش و مدت مواجهه سلول ها با ترکیبات تولید شده توسط CAP است. می توان از CAP به علت سمیت فوق العاده بر سلول های سرطانی و انتخاب پذیری بالا برای درمان سرطان استفاده کرد.

واژه های کلیدی: پلاسمای اتمسفری سرد، سرطان، سمیت سلولی

مقدمه

سرطان یکی از مهم ترین چالش های نظام سلامت محسوب می شود؛ به طوری که طبق آمار سال 2018 این بیماری اصلی ترین علت مرگ و مهم ترین مانع افزایش امید به زندگی در جهان در قرن بیست و یکم است (1).

E-mail: rafiei1710@gmail.com

مؤلف مسئول: علیرضا رفیعی - ساری: 17 کیلومتر جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

1. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

2. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

3. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

4. استاد، گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات یولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1398/5/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/5/26 تاریخ تصویب: 1398/9/24

درمان‌های رایج سرطان نظیر جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و هورمون درمانی نیز هر کدام عوارض جانبی متعددی دارند که اغلب کارایی آن‌ها را زیر سؤال می‌برد. به‌طوری‌که کاربرد این روش‌های درمانی در سرطان منجر به آسیب و از بین رفتن سلول‌های نرمال اطراف سلول‌های توموری می‌شود (2). گرچه امروز تلاش می‌شود از رهیافت ایمونوتراپی برای درمان سرطان کمک گرفته شود ولی این روش نیز بسیار پرهزینه بوده و تنها در تعداد معدودی از سرطان‌ها مورد تأیید FDA قرار گرفته است؛ بنابراین مطالعه و تلاش برای دستیابی به راه کارهای درمانی مؤثرتر و کم‌عارضه‌تر در سرطان، همواره از اولویت‌های تحقیقاتی محققین در سراسر جهان محسوب می‌شود. امروزه استفاده از پلاسمای اتمسفری سرد (Cold atmospheric plasma: CAP) موضوع بسیار بااهمیت و به نسبت جدیدی است که به‌سرعت در کاربردهای بیولوژیک و پزشکی مورد اقبال قرار گرفته است. پلاسما یک گاز یونیزه شده با یون، الکترون و ذرات بدون بار مانند اتم، مولکول و رادیکال‌ها است. دو نوع پلاسما وجود دارد: حرارتی و غیرحرارتی یا پلاسمای اتمسفری سرد. به‌طورمعمول هنگامی که ماده از جامد به مایع، گاز و به پلاسما تبدیل می‌شود درجه حرارتش افزایش می‌یابد (3). دمای پلاسما به وسیله جنبش‌های حرارتی الکترون‌ها و ذرات سنگین مانند اتم‌ها و یون‌ها تعیین می‌شود. در مورد پلاسمای حرارتی معمولی، هنگامی که تراکم ماده بالا است، برخورد شدید بین الکترون‌ها و ذرات سنگین رخ می‌دهد و تمام ذرات با تعادل حرارتی روبرو خواهند شد و بنابراین دما در این پلاسما به بیش از چند هزار درجه می‌رسد. این پلاسماها معمولاً تحت شرایط فشار اتمسفر استفاده می‌شوند، اما در پلاسمای اتمسفری سرد (CAP) تخلیه پلاسما در فشار اتمسفری سریع است و بنابراین در آن الکترون‌ها و ذرات سنگین در عدم تعادل حرارتی هستند. در این حالت، دمای اجزای سنگین بسیار پایین‌تر از دمای الکترون‌ها بوده و بین 25 تا 45 درجه سانتی‌گراد

می‌باشد (4). بسیاری از گونه‌های واکنش‌پذیر شامل رادیکال‌های مبتنی بر اکسیژن، رادیکال‌های مبتنی بر نیتروژن و سایر اجزا در CAP تولید می‌شوند (5-7). این شیمی پیچیده منجر به برهم‌کنش بی‌نظیری بین CAP و سیستم‌های بیولوژیکی از جمله سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود (8-10).

