

Research Paper



## Innovative method of cold atmospheric plasma transfer to target colon cancer stem cells



Abolfazl Soulat\*<sup>1</sup>, Taghi Mohsenpour, <sup>2</sup>, Leila Roshangar, <sup>3</sup>



This paper is an open access and licenced under the CC BY NC licence.



DOI: 10.22034/strap.2024.18919

**Reference to this article:** Soulat, A; Mohsenpour, T; Roshangar, L; (2024). Innovative method of cold atmospheric plasma transfer to target colon cancer stem cells. *Scientific Researches in Theoretical and Applied Physics*, 2 (1): 19-28

### Keywords

Transferred cold atmospheric plasma, colon cancer stem cells, apoptosis.

Received: 2024/04/11

Accepted: 2024/12/10

Available: 2025/04/09

### ABSTRACT

This study explores the induction of apoptosis in colon cancer stem cells (CCSCs) within a three-dimensional culture milieu, utilizing the innovative cold atmospheric plasma (CAP) transfer technique known as TCAP. TCAP, a gas mixture partially or fully ionized, comprises photons, charged and neutral particles, and free radicals and has garnered attention in biomedical realms such as cancer therapy. TCAP exerts its influence on CCSCs via a continuous transport mechanism, facilitating the effective conveyance of reactive oxygen and nitrogen species (RONS). Key cellular determinants of CCSCs influenced by TCAP treatment, encompassing the count of apoptotic cells and the expression of Bax and Bcl-2 proteins, were assessed employing Annexin V and qrt-ELISA methodologies. The outcomes of TCAP treatment on CCSCs manifest a notable escalation in apoptotic cell count, coupled with favorable alterations in the expression of Bcl-2 and Bax genes. Furthermore, this investigation underscores the anticancer efficacy of TCAP and its potency in diminishing the survival rate of CCSCs. Nonetheless, additional preclinical and clinical trials are imperative to comprehensively assess the efficacy, safety, and potential synergistic interactions of TCAP with adjunctive therapeutic modalities. In sum, TCAP presents a promising alternative for combating CCSCs.

\* Corresponding Author: Abolfazl Soulat

E-mail: a.soulat02@umail.umz.ac.ir

1. University of Mazandaran, Iran.

2. University of Mazandaran, Iran.

3. Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

## مقاله پژوهشی



## روش نوآورانه انتقال پلاسمای اتمسفری سرد برای هدف قراردادن سلول‌های بنیادی سرطان کولون



ابوالفضل صولت<sup>1\*</sup>، تقی محسن پور<sup>2</sup>، لیلا روشنگر<sup>3</sup>



این مقاله به صورت دسترسی باز و با لایسنس CC BY NC کرییتیو کامنز قابل استفاده است.



ارجاع به این مقاله: صولت، ابوالفضل؛ محسن پور، تقی؛ روشنگر، لیلا (1403). روش نوآورانه انتقال پلاسمای اتمسفری سرد برای هدف قراردادن سلول‌های بنیادی سرطان کولون. پژوهش‌های علمی در فیزیک نظری و کاربردی، 2(1): 19-28

DOI: 10.22034/strap.2024.18919



## چکیده

این مطالعه القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی سرطان کولون (CCSCs) را در یک محیط کشت سه‌بعدی، با استفاده از روش نوآورانه انتقال پلاسمای اتمسفری سرد (CAP) به نام TCAP مورد بررسی قرار می‌دهد. TCAP یک مخلوط گازی غیرحرارتی جزئی یا کاملاً یونیزه شده شامل فوتون‌ها، ذرات باردار و خنثی و رادیکال‌های آزاد است که در کاربردهای زیست‌پزشکی مانند درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. TCAP بر CCSCs ها از طریق یک فرآیند انتقال پیوسته اثر می‌گذارد و تحویل کارآمد گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن (RONS) را تسهیل می‌کند. فاکتورهای سلولی کلیدی CCSCs تحت تأثیر تیمار TCAP، شامل تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2، به ترتیب با استفاده از Annexin V و qrt-ELISA ارزیابی شدند. نتایج درمان CCSCs با TCAP افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های آپوپتوز همراه با تغییرات مطلوب در بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax را نشان می‌دهد. هم‌چنین، این مطالعه بر پتانسیل ضد سرطانی TCAP تأکید می‌کند و اثربخشی آن را در کاهش میزان بقای CCSCs ها نشان می‌دهد. با این حال، آزمایشات پیش‌بالینی و بالینی بیشتری برای ارزیابی اثربخشی، ایمنی و اثرات هم افزایی بالقوه TCAP با سایر درمان‌ها به طور کامل ضروری است. به طور کلی، TCAP یک جایگزین امیدوارکننده را برای درمان CCSCs ارائه می‌دهد.

