

بررسی اثر محیط فعال شده توسط پلاسما بر زیست‌پذیری رده‌های سلولی سرطان سینه (MDA-MB-231) و دهانه‌ی رحم (Hela)

محیا امین رعیای جزه^۱، محمد رضا خانی^۲، بابک شکری^۳، حسن نیک‌نژاد^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پلاسما به دو روش مستقیم و غیر مستقیم برای درمان سلول‌های سرطانی به کار می‌رود. درمان مستقیم سلول‌ها با بافت‌ها از طریق تابش مستقیم پلاسما صورت می‌گیرد، اما روش غیر مستقیم درمان توسط محیط فعال شده با تابش پلاسما برای از بین بردن سلول‌های سرطانی اسفاده می‌شود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ابتدا شاخص‌های پلاسما مانند گونه‌های فعال و دما ارزیابی گردید و سپس اثرات محیط فعال شده توسط پلاسما با زمان‌های پردازش مختلف و ترکیب‌های گازی هلیوم و هلیوم + ۵/۰ درصد اکسیژن بر روی دو رده‌ی سلولی MDA-MB-231 و Hela به ترتیب مربوط به سرطان سینه و دهانه‌ی رحم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر انتخابی پلاسما، این روش بر روی سلول‌های نرمال فیبروبلاست نیز آزمایش شد. آنالیزهای به کار رفته شامل طیف‌سنجی گسیل نوری (Optical emission spectrometry یا OES) و تست MTT بود.

یافته‌ها: فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری نمونه و نازل جت پلاسما و ولتاژ کاری ۵ کیلوولت جت پلاسما، حالت بهینه برای انجام آزمایش‌ها بود. همچنین، افزایش زمان پردازش محیط و زمان بین درمان و آنالیز، موجب کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی شد. محیط فعال شده توسط پلاسما، زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال، به میزان بیشتری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: محیط فعال شده توسط پلاسما، از روش‌های جدید و چالش‌برانگیزی است که اثرات سمی انتخابی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد. استفاده از این محیط، روش‌های استفاده از پلاسما سرد اتمسفری را برای درمان سرطان، به عنوان ابزاری جهت شیمی درمانی گسترش داده است.

واژگان کلیدی: گونه‌های فعال، رده‌ی سلولی، زیست‌پذیری، طیف‌سنجی

ارجاع: امین رعیای جزه محیا، خانی محمد رضا، شکری بابک، نیک‌نژاد حسن. بررسی اثر محیط فعال شده توسط پلاسما بر زیست‌پذیری رده‌های سلولی سرطان سینه (MDA-MB-231) و دهانه‌ی رحم (Hela). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۶): ۴۹۳-۴۹۹

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده‌ی زندگی انسان و دومین عامل مرگ و میر در جهان می‌باشد (۱). تخمین زده می‌شود که بروز سرطان در سال ۱۳۹۹ در ایران به حدود ۸۶ هزار مورد در کل جمعیت و میزان مرگ و میر ناشی از آن به حدود ۶۳ هزار مورد خواهد رسید (۲-۳).

در حال حاضر با توجه به درمان‌های معمول و عوارض جانبی آن‌ها، نیاز به روش جدیدی برای درمان سرطان به منظور بهبود بقا و

کاهش عوارض جانبی احساس می‌شود و تلاش‌هایی در این زمینه در حال انجام است (۴-۵).

پلاسما سرد یکی از روش‌های جدید برای درمان سرطان می‌باشد و از اجزای متعددی مانند الکترون‌ها، یون‌ها، رادیکال‌های آزاد، فوتون‌ها، گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive oxygen species) یا ROS) و گونه‌های فعال نیتروژنی (Reactive nitrogen species) یا RNS) تشکیل شده است (۶). درک انحلال گونه‌های پلاسما در محلول‌های آبی هنوز واضح نیست، اما دو روند مشاهده شده است.