یکی از کاربردهای امیدوارکننده CAP استفاده از آن برای درمان سرطان است که تابش CAP با توجه به ویژگی‌های الکتروفیزیکی منبع (ولتاژ، توان، فرکانس، گاز حامل و محیط تأثیر، میزان تخلیه، فاصله الکترودها)، دوز تابش و نحوه مواجهه، اثرات متفاوتی بر تومور و سلول‌های طبیعی دارند (11). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی درباره اثر CAP بر جداسازی، زنده‌مانی و آپوپتوز انواع سلول‌های سرطانی توسط محققین مختلف انجام گرفته است. برای مثال مطالعه Stoffels و همکاران در سال 2006 بر فیبروبلاست‌های همستر چینی، سلول‌های عضلانی صاف رت، سلول‌های اندوتلیال گاو و سلول‌های سرطان ریه‌ی انسانی (12)، Yonson و همکاران در سال 2007 بر سرطان‌های هپاتوما و اندوتلیال عروقی انسان (13)، Fridman و همکاران در سال 2007 بر سلول‌های سرطان ملانوما‌ی انسانی (14)، Zhang و همکارانش در سال 2008 بر سلول‌های هپاتوما‌ی انسانی (15)، Kim و همکارانش در سال 2009 بر سلول‌های سرطان ملانوما‌ی انسانی (16) و در سال 2010 بر سرطان‌های پستان انسانی (17)، Ahn و همکارانش در سال 2011 بر رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم (18)، Yan و Barekzi در سال 2012 بر سرطان‌های لوکمی (19) و هپاتوما (20)، Arndt و همکارانش در سال 2013 بر سرطان ملانوما‌ی انسانی (21)، Weiss و همکارانش در سال 2015 بر سلول‌های سرطان پروستات (22)، Chen و همکاران در سال 2017 بر سرطان گلیوبلاستوما در هر دو شرایط کار بر موجودات زنده و شرایط آزمایشگاهی (22) و مطالعه Ban و همکاران در سال 2019 با اثر FE-DBD بر سلول‌های سرطان پستان (23) و مطالعه

علیمحمدی، گلپور و همکاران بر سرطان ملانوما در هر دو شرایط آزمایشگاهی و کار بر موجودات زنده (24) که نتیجه همه مطالعات مشابه و بیان کننده تأثیر سمیت CAP بر سلول‌های سرطانی می‌باشد. در این مطالعه به تأثیر سمیت سلولی CAP مبنی بر گاز آرگون بر رده‌های سرطانی و نرمال مختلف انسانی و موشی به صورت هم‌زمان در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعت پرداختیم.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی می‌باشد که در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است. تمامی مراحل آزمایش با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1397.1130).

کشت سلولی: رده‌های سلولی چند سرطان شایع و با کشندگی بالا شامل رده سرطانی ملانومای موشی B16-F10، رده سرطانی انسانی مربوط به سرطان پستان MCF-7، رده سلولی انسانی سرطان ریه A549 و همچنین سلول‌های رده نرمال انسانی Beas و رده نرمال فیروبلست موشی L929 از انستیتو پاستور تهران تهیه شد و در محیط کشت RPMI حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) و 1 درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت و نگهداری شدند. سپس سلول‌های هر رده در دمای 37 درجه سلسیوس و فشار 5 درصد دی‌اکسید کربن (CO2) و رطوبت کافی در فلاسک کشت سلولی 75 سانتی‌متر مکعبی نگهداری شدند. پس از رسیدن سلول‌های هر رده به 70 درصد رشد سلولی، توسط تریپسین - EDTA (اتیلن در آمین تترا استیک اسید) از کف فلاسک جدا و پس از جمع‌آوری در دور 1800rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل توسط یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل به حالت سوپانسیون تهیه گردید (25) و شمارش سلولی توسط لام نتوبار انجام شد.