## کلیدواژه‌ها

پلاسمای اتمسفری سرد انتقال- یافته، سلول‌های بنیادی سرطان روده‌بزرگ، آپوپتوز.

دریافت شده: 1403/01/23

پذیرفته شده: 1403/09/20

منتشر شده: 1404/01/20

\* نویسنده مسئول: ابوالفضل صولت

رایانامه: a.soulat02@umail.umz.ac.ir

1- دانشگاه مازندران.

2- دانشیار، دانشگاه مازندران.

3- استاد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

## مقدمه

سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر جهانی است که در میان انواع مختلف سرطان، سرطان کولورکتال (CRC)<sup>۱</sup> به عنوان یک بدخیمی مهم و جدی در انسان مشخص شده است که تقریباً یک دهم کل موارد سرطان را شامل می شود و در بین سه سرطان برتر هم از نظر شیوع و هم از نظر میزان مرگ و میر رتبه بندی می شود [1, 2]. متاستاز این نوع سرطان به اندام های دور، به ویژه کبد، به عنوان عامل اصلی مرگ و میر مرتبط با این وضعیت برجسته است [3]. درمان های رایج سرطان با دشواری بروز مقاومت دارویی مبارزه می کنند که منجر به تجمع سلول های بنیادی سرطانی (CSCs)<sup>۲</sup> و عود مجدد تومورهای درمان شده می شود [4]. CSCs ها به عنوان عامل زمینه ای ناهمگونی فنوتیپی در سرطان های مختلف، زیرجمعیت های کوچکی هستند که دارای ویژگی هایی مانند خود تجدید، تمایز و تومورزایی هستند [5]. علاوه بر این، CSCs ها به عنوان عوامل اولیه مقاومت در برابر درمان، متاستاز، و عود تومورها شناخته می شوند [6]. در حالی که درمان های مرسوم مانند جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی در هدف قرار دادن بخش قابل توجهی از تومور مرتبط با CSCs موثر هستند، اما فاقد قابلیت ریشه کن کردن CSCs های خاص مسئول متاستاز و عود تومور هستند [7]. از این رو، بررسی متاستازهای گسترده در مراحل پیشرفته سرطان، ضرورت و اولویت حیاتی دارد [8]. هدف روش های درمانی نوظهور، هدف قرار دادن جنبه های مختلف ریزمحیط تومور و تخریب سلول های تومور مقاوم به دارو، به ویژه سلول های بنیادی سرطانی است [9]. یکی از نوآورانه ترین و حیاتی ترین فناوری ها در درمان سرطان، سیستم های مبتنی بر پلاسمای فیزیکی، به ویژه پلاسمای اتمسفری سرد (CAP)<sup>۳</sup> است [10].

CAP یک مخلوط گاز غیر حرارتی، به طور جزئی یا کامل یونیزه شده متشکل از ترکیبی از ذرات باردار و خنثی، از جمله الکترون ها، یون ها، رادیکال ها و فوتون های پرنرژی است [11]. CAP که در فشار اتمسفر و دمای محیط کار می کند، گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS)<sup>۴</sup> را از طریق برهم کنش با هوای محیط یا مواد محلول خاص تولید می کند [12]. نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد که اثرات بیولوژیکی CAP عمدتاً به تولید RONS در پلازما مرتبط است [13]. تخلیه سد دی الکتریک (DBD)<sup>۵</sup> و جت پلازما با فشار اتمسفر (APPJ)<sup>۶</sup> به عنوان رایج ترین و مهم ترین منابع CAP در کاربردهای پزشکی [14] مانند استریلیزاسیون [15]، ترمیم زخم

[16]، دندانپزشکی [17]، انعقاد خون [18]، از بین بردن میکروارگانیسم ها، [19] و درمان سرطان [19] شناخته می شوند. اخیراً پلاسمای اتمسفری سرد انتقالی (TCAP)<sup>۷</sup> که به عنوان یکی از دستگاه هایی که بر اساس تخلیه هیبریدی کار می کند، به یک تکنیک برجسته برای تولید CAP تبدیل شده است [20]. استفاده از TCAP چالش های مربوط به وسعت ناحیه درمان و دشواری رسیدن پلازما به هدف تحت درمان را تا حد زیادی برطرف می کند [21]. در این روش، یک APPJ به عنوان پلاسمای انتقالی از یک منبع CAP اولیه مشتعل، مانند DBD در انتهای پایین دستی یک لوله پلاستیکی نازک و طویل، مشتعل می شود [22]. از نظر بیولوژیکی، دو دیدگاه در مورد استفاده از CAP در کاربردهای پزشکی شناسایی شده است [23]. اولین مورد قرار گرفتن در معرض مستقیم پلازما است که در آن پلازما مستقیماً با هدف بیولوژیکی تماس می گیرد و بنابراین همه عوامل تولید شده توسط پلازما روی سلول یا بافت فعال می شوند [24]. برعکس، هنگامی که یک محیط یا محلول تحت تأثیر پلازما قرار می گیرد، یک کاربرد غیرمستقیم در نظر گرفته می شود [25].