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

۲- استادیار، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

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

نویسنده‌ی مسؤول: بابک شکری

طیف‌سنجی و اندازه‌گیری دما: یک تکنیک مناسب برای اندازه‌گیری و بررسی خواص مختلف جت پلاسما در یک روش غیر مخرب، استفاده از آنالیز طیف‌سنجی گسیل نوری (Optical emission spectrometry یا OES) است. سیستم OES دارای محدوده‌ی فرکانسی ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر و توان تفکیک ۰/۶-۰/۷ نانومتر (AvaSpec-3648-USB2, Avantes, هلند) می‌باشد. در تحقیق حاضر، میزان هلیوم-اکسیژن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، گونه‌های فعال پلاسمای هلیوم در فواصل و ولتاژهای مختلف با استفاده از OES بررسی گردید. دمای محیط کشت نیز در پلیت ۹۶ خانه‌ای پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم و هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن به وسیله‌ی دوربین حرارتی (مدل FLIR E4، شرکت FLIR، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

کشت سلول و تست 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

MTT diphenyl tetrazolium bromide: سلول‌های سرطانی Hela، MDA-MB-231 و سلول‌های نرمال فیبروبلاست از بانک سلولی انسیتوپاستور ایران خریداری شد و در محیط‌های کشت RPMI Roswell Park Memorial Institute (RPMI) حاوی Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های Streptomycin و Penicillin در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند و $10^4 \times 1$ سلول به هر خانه‌ی پلیت ۹۶ خانه‌ای (۲۲-۲۰) جهت تیمار انتقال داده شد.

در روش محیط فعال شده توسط پلاسما، ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به ۶ چاهک از پلیت ۱۲ خانه‌ای منتقل شد. چاهک‌ها به مدت ۵-۱ دقیقه مورد تابش پلاسمای سرد در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری از نازل قرار گرفتند. سپس محیط روی سلول‌ها خارج گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط پردازش شده به وسیله‌ی پلاسمای سرد، جایگزین محیط قبلی شد. همچنین، در هر گروه آزمایشی یک گروه شاهد که در آن محیط کشت جایگزین شده هیچ تابش پلاسمایی دریافت نکرده بود، هم قرار داده شد. هر گروه به منظور تحلیل آماری دقیق‌تر شامل ۳ تکرار بود. در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از جایگزینی محیط‌های کشت روی سلول‌ها با محیط کشت فعال شده توسط پلاسما، تست MTT انجام گرفت (۲۴-۲۳).

داده‌های به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. هر آزمون بر روی ۵ نمونه‌ی مستقل و هر بار با ۳ مرتبه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

اول این که اغلب اجزای محیط به ویژه اسیدهای آمینه‌ی محلول در محیط (۷) و موجود در پروتئین‌ها (۸) پس از پردازش با پلاسما تغییر می‌یابند. دوم این که چندین ROS مانند H_2O_2 (۹) و RNS (۱۰، ۸) به طور گسترده در محیط فعال شده توسط پلاسما شناسایی شده‌اند.