سنجش سمیت سلولی با استفاده از MTT¹ به منظور بررسی سایتوتوکسیستی CAP بر روی رده‌های سلولی موردنظر، ابتدا تعداد 10000 سلول از هر رده در حجم 200 میکرو لیتر محیط کامل کشت سلولی در چاهک‌های مربوطه پلیت کشت سلولی 96 چاهکی استریل ته صاف، کشت شد. برای تمامی تیمارها، سلول‌ها به صورت سه تا پنج چاهکی هم‌تا کشت شدند. سپس پلیت‌های کشت داده شده به مدت 24 ساعت در انکوباتور حاوی 5 درصد CO2 انکوبه شدند تا سلول‌ها ضمن عادت کردن به شرایط جدید بتوانند رشد نمایند. برای هر رده سلولی نرمال و یا سرطانی، تیمارهای زیر انجام شد: گروه بدون درمان، تحت درمان با CAP به مدت 20 ثانیه، 30 ثانیه و گروه آخر به مدت 40 ثانیه تحت تابش قرار گرفتند. تابش CAP تحت ولتاژ 14/5 ولت منبع مولد ایجاد شد و دهانه تابش جت در فاصله 3 سانتی‌متر از پلیت تنظیم شد. ویژگی‌های فیزیکی منبع مولد پلاسما و همچنین نحوه تابش توسط محققین بهینه شده است که نتایج آن در مطالعات قبلی منتشر شده است (24، 26). برای هر رده سلولی، تعدادی از چاهک‌ها نیز به عنوان کنترل، تنها محیط کشت دریافت داشتند. سپس سلول‌ها در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعته در انکوباتور قرار گرفتند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، 20 میکرو لیتر از محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-tetrazolium bromide) (2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5mg/ml) به هر چاهک اضافه شد و به مدت 4 ساعت در شرایط قبل و تاریکی انکوبه شدند. سپس محیط کشت خارج شده و به هر چاهک 100 میکرو لیتر DMSO اضافه شد تا فورمازان ارغوانی رنگ نامحلول ناشی از تبدیل MTT در سلول‌های زنده را حل کند و در نهایت جذب نوری هر چاهک در طول موج 570 نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر اندازه گیری شد (25). نتایج حاصل از MTT به صورت درصد بقای سلولی

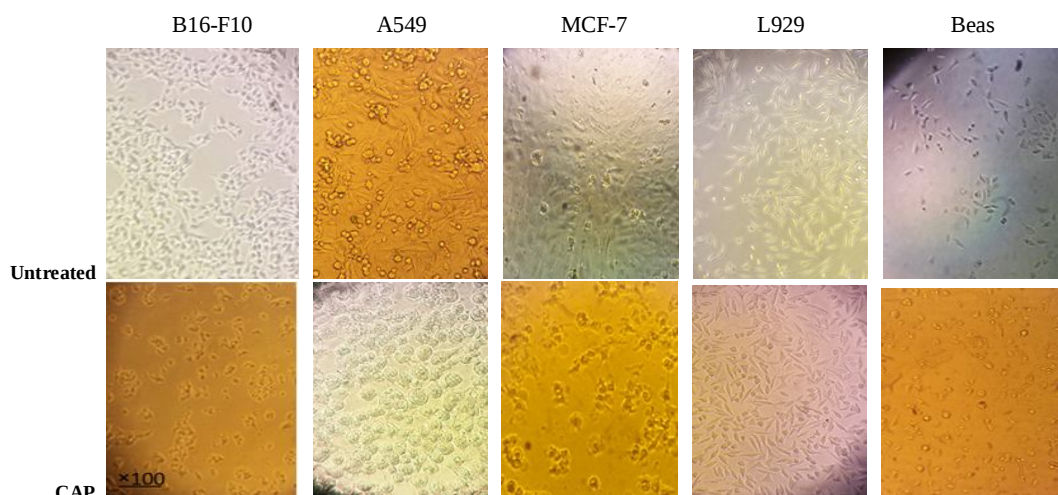
1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(برابر با تقسیم جذب نوری سلول تیمار شده با CAP بر جذب نوری کنترل و ضرب عدد حاصل در 100) و درصد سمیت سلولی (اختلاف 1 از درصد بقای سلولی) گزارش شد. برای ارزیابی تأثیر درمانی CAP روی سلول‌ها، میانگین درصد بقای سه بار تکرار هر سلول در حالت بدون تیمار و در وضعیت تحت تابش با CAP با هم مقایسه شد. سپس از آزمون‌های T student برای مقایسه بین دو وضعیت و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه بین رده‌های سلولی و زمان‌های مختلف تیمار استفاده شد. بدین منظور نمودارها با استفاده از داده‌های حاصل با نرم‌افزار Graphpadprism6.07 ترسیم شد (25).