در بین کاربردهای زیست پزشکی CAP، هیجان انگیزترین کاربرد آن، پتانسیل آن برای کشتن و درمان سلول های سرطانی و سلول های بنیادی است [26]. چندین مطالعه ویژگی های ضد توموری CAP ها را بر روی سلول های تومور یا بدخیم جامد مختلف مانند سرطان ملانوما [27]، سرطان دهانه رحم [28]، کارسینوم ریه [29]، سرطان دهان [30] و کارسینوم کولون [31] تأیید کرده اند. همچنین، CAP توانایی قابل توجهی در سرکوب رشد تومور و القای تخریب یا آپوپتوز (فرآیند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول به عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن هاست که به منظور حذف سلول های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به کار می رود و در بسیاری از مکانیسم های سیستم ایمنی یا بیماری ها مداخله می کند) در طیف وسیعی از سلول های سرطانی دارد و می تواند مانع از مهاجرت و تهاجم این سلول ها شود [32, 33]. علاوه بر این، CAP حساسیت سلول های تومور را به داروهای شیمی درمانی افزایش می دهد که منجر به اثرات ضد توموری بسیار موثر با حداقل سمیت می شود [34].

علاوه بر این، مطالعات متعدد تأیید کرده اند که هم افزایی بین CAP و نانوذرات اثرات ضد توموری قابل توجهی دارد [35]. مطالعه حاضر به بررسی اثرات پلاسمای اتمسفری سرد انتقالی با گاز هلیوم را بر روند آپوپتوز و زنده ماندن سلول های بنیادی سرطانی

<sup>5</sup> Dielectric barrier discharge  
<sup>6</sup> Atmospheric pressure plasma jet  
<sup>7</sup> Transferred cold atmospheric plasma

<sup>1</sup> Colorectal cancer  
<sup>2</sup> Cancer stem cells  
<sup>3</sup> Cold atmospheric plasma  
<sup>4</sup> Reactive oxygen and nitrogen species

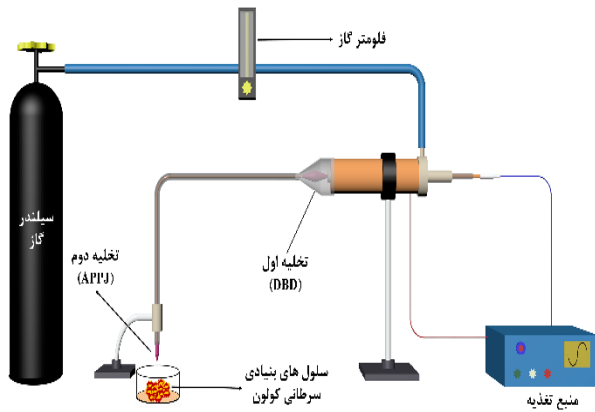
کولون (CCSCs)<sup>8</sup> کشت‌شده در محیط کشت سه‌بعدی متمرکز است.

## 2. روش‌ها و مواد

این مطالعه با هدف بررسی اثرات TCAP هلیوم بر بقا و آپتوز CCSCs ها در یک محیط کشت سه بعدی انجام شد. برای دستیابی به این هدف، پژوهش به چهار مرحله مجزا تقسیم شد. در فاز اولیه، یک منبع تغذیه متناوب فرکانس متغیر کیلوهرتز برای تولید و بهینه‌سازی یک TCAP با گاز هلیوم طراحی و ساخته شد. مشخصات و خواص TCAP مانند ولتاژ، جریان، فرکانس، سرعت جریان گاز و نوع واکنش تولید شده، مستند و ثبت شد. در مرحله دوم، CCSCs ها در محیط کشت سه‌بعدی کشت داده شدند. ثالثاً، CCSCs های کشت‌شده در محیط‌های سه‌بعدی در معرض TCAP قرار گرفتند. در مرحله نهایی، سلول‌های تیمار شده با پلاسما تحت آنالیزهای بیولوژیکی و بافت‌شناسی از جمله RT-PCR برای تجزیه و تحلیل بیان ژن قرار گرفتند. آنالیزهای بیوشیمیایی و فلوسایتمتری انجام شد و بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های مرتبط با آپتوز مانند Bax و Bcl-2، با استفاده از کیت‌های ارزیابی آپتوز انکسین V تأیید شد. همچنین، سنجش MTT برای ارزیابی زنده‌مانی CCSCs ها پس از مواجهه مستقیم با TCAP به مدت 3 و 5 دقیقه انجام شد. در ادامه روش‌ها و مواد مورد استفاده در این مراحل مختلف توضیح داده شده است.