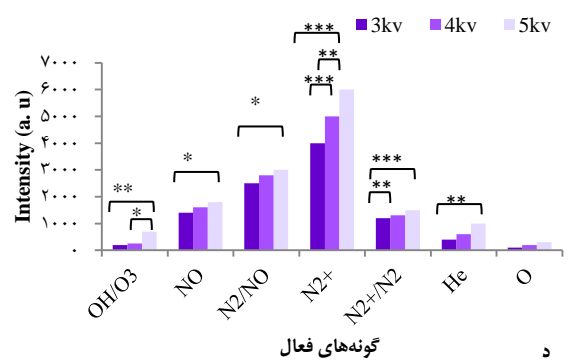
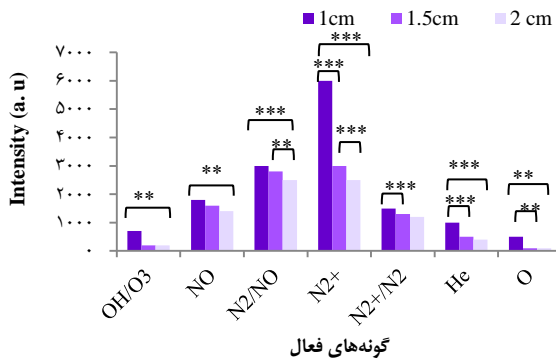
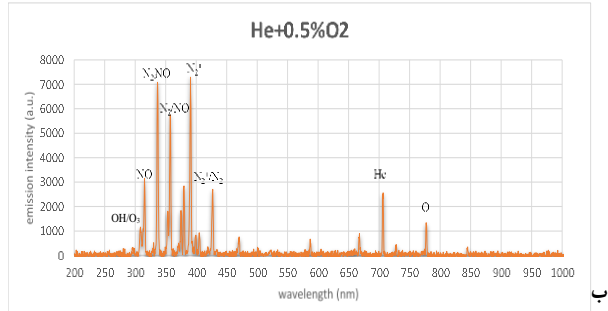
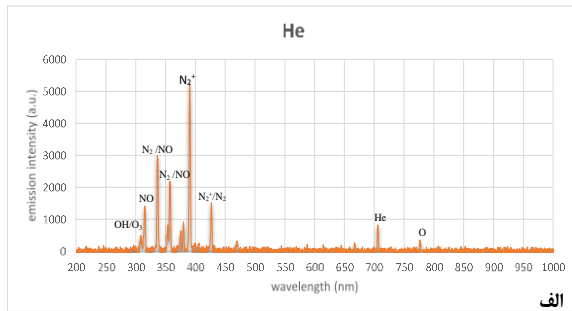
در پژوهش حاضر، گونه‌های فعال تولید شده توسط پلاسما و اثرات محیط فعال شده توسط پلاسما در زمان‌های مختلف و ترکیب گازی هلیوم و هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن بر روی دو رده‌ی سلولی Hela مربوط به سرطان دهانه‌ی رحم و MDA-MB-231 مربوط به سرطان سینه بررسی گردید. همچنین، اثر پلاسما بر روی رده‌ی سلولی نرمال فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

پلاسما جت: دستگاه‌های پلاسمای سرد اتمسفری شامل پلاسما جت (۱۱) و تخلیه‌ی سد دی‌الکترونیک با الکتروود شناور (Floating Electrode-Dielectric Barrier Discharge یا FE-DBD) (۱۲) می‌باشد که به طور گسترده در پلاسمای پزشکی استفاده می‌شوند (۱۴-۱۳). FE-DBD تمایل به تولید پلاسمای کوتاه و پهن دارد. علاوه بر این، وظیفه‌ی نمونه‌ها در دو نوع دستگاه متفاوت است. در پلاسما جت نمونه تنها توسط پلاسما جت تحت پردازش قرار می‌گیرد (۱۶-۱۵)، اما در دستگاه FE-DBD، نمونه قسمتی از فرایند تخلیه می‌باشد (۱۹-۱۷). اگر نمونه در پلاسمای سرد اتمسفری در FE-DBD به اندازه‌ی کافی به الکتروود دوم نزدیک نباشد، شکل نمی‌گیرد. بر اساس این خواص و ویژگی‌ها، پلاسما جت برای پردازش یک منطقه‌ی کوچک در نمونه مناسب است. در مقابل، ممکن است FE-DBD برای درمان شدید یک منطقه‌ی بزرگ مناسب باشد.

در مطالعه‌ی تجربی حاضر با توجه به مطالب بیان شده و سطح کم نمونه، از پلاسما جت طراحی و ساخته شده در پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسمای دانشگاه شهید بهشتی استفاده شد. این دستگاه شامل لوله و حلقه‌ی مسی به عنوان الکتروود بود که به منبع تغذیه‌ی ولتاژ بالا متصل شده بود. فرکانس ۲۵ کیلوهرتز به عنوان فرکانس بهینه و کاری در نظر گرفته شد.