یافته‌ها

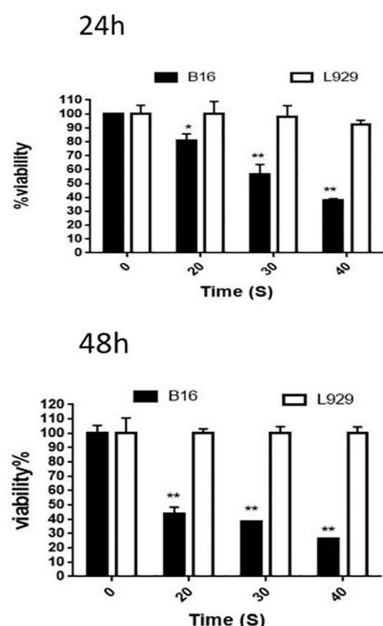
ارزیابی تأثیر CAP بر وضعیت مورفولوژیک و قابلیت چسبندگی سلول‌های رده سرطانی و سلول‌های نرمال به منظور ارزیابی تأثیر پلاسمای سرد اتمسفری (CAP) بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال، این سلول‌ها تحت تابش CAP تولیدشده در اثر گاز آرگون با خلوص 99/999 طی زمان‌های مختلف

20 ثانیه تا 40 ثانیه قرار گرفتند و وضعیت سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس MOTIC پس از 48 ساعت بررسی شد. همان‌طور که تصویر شماره 1 نشان می‌دهد سلول‌های سرطانی بعد از مواجهه با CAP به شدت دچار تغییرات مورفولوژیک شده، اتصال آن‌ها با کف چاهک سست شده و در نهایت از حالت چسبنده به حالت معلق درمی‌آیند. در بیش‌تر این سلول‌ها غشای سیتوپلاسمیک حالت چروکیده یافته و ظاهری شبیه جوانه زدن می‌یابد. همچنین هسته سلول‌ها ظاهری تکه‌تکه شده پیدا می‌کند که همگی نشانگر پیدایش روندهای آپوپتوتیک در این سلول‌ها است. این تغییرات در سلول‌های رده‌های سرطانی (ملانوما (B16-F10)، ریه (A549) و پستان (MCF-7) بیش‌تر از سلول‌های فیروپلاست طبیعی (L929) و حتی سلول‌های مهندسی‌شده Beas می‌باشد. تصویر شماره 1 وضعیت مورفولوژیک سلول‌ها با میکروسکوپ نوری قبل از تیمار و 48 ساعت پس از تیمار با CAP را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشخص است رده‌های سلولی سرطانی پس از تیمار با CAP دچار تغییرات مورفولوژی شدیدتری نسبت به سلول‌های نرمال شده‌اند.



تصویر شماره 1: تأثیر سایتوتوکسیک CAP بر روی مورفولوژی سلول‌های رده‌های سرطانی A549، MCF-7 و B16-F10 و سلول نرمال مهندسی‌شده Beas و سلول نرمال L929. تعداد 10000 سلول از هر رده در هر چاهک کشت داده شد سپس به مدت‌های 20، 30، 40 ثانیه در معرض CAP قرار گرفتند. 48 ساعت بعد وضعیت مورفولوژی سلول‌ها و قابلیت چسبندگی آن‌ها به کف چاهک‌های پلیت با میکروسکوپ معکوس بررسی شد این سلول‌ها به مدت 40 ثانیه در معرض CAP قرار گرفته بودند.

ثانیه در معرض CAP قرار گرفتند. 24 و 48 ساعت بعد وضعیت تکثیر و رشد سلول‌ها با آزمون MTT ارزیابی شد. * نشان‌دهنده سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 و ** سطح معنی‌داری کمتر از 0/001 را نشان می‌دهد. Error Bar ها بر اساس SD رسم شده‌اند.