### TCAP 2.1

این مطالعه یک رویکرد نوآورانه و منحصر به فرد را برای تولید و انتقال CAP معرفی می‌کند. شکل 1 نمودار شماتیک مجموعه آزمایشی طراحی شده را نشان می‌دهد. در این روش، یک APPJ به طور مداوم از یک منبع پلاسمای اولیه در انتهای لوله پلاستیکی طویل و انعطاف‌پذیر تولید می‌شود. قابل توجه‌ترین ویژگی این روش کاهش قابل توجه ولتاژ اولیه در انتهای لوله انتقال است که ایمنی این روش درمانی را تضمین می‌کند. این پیکربندی شامل سه بخش اساسی است: منطقه پلاسما، منبع تغذیه و سیستم تشخیص و کنترل.



شکل 1. ستاپ TCAP

منطقه پلاسما از دو بخش اساسی تشکیل شده است: محفظه تخلیه اولیه و لوله انتقال تخلیه با یک سیم هسته مسی در داخل که از انتهای آن یک APPJ خارج می‌شود. تخلیه اولیه در یک راکتور DBD دو عایق هم‌محور مشتعل شد که شامل دو الکتروود، یک الکتروود خارجی (لوله مسی، قطر 24 میلی‌متر و ضخامت 2 میلی‌متر) و یک الکتروود داخلی (سیم مسی، قطر 2/5 میلی‌متر) می‌باشد. برای جداسازی این دو الکتروود از یک عایق دوگانه استفاده شد. این عایق دوگانه شامل یک لوله کوآرتز با انتهای بسته (قطر 4 میلی‌متر و ضخامت 1 میلی‌متر) با لایه پلی‌تترافلورواتیلن (PTFE) (قطر 15 میلی‌متر) بود که لوله کوآرتز در آن قرار گرفت. جداکننده PTFE که قطری مطابق با قطر داخلی الکتروود خارجی (20 میلی‌متر) داشت، در قسمت بالایی الکتروود بیرونی قرار گرفت و تا انتهای الکتروود بیرونی با قطر 15 میلی‌متر گسترش یافت. از نظر الکتریکی، الکتروود داخلی به منبع تغذیه با ولتاژ بالا وصل شد و الکتروود بیرونی به زمین متصل شد. قسمت پایینی الکتروود بیرونی به یک لوله پیرکس کیفی شکل متصل بود که از طریق آن تخلیه اولیه قابل مشاهده بود. لوله انتقال تخلیه (قطر 6 میلی‌متر، ضخامت 1 میلی‌متر و طول 5 متر) به انتهای این لوله پیرکس متصل شد. سیم هسته مسی درون لوله انتقال (قطر 0/2 میلی‌متر) از چند میلی‌متر پایین‌تر از انتهای PTFE مرکزی شروع می‌شود و تا چند میلی‌متر قبل از انتهای لوله انتقال ادامه می‌یابد. نقش این سیم مسی نازک القای پلاسمای تشکیل شده در راکتور DBD به انتهای اولین لوله انتقال از طریق رسانش میدان الکتریکی بود.

یک میدان الکتریکی قوی بین دو الکتروود با وارد کردن گاز هلیوم با سرعت جریان 5 لیتر در دقیقه و اعمال ولتاژ بالا از 10 کیلوولت در فرکانس 40 کیلوهرتز به الکتروود داخلی ایجاد شد. این میدان الکتریکی یک DBD بین الکتروود بیرونی و PTFE مرکزی ایجاد کرد که می‌توان آن را از لوله پیرکس مشاهده کرد. با تولید DBD، فرآیند

ساعت رشد داده شدند. پس از آن، 250 میکرولیتر از محیط کشت با حجمی معادل از محیط سلول‌های بنیادی سرطانی عاری از سرم که شامل (Gibco) DMEM/F12، فاکتور رشد اپیدرم نوترکیب انسانی (rhEGF، 20 نانوگرم در میلی لیتر؛ سیگما، ایالات متحده آمریکا)، فاکتور رشد فیروبلست پایه (bFGF، 20 نانوگرم در میلی-لیتر؛ Upstate، ایالات متحده آمریکا)، B27 (1، Gibco)، فاکتور بازدارنده لوسمی (LIF، 10 نانوگرم در میلی لیتر؛ سیگما، ایالات متحده آمریکا)، و انسولین (U/L 4، سیگما) با یا بدون وینکریستین (5 نانوگرم در میلی لیتر؛ شرکت دارویی Hualian، شانگهای، چین) جایگزین شد. همین رویه تکرار شد.