هلیوم خالص و هلیوم-اکسیژن نیز به عنوان گاز کاری انتخاب گردید. یک بار از گاز هلیوم با فلوی ۴ لیتر بر دقیقه استاندارد (Standard liter per minute یا SLM) و بار دیگر از ترکیب گازی هلیوم و ۰/۵ درصد اکسیژن که معادل ۲۰ سانتی‌متر مکعب بر دقیقه استاندارد (standard cubic centimeter per minute یا SCCM) می‌باشد، استفاده شد.



شکل ۱. طیف ثبت شده از پلاسمای هلیوم (الف)، طیف ثبت شده از پلاسمای هلیوم و ۰/۵ درصد اکسیژن (ب)، تأثیر فاصله از رآکتور بر تولید گونه‌های فعال (ج) و تأثیر ولتاژ بر تولید گونه‌های فعال (د)
 $P < 0.001^{***}, P < 0.01^{**}, P < 0.05^{*}$

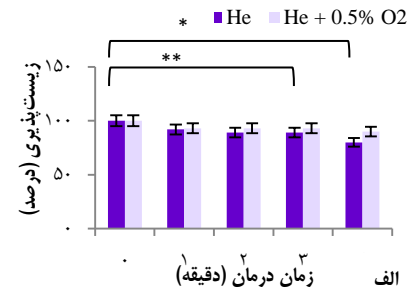
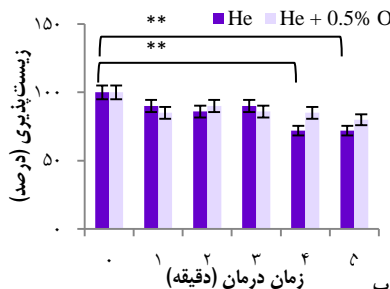
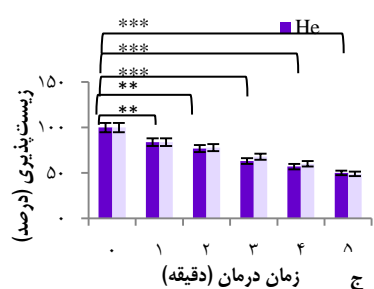
پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم و هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن، با استفاده از دوربین مادون قرمز اندازه‌گیری شد. دمای محیط کشت قبل از تابش پلازما 0.12 ± 20.66 درجه‌ی سانتی‌گراد بود و پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم به 0.11 ± 21.30 درجه‌ی سانتی‌گراد رسید و پس از ۵ دقیقه تابش پلاسمای هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن به 0.08 ± 21.80 درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت.

تأثیر روش محیط فعال شده توسط پلازما بر روی سلول‌های MDA-MB-231 یافته‌ها نشان داد که جایگزینی محیط فعال شده توسط پلازما با محیط قبلی، باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها شد که بیشترین کاهش پس از ۴۸ ساعت از زمان پردازش سلول‌ها توسط محیط فعال شده با ۵ دقیقه تابش پلازما، حدود ۵۰ درصد بود (شکل ۲).