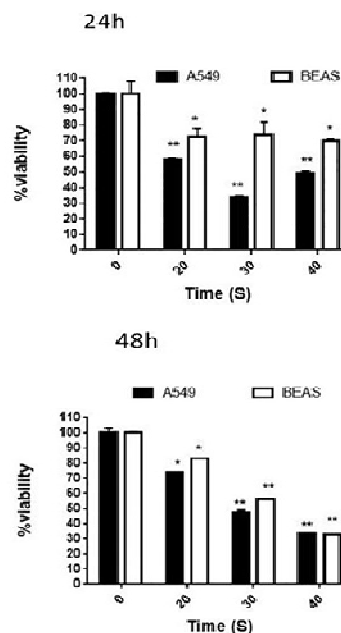


تصویر شماره 3: تأثیر سایتوتوکسیک CAP بر رده سلولی سرطانی MCF-7 و رده سلولی نرمال مهندسی شده Beas. تعداد 10000 سلول از هر رده در هر چاهک کشت داده شد سپس به مدت‌های 20، 30، 40 ثانیه در معرض CAP قرار گرفتند. 24 و 48 ساعت بعد وضعیت تکثیر و رشد سلول‌ها با آزمون MTT ارزیابی شد. * نشان‌دهنده سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 و ** سطح معنی‌داری کمتر از 0/001 را نشان می‌دهد. Error Bar ها بر اساس SD رسم شده‌اند.

همان‌طور که تصویر شماره 4 نشان می‌دهد اثر CAP در مورد سلول‌های ملانومایی B16-F10 به این صورت است که در زمان 40 ثانیه تابش CAP بیش‌ترین تأثیر ممانعت از رشد و القای کشندگی ظاهر می‌شود (98/37 درصد زنده‌مانی). در حالی که مواجهه با CAP طی زمان‌های مختلف هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری روی سلول‌های نرمال فیبروبلاستی L929 ندارد (2/92 درصد زنده‌مانی در زمان 40 ثانیه). هم‌چنین تأثیر CAP روی سلول‌های نرمال مهندسی شده Beas کم‌تر از سلول‌های سرطانی ولی بیش‌تر از سلول‌های نرمال طبیعی می‌باشد

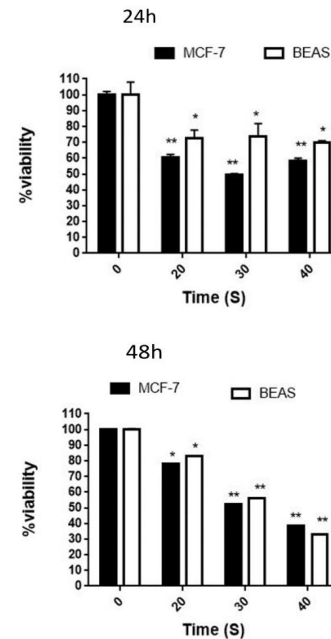
ارزیابی تأثیر انتخابی سایتوتوکسیک CAP بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال

برای ارزیابی کمی تأثیر تابش CAP مستقیم روی سلول‌های کشت‌شده در مقاطع زمانی مختلف از تست بررسی تکثیر سلولی استفاده شد. بدین منظور روند قدرت تکثیر سلول‌های رده‌های مختلف سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال (L929) و یا سلول‌های نرمال مهندسی شده (Beas) پس از تیمار با CAP به مدت 20، 30 و 40 ثانیه در دو مقطع زمانی 24 ساعت و 48 ساعت با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. همان‌طور که تصویر شماره 2 نشان می‌دهد میزان تأثیر CAP بر سلول‌های سرطانی A549 تا حدی وابسته به دوز تابش است، به‌طوری‌که تأثیر سایتوتوکسیسته CAP بعد از 24 ساعت بر سلول‌های A549 تا زمان 30 ثانیه تابش بشدت افزایش می‌یابد و درصد زنده‌مانی سلول‌های A549 بعد از 30 ثانیه تابش CAP تنها به 33/9 درصد رسید و بعد از این مدت مواجهه با CAP قابلیت زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 نیز به 49/5 درصد رسید (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 2: تأثیر سایتوتوکسیک CAP بر رده سلولی سرطانی A549 و رده سلولی نرمال مهندسی شده Beas. تعداد 10000 سلول از هر رده در هر چاهک کشت داده شد سپس به مدت‌های 20، 30، 40

(تصویر شماره 2 و 3) به طوری که 70 درصد این رده سلولی پس از زمان 40 ثانیه قابلیت تکثیر و تزايد داشته است.



تصویر شماره 4: تأثیر سایتوتوکسیک CAP بر رده سلولی سرطانی B16-F10 و رده نرمال فیروپلاستی L929. L929. تعداد 10000 سلول از هر رده در هر چاهک کشت داده شد سپس به مدت های 20، 30، 40 ثانیه در معرض CAP قرار گرفتند. 24 و 48 ساعت بعد وضعیت تکثیر و رشد سلولها با آزمون MTT ارزیابی شد. * نشان دهنده سطح معنی داری کم تر از 0/05 و ** سطح معنی داری کم تر از 0/001 را نشان می دهد.