### 2.3 سنجش زنده مانی سلولی در شرایط آزمایشگاهی

تکنیک آزمون MTT برای ارزیابی اثرات مستقیم TCAP و هم-چنین اثرات گاز هلیوم بر زنده مانی CCSCs ها مورد استفاده قرار گرفت. این بررسی ها در سه تکرار برای هر نمونه انجام شد. در هر چاه از میکروپلیت های 96 چاهی (Roskilde, Nunc، دانمارک)، سلول‌های  $5 \times 10^3$  بر روی داربست استریل شده کاشته شدند. پس از 24، 48 و 72 ساعت کشت، 50 میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و در انکوباتور 5 درصد  $CO_2$  در دمای 37 درجه سانتیگراد در محیطی مرطوب به مدت 24 ساعت انکوبه شد تا BMMSC ها به سطوح چاه بچسبند. چاه‌های حاوی CCSCs و محیط کشت استاندارد به عنوان شاهد استفاده می‌شوند. سپس، محیط کشت و هر محلول MTT باقیمانده از چاهک ها خارج شد و با 100 میکرولیتر DMSO جایگزین شد تا کریستال های فرمازان تشکیل شده حل شود. پس از آن، جذب در طول موج 570 نانومتر با استفاده از صفحه خوان (Roche Applied Model XYZ) ELISA، ایندیاناپولیس، ایالات متحده آمریکا) اندازه‌گیری شد. درصد بقای گروه های مختلف با گروه کنترل مقایسه شد.

### RT-PCR 2.4

بیان ژن ناقل‌های کاست اتصال ATP (ABC) برای جریان وین کریستین، معروف به پروتئین مقاومت چند دارویی (MDR1) و پروتئین مرتبط با مقاومت چند دارویی 1 (MRP1)، از طریق آنالیز RT-PCR تعیین شد. RNA کل از سلول‌های U87، هم سلول‌های غیرکره‌ساز چسبنده و هم کره‌های تومور، با استفاده از معرف Tripure (Roche Co، سوئیس) طبق پروتکل سازنده استخراج شد. کیت TaKaRa RNA PCR 3.0 (TaKaRa، ژاپن) برای RT-PCR استفاده شد. ژن گلیسرآلدئید-3-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) برای ایجاد

پلاسما که از طریق لوله نازک با جریان گاز منتقل می‌شود، آغاز می‌شود. سیم مسی که از پتانسیل اعمالی به رآکتور DBD تبعیت می‌کند، با القای میدان الکتریکی در انتهای خود، پلاسما اولیه را از رآکتور DBD به انتهای لوله اول منتقل می‌کند و در خروجی لوله انتقال، یک APPJ ایجاد می‌شود.

منبع تغذیه مورد استفاده در این تحقیق یک نیم پل 800 وات و به دنبال آن یک ترانسفورماتور فریت 1:60 بود که ولتاژ خروجی 18 کیلوولت را تولید می‌کرد. حداکثر جریان خروجی به 500 میلی آمپر محدود شد. این مرحله توان از یک مولد سیگنال متغیر با محدوده فرکانسی 5 تا 100 کیلوهرتز مشتق شده است. پیوند DC نیم پل توسط یک یکسوکننده که توسط یک ترانسفورماتور واریاک 2 کیلووات هدایت می‌شود، تامین می‌شود.

برای تشخیص انتشار نوری در TCAP، از طیف‌سنج Ocean Optics USB4000 استفاده شد که محدوده 375 تا 1100 نانومتر را پوشش می‌دهد. زمان نوردهی روی 1000 میلی ثانیه تنظیم شد و فاصله بین فیبر نوری و جت پلاسما خروجی به دقت کنترل شد تا از جرقه و اشباع جلوگیری شود. برای جمع آوری داده‌های الکتریکی از TCAP، یک اسیلوسکوپ Tektronix TDS2024D با یک پروب ولتاژ بالا AOP-10 (3 pF، 1000X، 500 MΩ، 10MHz) استفاده شد.

### 2.2 کشت سلولی در ماتریژل

CCSCs های جدا شده از رده سلولی HT29 از بانک سلولی NCBI انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 که با 10 درصد سرم جنین گاو (FBS) غیرفعال شده با حرارت، پنی سیلین (100 واحد بر میلی لیتر)، و استرپتومایسین (100 میکروگرم در میلی لیتر) تکمیل شد، رشد کردند. سلول ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد مرطوب شده با 95 درصد هوا و 5 درصد  $CO_2$  انکوبه شدند.