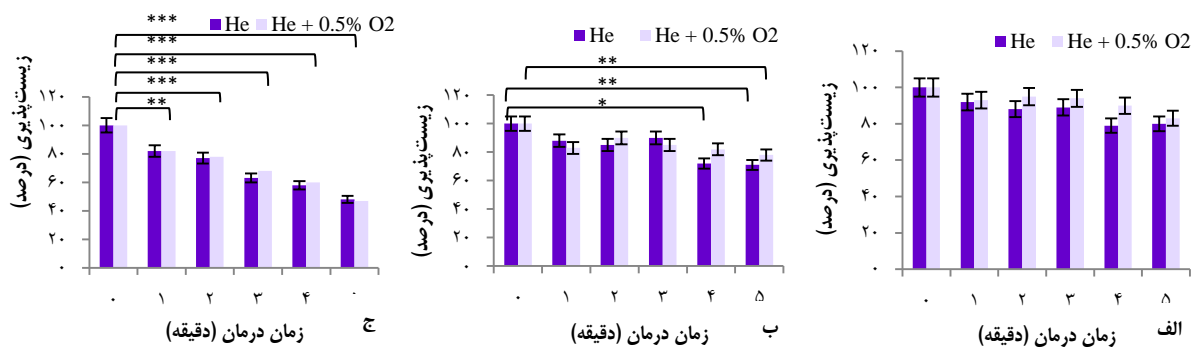
یافته‌ها

نتایج طیف‌سنجی: طیف پلازما جت هلیوم در فلوی ۴SLM و در فاصله‌ی ۱ سانتی‌متری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱، الف). طیف پلاسمای هلیوم و ۰/۵ درصد اکسیژن نیز با فلوی ۴SLM هلیوم و ۲۰SCCM اکسیژن و در همان فاصله ثبت شد (شکل ۱، ب). همچنین، وجود ROS و RNS با استفاده از طیف‌سنجی مورد تأیید قرار گرفت. سپس تأثیر عوامل مختلف از جمله فاصله از رآکتور و ولتاژ کاری بر روی مقدار گونه‌های فعال تولیدی بررسی گردید (شکل ۱، ج و د).

تأثیر دما: به دلیل اهمیت اثر حرارتی تابش مستقیم پلازما بر روی سلول‌ها، دمای محیط کشت در چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای قبل و



شکل ۲. زیست‌پذیری سلول‌های MDA-MB-231 صفر ساعت پس از درمان (الف)، ۲۴ ساعت پس از درمان (ب) و ۴۸ ساعت پس از درمان (ج)
 $P < 0.001^{***}, P < 0.01^{**}, P < 0.05^{*}$



شکل ۳. زیست‌پذیری سلول‌های *Hela* صفر ساعت پس از درمان (الف)، ۲۴ ساعت پس از درمان (ب) و ۴۸ ساعت پس از درمان (ج)

$P < 0.001^{***}$, $P < 0.01^{**}$, $P < 0.05^{*}$

نتایج پژوهش Utsumi و همکاران نشان داد که محیط فعال شده توسط پلاسما سرد اتمسفری، اثر ضد توموری در سلول‌های مقاوم به شیمی درمانی سرطان تخمدان در محیط‌های برون‌تن و درون‌تن دارد (۲۵). Judee و همکاران در مطالعه‌ی خود، اثر پلاسما سرد اتمسفری غیر مستقیم را بر روی تومور چند سلولی کروی HCT116 مربوط به سرطان روده‌ی بزرگ بررسی کردند. آن‌ها تومور چند سلولی را به محیط فعال شده توسط پلاسما برای زمان‌های مختلف تا ۴۸ ساعت انتقال دادند و مهار رشد تومور و آسیب DNA را مشاهده نمودند. همچنین، به این نتیجه رسیدند که H_2O_2 نقش مهمی در آسیب DNA ایفا می‌کند (۲۶).

در تحقیق حاضر پس از بررسی نتایج OES، پتانسیل ضد سرطانی محیط فعال شده توسط پلاسما بر روی دو رده‌ی سلولی MDA-MB-231 و *Hela* بررسی شد و نتایج مشخص کرد (شکل ۱، ج) که افزایش فاصله از رآکتور به دلیل این که فرایند باز ترکیب بر فرایندهای یونش و برانگیختگی غلبه دارد، باعث کاهش گونه‌های فعال می‌شود (۲۷) و افزایش ولتاژ نیز متناظر با افزایش تولید گونه‌های فعال است؛ چرا که هرچه ولتاژ بالاتر باشد، انرژی ذرات و نرخ یونش بیشتر می‌شود و در نتیجه، گونه‌های فعال بیشتری تولید می‌گردد (شکل ۱، د) (۲۷). از این رو، فاصله‌ی نازل پلاسما جت از نمونه روی ۱ سانتی‌متر و ولتاژ روی ۵ کیلوولت تنظیم شد. آن‌جا که افزودن ۰/۵ درصد اکسیژن موجب افزایش ROS می‌شود (شکل ۱، الف و ب)، اثرات پلاسما هلیوم + ۰/۵ درصد اکسیژن نیز علاوه بر پلاسما هلیوم بررسی شد.