همچنین برای ارزیابی مدت بقای اثر CAP بر سلولهای سرطانی و یا نرمال، در مرحله بعد، تأثیر 48 ساعته CAP نیز ارزیابی شد. روند تأثیر CAP روی سلولهای سرطانی 48 ساعت بعد از مواجهه، یک روند کاهشی منظم در رشد و تکثیر سلولی بود، به طوری که درصد زنده ماندنی سلولهای MCF-7 بعد از 40 ثانیه تابش CAP تنها به 38/5 درصد رسید، در حالی که بعد از این مدت مواجهه با CAP تنها 26/3 درصد سلولهای B16-F10 قابلیت تکثیر و رشد داشتند (نمودار شماره 3) و 73/7 درصد این سلولها دچار آپوپتوز شدند. در خصوص سلولهای سرطان ریه A549 نیز تنها 33/4

درصد از این سلولها بعد از 40 ثانیه مواجهه با CAP توانایی تکثیر داشتند (تصویر شماره 2) و لذا بیش از 66/6 درصد این سلولها به واسطه مرگ برنامه ریزی شده، از بین رفته اند. حال آن که این مدت مواجهه با CAP تأثیر شگرفی روی سلولهای طبیعی L929 نداشته است. با مقایسه این نمودارها در شرایط انکوباسیون 48 ساعت نسبت به 24 ساعت می توان دریافت که تأثیر سمیت CAP بر رده های سلولی سرطانی با افزایش مدت زمان تیمار از 24 ساعت به 48 ساعت افزایش می یابد.

بحث

مطالعه حاضر برای اولین بار تأثیر سایتوتوکسیکی CAP بر رده های سرطانی و نرمال مختلف انسانی و موشی را به صورت هم زمان در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعت پرداخته است. دستگاه CAP طراحی شده در این شکل قابلیت تولید هیدروکسیل واکنشی (OH) بیش تری نسبت به دستگاه های دیگر داشت. در این مطالعه مشخص شده است که CAP در مهار رشد و بقای سلولهای سرطانی تأثیر بسیار بیش تری نسبت به سلولهای نرمال دارد به طوری که پس از 30 ثانیه تابش CAP قابلیت زنده ماندنی سلولهای MCF-7 به 49/5 درصد رسید و بقای سلولهای A549 نیز به 33/9 درصد کاهش یافت. هم چنین 40 ثانیه تابش CAP باعث کاهش زنده ماندنی سلولهای B16-F10 سرطان ملانوما به کم تر از 40 درصد شد. قابل توجه است که این تأثیر سمیت با افزایش زمان تیمار از 24 به 48 ساعت افزایش می یابد، بنابراین در مقایسه با سایر داروهای ضد توموری مانند دی سولفیرام، مشتق انیدروبین و یا ایزوفلاون جینیستین که معمولاً حداکثر حدود 30 درصد سلولها را دچار آپوپتوز می کنند، کارایی بسیار بالاتری دارد (12، 19-21). به علاوه در همان بازه زمانی و حتی مدت زمان بیش تر تیمار CAP بر سلولهای نرمال تأثیر سمیت بسیار کم تری را داشته است، بنابراین سمیت CAP انتخاب پذیری بسیار بالایی دارد. مکانیسم مولکولی تأثیر CAP