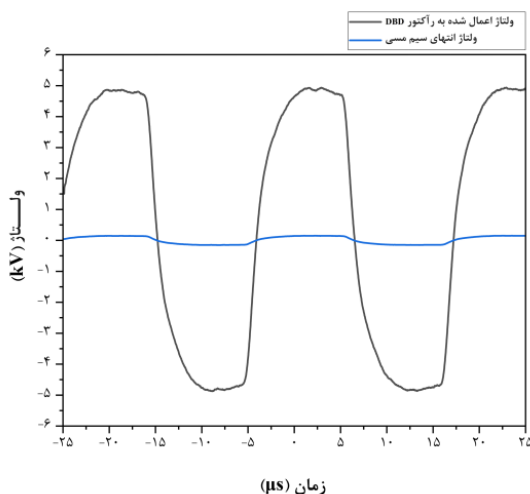
برای آماده سازی صفحات، 200 میکرولیتر ماتریکس ماتریژل (10 میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک صفحه 48 چاهی که از قبل سرد شده بود، اضافه شد. سپس ماتریس ماتریژل با نوک پیپت پخش شد و صفحه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شد تا ماتریکس ماتریژل ژل شود. سپس، CCSCs ها در صفحات 48 چاهی با سلول در چاهک  $2 \times 10^4$  (Bio-tech، شانگهای، چین) پر شده با محیط کشت متشکل از میکرو 500 DMEM، 10 درصد FBS، 100 U/ml پنی‌سیلین G و 100 میلی‌گرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Gibco، ایالات متحده آمریکا) به مدت 14 تا 18

APPJ از انتهای پایین دستی لوله انتقال به سمت سلول‌های کشت شده به‌عنوان TCAP نهایی پرتاب شد. برای دستیابی به TCAP هلیوم از طریق این دو مرحله، ولتاژهای پیک به پیک 9/78 کیلوولت به رآکتور DBD با جریان گاز 5 لیتر بر دقیقه اعمال شد. جدول 1 مشخصات الکتریکی TCAP را نشان می‌دهد. فرکانس مربوط به این ولتاژ 36/3 کیلوهرتز بود. شکل 2 شکل موج ولتاژ اعمال شده به رآکتور DBD و ولتاژ انتهای سیم مسی نازک را نشان می‌دهد که همزمان با استفاده از پروب‌های HV اندازه‌گیری شد.

جدول 1. مشخصات الکتریکی TCAP هلیوم.

پارامترها	TCAP هلیوم
کل ولتاژ اعمال شده (kV)	9/87
ولتاژ تخلیه ثانویه (kV)	0/304
فرکانس (kHz)	35/3
توان جت پلاسما خروجی (W)	0/819

مطابق جدول 1، افت ولتاژ بالایی در انتهای سیم مسی در مقایسه با ولتاژ اعمال شده به رآکتور DBD مشاهده می‌شود. این افت ولتاژ تقریباً 9/5 کیلوولتی احتمالاً به دلیل تلفاتی مانند اتلاف یونیزاسیون است. این ویژگی ایمنی TCAP را برجسته می‌کند و آن را برای استفاده بدون نگرانی در کاربردهای مختلف پزشکی مناسب می‌کند.



شکل 2. شکل موج ولتاژهای مربوط به TCAP.

شکل 3 طیف انتشار نوری شناسایی شده از جت پلاسمای خروجی هلیوم را نشان می‌دهد. مشاهده شدند. در جت پلاسمای هلیوم، گونه‌های برانگیخته در طول موج‌های خاص، از جمله HeI (706/5،

یک کنترل داخلی تکثیر شد و هر ژن تحت 29 سیکل تکثیر قرار گرفت. در نهایت، هر مقدار RT-PCR در ژل آگارز 1/8 درصد حاوی 0/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد.

## 2.5 سنجش زنده مانی سلولی در شرایط آزمایشگاهی

شرایط برای القای آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه با Annexin V-FITC و PI و سپس آنالیز فلوسیتومتری بررسی شد. سلول‌ها ابتدا در صفحات 6 چاهی با تراکم  $2/5 \times 10^5$  سلول در هر چاهک کاشته شدند. پس از تریپسینیزاسیون، سلول‌های تمام گروه‌های تجربی با Annexin V-FITC و PI به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در تاریکی رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده از نظر درصد سلول‌های آپوپتوز با استفاده از فلوسیتومتر Partec و نرم افزار FloMax مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## 2.7 تحلیل آماری