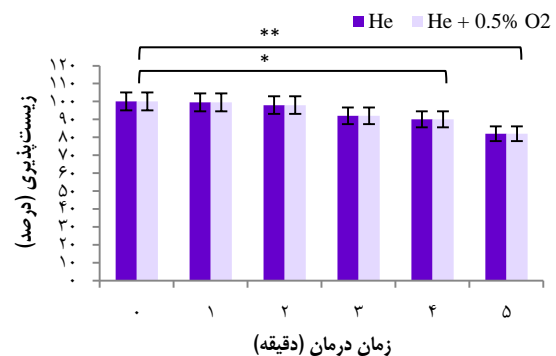
برخورد پلاسما به مایعات، یکی از موضوعات مورد علاقه در زمینه‌ی پلاسما پزشکی است. گونه‌های تولید شده در محیط کشت توسط پلاسما سرد، باعث فعال شدن محیط و ایجاد خاصیت ضد سرطانی در آن می‌شود. محیط فعال شده توسط پلاسما سرد به دلیل

تأثیر محیط فعال شده توسط پلاسما روی سلول‌های سرطانی

Hela به کارگیری محیط فعال شده توسط پلاسما روی سلول‌های *Hela* نیز نشان داد که جایگزینی محیط فعال شده با پلاسما با گذشت زمان، منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها می‌شود و در بهترین حالت، محیط فعال شده با ۵ دقیقه تابش پلاسما بعد از ۴۸ ساعت توانست حدود ۵۰ درصد زیست‌پذیری سلول‌ها را کاهش دهد (شکل ۳).

تأثیر محیط فعال شده توسط پلاسما روی سلول‌های نرمال

فیروپلاست: به کارگیری محیط فعال شده توسط پلاسما روی سلول‌های نرمال فیروپلاست نشان داد که جایگزینی محیط فعال شده با پلاسما با گذشت زمان، منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها می‌شود، اما این میزان به مراتب کمتر از کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 و *Hela* می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴. زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیروپلاست ۴۸ ساعت پس از درمان

$P < 0.001^{***}$, $P < 0.05^{*}$

بحث

در سال‌های اخیر تحقیقات مختلفی در زمینه‌ی ظرفیت ضد سرطانی محیط فعال شده توسط پلاسما سرد اتمسفری صورت گرفته است.

بالتر از سلول‌های نرمال است (۳۰). هنگامی که استرس ROS اضافی توسط پلاسما روی سلول‌ها اعمال می‌شود، ROS در سلول‌های سرطانی بسیار راحت‌تر نسبت به سلول‌های نرمال از مرز عبور می‌کند (۲۹). در نتیجه، سلول‌های سرطانی مرگ بیشتری را نسبت به سلول‌های نرمال پس از درمان با پلاسما تجربه می‌کنند.

محیط فعال شده توسط پلاسما، در زمینه‌ی پزشکی پتانسیل ضد سرطانی خوبی نشان داده، اما هنوز مکانیسم دقیق عملکرد آن به دلیل ترکیب پیچیده‌ی پلاسما شناخته شده نیست. بنابراین، نیاز به شناخت بیشتر نحوه‌ی عملکرد پلاسما و تقابل آن با سیستم‌های بیولوژیکی احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه شهید بهشتی می‌باشد. بدین وسیله از راهنمایی‌های خانم دکتر شراره شریفی و همکاری خانم‌ها طاهره طیبی و آمنه آرمند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. لازم به ذکر است که پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (شماره‌ی گرنت ۸۴۱۶) انجام گرفت.