بر سلول‌های سرطانی کاملاً ناشناخته است، اما طبق تحقیقات انجام شده تیمار با CAP باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در داخل سلول می‌شود که افزایش ROS سیستم آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی را ضعیف کرده و نیز باعث می‌شود که جهش شکست‌های دو رشته‌ای DNA رخ دهد. در نهایت چرخه سلولی مهار می‌شود و آپوپتوز در سلول‌ها رخ می‌دهد (27,3). در سال‌های گذشته مطالعات متعددی مبنی بر تاثیر CAP بر رده‌های سلولی مورد بررسی ما انجام گرفته است. برای مثال مطالعه جلیلی و همکارانش (2016) بر اثر CAP بر رده سلولی MCF-7 و مقایسه آن با رده سلولی نرمال انسانی (HFF) (28)، مطالعه Park و همکارانش (2015) بر رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 سرطان پستان (29) و مطالعه Kim و همکارانش بر رده‌های سلولی A549 و نرمال انسانی در سال 2016 (17) و مطالعه Huang و همکارانش در سال 2011 بر رده سلولی A549 سرطان (30) انجام شد که نتایج آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر مشابه بوده است. با این وجود در مطالعه حاضر میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها در اثر تیمار CAP نسبت به مطالعات گذشته کاهش داشته است. هم چنین تحقیقات بسیاری ثابت کرد که CAP به صورت انتخابی، تنها بر مرگ سلول‌های سرطانی و نه سلول‌های سالم تأثیر می‌گذارد. برای مثال می‌توان مطالعه Georgescu و Zirnheld و همکاران در سال 2010 بر سرطان‌های کلون، ملانوما و سلول‌های ماکروفاژ (31) و بر سلول‌های سرطان ملانوما انسانی و سلول‌های کراتونوسیت اولیه (32)، Zucker و همکاران در سال 2012 بر سلول‌های ملانوما انسانی (33) و مطالعه Kim و همکاران در سال 2016 بر رده سلولی سرطانی پروستات انسان و سلول‌های نرمال (17) و مطالعه Chen و همکاران در سال 2018 با مقایسه اثر CAP بر سلول‌های سرطانی پانکراس و سلول‌های اپی تلیال نرمال (34) را نام برد که نتایج همه آن‌ها تقریباً مشابه بوده و تأیید کننده نتایج این مطالعه نیز می‌باشند. چنین اثر انتخابی ممکن است به دلیل افزایش قابل توجه ROS در

سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال تحت تیمار مشابه با CAP باشد (27,21). برای توضیح روند مشاهده شده، دو مدل پیشنهاد شده وجود دارد. مدل اول بیان می‌کند که این اختلاف تفاوت افزایش میزان ROS در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال به دلیل تفاوت در سطح اولیه ROS در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال است (36,35,10). با توجه به متابولیسم قوی‌تر در سلول‌های سرطانی، سطح پایه ROS در سلول‌های سرطانی بیش تر از سلول‌های طبیعی است و هنگامی که استرس ROS اضافی در اثر CAP به سلول‌ها اعمال می‌شود کل ROS داخل سلولی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال به حد آستانه می‌رسند. در نتیجه، سلول‌های سرطانی آپوپتوز بیش تری را نسبت به سلول‌های طبیعی تجربه می‌کنند (37-40,10). مدل دیگر توضیح می‌دهد که بیش تر سلول‌های سرطانی تمایل دارند کانال‌های آکوپورین بیش تری را در غشای سیتوپلاسمی خود نسبت به سلول‌های نرمال بیان کنند. این کانال‌ها وارد کننده ROS ایجاد شده توسط CAP به داخل سلول هستند. بنابراین پس از تیمار CAP، ROS ناشی از CAP به طور قابل توجهی سریع تر از سلول‌های طبیعی همولوگ به سلول‌های سرطانی انتشار یافته و بنابراین باعث افزایش قابل توجهی از ROS در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی می‌شود (41-43,39). بنابراین طبق مطالعه حاضر و مطالعات پیشین می‌توان از پلاسمای اتمسفری سرد به علت تأثیر سمیت فوق العاده بر سلول‌های سرطانی و نیز انتخاب پذیری بالای آن برای درمان سرطان استفاده کرد. با این وجود درک مکانیسم‌های مولکولی سمیت CAP بر سلول‌ها و توانایی انتخاب پذیری آن نیاز به مطالعات بیش تری دارد.

سپاسگزاری

لازم است از کمک‌های آقای دکتر فرشاد صحبت‌زاده استاد محترم فیزیک پلاسما در دانشگاه

کشت سلولی تشکر می شود. این پژوهش بخشی از پایان نامه خانم زهرا یزدانی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی می باشد.