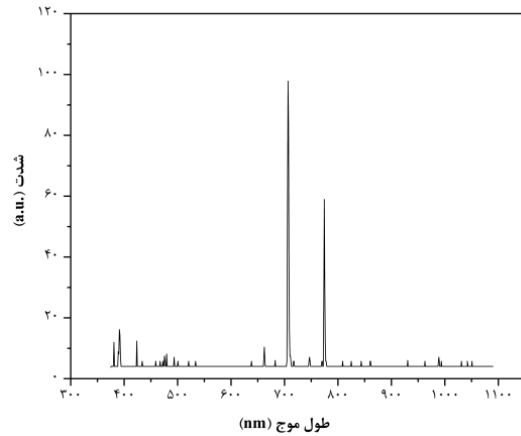
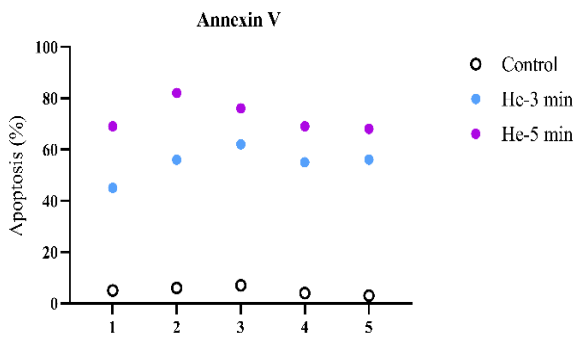
نمودارهای مربوط به داده‌های پلاسما با استفاده از Origin 2022 (نرم‌افزار Origin Pro، Origin Lab Corporation، Northampton، ماساچوست، ایالات متحده آمریکا) ترسیم شد. علاوه بر این، داده‌های بیولوژیکی از تمام آزمایش‌ها به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) ارائه شد. انتخاب آزمون‌های آماری به نوع آزمایش بستگی داشت و ممکن است شامل ANOVA یک‌طرفه با مقایسه‌های متعدد باشد که با استفاده از GraphPad Prism 9.0 (نرم‌افزار GraphPad، سن‌دیگو، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا) انجام شده است. هنگام مقایسه تیمارها با شاهد از آستانه معنی‌داری ( $p > 0/01$ ) استفاده شد.

## 3. نتایج

### 3.1 TCAP

در این مطالعه، ما از یک روش جدید و منحصر به فرد برای ارائه عناصر موثر پلاسما (RONS) برای تیمار CCSCs ها و بررسی اثرات آن بر بقا و آپوپتوز CCSCs ها استفاده کردیم. این روش جدید منجر به القای APPJ در انتهای لوله انتقال می‌شود که ما آن را TCAP می‌نامیم. TCAP شرح استفاده شده شامل دو تخلیه پلاسما (اولیه و ثانویه) با استفاده از گاز هلیوم است. این تخلیه‌ها توسط یک سیم مسی نازک که در داخل لوله پلاستیکی نازک قرار گرفته بود، به هم متصل می‌شدند. تخلیه اولیه به‌عنوان منبع اصلی القاء و انتقال پلاسما در رآکتور DBD ایجاد شد. این تخلیه بین انتهای PTFE مرکزی و ابتدای سیم مسی به‌صورت رشته‌های پلاسما ظاهر شد. تخلیه دوم به شکل یک

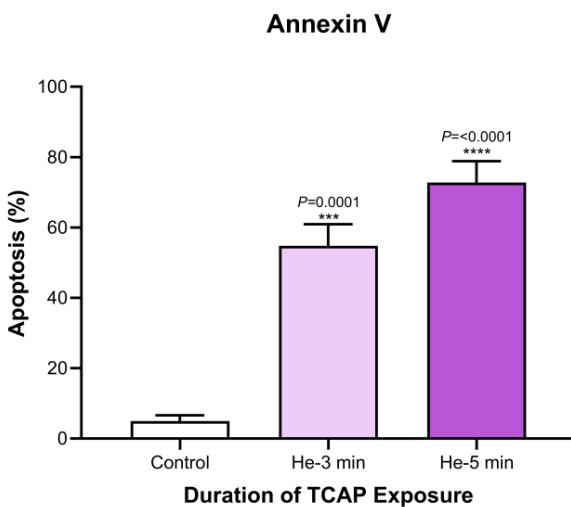
،824/9، 930/4، 962/6 و 1031/3 نانومتر)، CuI (479/4)، CuII (475/3، 533/6، 682/5، 774/4 و 808/8 نانومتر)، CuIII (380/9 نانومتر)، OI (1042/1 نانومتر)، OII (433/7، 459/1، 662/3، 493/5) NI، 861 و 993/4، 717/6، 520/6، 467/3 و 746/8 و 1050/7 نانومتر)، NII (423/6، 500/5، 843/7 و 998/8 نانومتر)، NIV (638/1 نانومتر) و  $N_2^+$  (391/1 نانومتر) مشاهده شدند.