خاصیت ضد سرطانی، امکان ذخیره‌سازی، به کارگیری آسان در صورت عدم وجود دستگاه و همچنین، تزریق به بافت‌هایی که قابلیت قرارگیری در معرض تابش مستقیم را ندارند، مورد توجه قرار گرفته است (۲۵).

نتایج استفاده از محیط فعال شده توسط پلاسما روی رده‌های سلولی MDA-MB-231 و Hela نشان داد که افزایش زمان تابش به محیط مورد نظر، موجب افزایش مرگ سلول‌ها می‌شود و با افزایش زمان میان انتقال محیط فعال شده توسط پلاسما و آنالیز، میزان مرگ سلول‌ها افزایش می‌یابد (شکل‌های ۲ و ۳). همچنین، کاهش زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیروبلاست در این روش، به مراتب کمتر از کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی مذکور می‌باشد. این اثر ضد سرطانی انتخابی (شکل ۴) ممکن است به دلیل مشاهده‌ی گسترده‌ی افزایش قابل توجه ROS به طور انتخابی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم در شرایط دریافت مشابه پلاسمای سرد باشد (۲۸).



برای توضیح این مسأله می‌توان بیان کرد که افزایش متفاوت ROS در بافت‌های سرطانی و سالم، به سطوح ROS داخل سلولی متفاوت بین این دو نوع سلول بستگی دارد (۲۹). به دلیل متابولیسم قوی سلول‌های سرطانی، سطح پایه‌ی ROS در سلول‌های سرطانی

References

- Zaorsky NG, Churilla TM, Egleston BL, Fisher SG, Ridge JA, Horwitz EM, et al. Causes of death among cancer patients. *Ann Oncol* 2017; 28(2): 400-7.
- Abdollahzadeh R, Moodi M, Khanjani N. Investigating the mental experience of patients suffering from cancer. *Jundishapur J Chronic Dis Care* 2017; 6(3): e57685.
- Shadmani M, Nassiri Koopaei N, Shirzad Yazdi N, Azizian H, Mousavi Z, Salimi M, et al. Anti-proliferative effects of new synthesized hydrazone derivatives on breast, colon and hepatic cancer cells. *Koomesh* 2018; 20(4): 725-30. [In Persian].
- Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. *Cell Tissue Res* 2016; 363(3): 599-608.
- Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypotheses* 2014; 82(4): 488-9.
- 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.
- Takai E, Kitamura T, Kuwabara J, Ikawa S, Yoshizawa S, Shiraki K, et al. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution. *J Phys D Appl Phys* 2014; 47(28): 285403.
- Yan D, Sherman JH, Cheng X, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Appl Phys Lett* 2014; 105(22): 224101.
- Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J, et al. Principles of using cold atmospheric plasma stimulated media for cancer treatment. *Sci Rep* 2015; 5: 18339.
- Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I, Clupek M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sourc Sci Tech* 2014; 23(1): 015019.
- Laroussi M, Akan T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review. *Plasma Processes Polym* 2007; 4(9): 777-88.
- Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem Plasma P* 2003; 23(1): 1-46.
- Kim JY, Kim SO, Wei Y, Li J. A flexible cold microplasma jet using biocompatible dielectric tubes for cancer therapy. *Appl Phys Lett* 2010; 96(20): 203701.
- Kaushik NK, Uhm H, Ha Choi E. Micronucleus formation induced by dielectric barrier discharge plasma exposure in brain cancer cells. *Appl Phys Lett* 2012; 100(8): 084102.