مازندران و خانم نیاز هادوی جهت در اختیار گذاشتن دستگاه CAP تشکر و قدردانی گردد. همچنین از آقای مصطفی کاردان جهت کمک در انجام آزمایشات

References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144(8): 1941-1953.
2. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 2012; 2: 636.
3. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8(9): 15977-15995.
4. Lee HJ, Shon CH, Kim YS, Kim S, Kim GC, Kong MG. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New J Phys* 2009; 11(11): 115026.
5. Cheng X, Sherman J, Murphy W, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. The effect of tuning cold plasma composition on glioblastoma cell viability. *PloS one* 2014; 9(5): e98652.
6. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one* 2011; 6(1): e16270.
7. Laroussi M, Akan T. Arc free atmospheric pressure cold plasma jets: a review. *Plasma Process Polym* 2007; 4(9): 777-788.
8. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 2008; 5(6): 503-533.
9. Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Transact Plasma Sci* 2009; 37(6): 714-725.
10. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys D Appl Phys* 2012; 45(26): 263001.
11. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol* 2013; 22(4): 284-289.
12. Stoffels E, Kieft E, Sladek RE, Van den Bedem LJ, Van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Sourc Sci Tech* 2006; 15(4): S169.
13. Yonson S, Coulombe S, Leveille V, Leask R. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *J Phys D Appl Phys* 2006; 39(16): 350-1315.
14. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007; 27(2): 163-176.
15. 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.
16. Kim GC, Lee HJ, Shon CH. The effects of a micro plasma on melanoma (G361) cancer cells. *J Korean Phys Soc* 2009; 54(2): 628.

17. Kim SJ, Chung T. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep* 2016; 6: 20332.
18. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS, Lee JS. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PloS one* 2011; 6(11): e28154.
19. Barekzi N, Laroussi M. Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. *J Phys D Appl Phys* 2012; 45(42): 422002.
20. 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.
21. 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.
22. Chen Z, Simonyan H, Cheng X, Gjika E, Lin L, Canady J, et al. A novel micro cold atmospheric plasma device for glioblastoma both in vitro and in vivo. *Cancers (Basel)* 2017; 9(6): E61.
23. Ban A, Ahmed MA, Murbat Hamid H. Cold Atmospheric Plasma generated by FE-DBD Scheme cytotoxicity against Breast Cancer cells. *Res J Biotech* 2019; 14(1): 192-195.
24. Alimohammadi M, Golpur M, Sohbatazadeh F, Hadavi S. Cold Atmospheric Plasma Is a Potent Tool to Improve Chemotherapy in Melanoma In Vitro and In Vivo. *Biomolecules* 2020. 10(7): 1011.
25. 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 Pac J Trop Biomed* 2019; 9(8): 353-358.
26. Rafiei A, Sohbatazadeh F, Hadavi S, Bekeschus S, Alimohammadi M, Valadana R. Inhibition of murine melanoma tumor growth in vitro and in vivo using an argon-based plasma jet. *Clin Plasma Med* 2020; 19-20: 100102.
27. Graves DB. Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for cancer therapy. *Plasma Process Polym* 2014; 11(12): 1120-1127.
28. Jalili A, Irani S, Mirfakhraie R. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study. *OncoTargets Ther* 2016; 9: 5911-5917.
29. Park SB, 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.
30. Huang J, Li H, Chen W, Lv GH, Wang XQ, Zhang GP, et al. Dielectric barrier discharge plasma in Ar/O₂ promoting apoptosis behavior in A549 cancer cells. *Appl Phys Lett* 2011; 99(25): 253701.
31. Georgescu N, Lupu AR. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. *IEEE Trans Plasma Sci* 2010; 38(8): 1949-1955.
32. Zirnheld JL, Zucker SN, DiSanto TM, Berezney R, Etemadi K. Nonthermal plasma needle: development and targeting of melanoma cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 2010; 38(4): 948-952.
33. Zucker SN, Zirnheld J, Bagati A, DiSanto TM, Des Soye B, Wawrzyniak JA, et al.

- Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch. *Cancer Biol Ther* 2012; 13(13): 1299-1306.
34. Chen Z, Lin L, Gjika E, Cheng X, Canady J, Keidar M. Selective treatment of pancreatic cancer cells by plasma-activated saline solutions. *IEEE Radiation Plasma Med Sciences* 2017; 2(2): 116-120.
 35. Keidar M, Beilis I. Plasma engineering: applications from aerospace to bio and nanotechnology. United States: Academic Press; 2013.
 36. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(7): 579-591.
 37. 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.
 38. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85-95.
 39. 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.
 40. 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.
 41. Almasalmeh A, Krenc D, Wu B, Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS J* 2014; 281(3): 647-656.
 42. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(36): 15681-15686.
 43. Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848(10): 2576-2583.