15. Ja Kim S, Min Joh H, Chung TH. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Appl Phys Lett* 2013; 103(15): 153705.
16. 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.
17. Kim GJ, Kim W, Kim KT, Lee JK. DNA damage and mitochondria dysfunction in cell apoptosis induced by nonthermal air plasma. *Appl Phys Lett* 2010; 96(2): 021502.
18. Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, et al. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma Medicine* 2011; 1(1): 27.
19. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *J R Soc Interface* 2012; 9(66): 147-57.
20. Simsek E, Imir N, Aydemir EA, Gokturk RS, Yesilada E, Fiskin K. Caspase-mediated apoptotic effects of *ebenus boissieri barbey* extracts on human cervical cancer cell line HeLa. *Pharmacogn Mag* 2017; 13(50): 254-9.
21. Kong JN, He Q, Wang G, Dasgupta S, Dinkins MB, Zhu G, et al. Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells. *Int J Cancer* 2015; 137(7): 1610-20.
22. Santhanam RK, Ahmad S, Abas F, Safinar I, I, Rukayadi Y, Tayyab AM, et al. Bioactive constituents of *zanthoxylum rhetsa* bark and its cytotoxic potential against B16-F10 melanoma cancer and normal human dermal fibroblast (HDF) cell lines. *Molecules* 2016; 21(6): 652.
23. Jimenez Perez ZE, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Kang HM, Abbai R, et al. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their in vitro antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 709-23.
24. Guerra FS, Oliveira RG, Fraga CAM, Mermelstein CDS, Fernandes PD. ROCK inhibition with Fasudil induces beta-catenin nuclear translocation and inhibits cell migration of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Sci Rep* 2017; 7(1): 13723.
25. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, et al. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; 8(12): e81576.
26. Judee F, Fongia C, Ducommun B, Yousfi M, Lobjois V, Merbahi N. Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci Rep* 2016; 6: 21421.
27. Mashayekh S, Rajaei H, Akhlaghi M, Shokri B, Hassan ZM. Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). *Phys Plasmas* 2015; 22(9): 093508.
28. Ishaq M, Evans MD, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 antioxidant system. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(12): 2827-37.
29. Keidar M. Plasma for cancer treatment. *Plasma Sour Sci Tech* 2015; 24(3): 033001.
30. Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 299-311.

The Effects of Plasma-Activated Medium on the Viability of Breast (MDA-MB-231) and Cervical (Hela) Cancer Cell Lines

Mahya Aminraya-Jezeh¹, Mohammad Reza Khani², Babak Shokri³, Hassan Niknejad⁴

Original Article

Abstract

Background: Plasma is used in two direct and indirect methods for treating cancer cells. Direct treatment of cells or tissues is carried out with irradiation of plasma, but in indirect treatment, the medium activated by plasma radiation is used to decrease cancer cell growth.

Methods: In this experimental study, the plasma parameters such as active species and temperature were evaluated, and then the effects of plasma-activated medium in different treatment times and gas composition of helium/helium + 0.5% oxygen were investigated on two cancer cell lines of Hela and MDA-MB-231. Moreover, to evaluate the selectivity effects of the plasma-activated medium, the viability of normal fibroblast cell lines was investigated after direct and indirect treatments. Analyses used in this study were optical emission spectroscopy (OES) and MTT assay.

Findings: The optimal state for the experiments was 1 cm distance between the sample and the nozzle of the plasma jet and the voltage of 5 kV. Moreover, increasing the time of treatment of the medium and interval time between treatment and analysis caused decreasing in cancer cells viability. The plasma-activated medium also reduced the viability of cancer cells more than that of normal cells.

Conclusion: Plasma-activated medium is a new and challenging method, which has a selective toxicity to destroy cancer cells. Based on the results, cold atmospheric plasma could be an effective and alternative method for cancer therapy.

Keywords: Reactive oxygen species, Cell lines, Cell viability, Spectroscopy

Citation: Aminraya jezeh M, Khani MR, Shokri B, Niknejad H. **The Effects of Plasma-Activated Medium on the Viability of Breast (MDA-MB-231) and Cervical (Hela) Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(526): 493-9.

1- Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Professor, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hassan Niknejad, Email: b-shokri@sbu.ac.ir