شکل 3. طیف نشری جت پلاسما انتقال یافته در TCAP هلیوم.

### 3.2 آپوپتوز

برای ارزیابی القای آپوپتوز در تمامی گروه‌های آزمایشی مربوط به CCSCs ها از روش Annexin V-FITC استفاده شد.



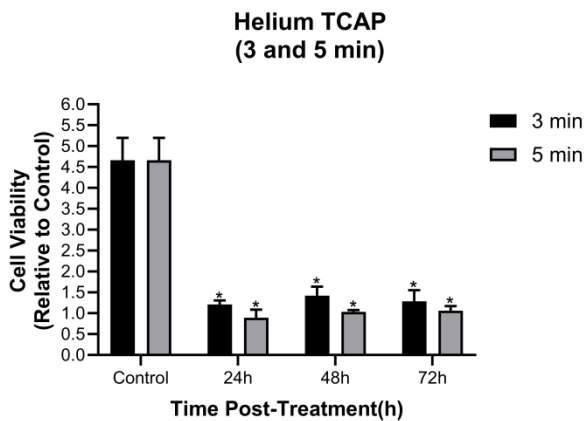
شکل 4. القای آپوپتوز در CCSCs ها.

تمام سلول‌ها با Annexin V-FITC و PI دو رنگ آمیزی شدند و تجزیه و تحلیل بعدی با استفاده از فلوسیتومتری انجام شد. همان‌طور که در شکل 4 نشان داده شده است، داده‌های به دست آمده از آنالیز فلوسیتومتری با نرم‌افزار FloMax برای تعیین درصد سلول‌های زنده (-Q3: Annexin V-FITC-/PI)، سلول‌های آپوپتوز اولیه (-Q4: Annexin V-FITC+/PI)، سلول‌های نکروزه (Q1: Annexin V-FITC+/PI) و سلول‌های زنده (+Annexin V-FITC-/PI) پردازش شدند. درصد سلول‌های آپوپتوز زودرس (Q4) و دیررس (Q2) در سلول‌های CCSCs تیمار شده با IC50 های Dox (44.98%) و Quer (49.7%) به تنهایی و در ترکیب (56.77%)، به‌طور قابل توجهی بیشتر از سلول‌های کنترل (6.7%) بود.

بیان ژن لنفوما ۲ لنفوسیت‌های بی (Bcl-2) به‌عنوان یکی از ژن‌های ضد آپوپتوزی در همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داده است، همان‌طور که در شکل 5 نشان داده شده است. این کاهش در گروه‌هایی که به مدت 5 دقیقه با TCAP هلیوم درمان شده‌اند، نسبت به گروهی که به مدت 3 دقیقه تیمار شده، بارزتر است.

## 3.3 سنجش زنده‌مانی سلولی در شرایط آزمایشگاهی

زنده‌مانی CCSCs ها در مقاطع زمانی 3 و 5 دقیقه با استفاده از روش MTT هنگام قرار گرفتن در معرض TCAP هلیوم، همان‌طور که در شکل 7 نشان داده شده است، ارزیابی شد.



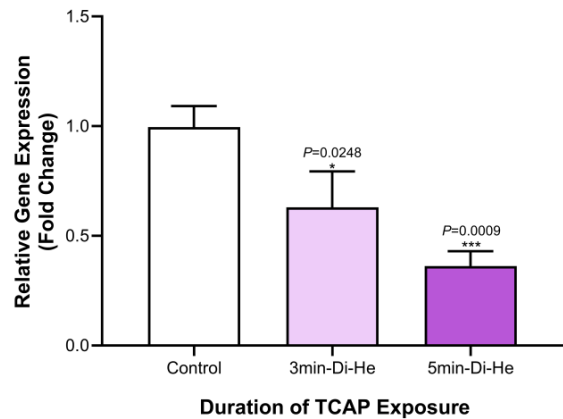
شکل 7. نتایج آزمون MTT برای زنده‌مانی سلول‌های CCSCs پس از 3 و 5 دقیقه قرار گرفتن در معرض هلیوم TCAP.

نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار میزان بقای CCSCs ها در مواجهه با TCAP هلیوم در مقایسه با گروه کنترل بود. علاوه بر این، افزایش مدت زمان درمان از 3 به 5 دقیقه تأثیر قابل توجهی را نشان داد. از این رو، قرار دادن سلول‌های سرطانی در معرض TCAP هلیوم به مدت 5 دقیقه منجر به کاهش قابل توجهی در میزان بقای CCSCs ها در مقایسه با گروه کنترل شد.

## 4. بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، هدف اولیه ما بررسی القای آپوپتوز در CCSCs با استفاده از TCAP بود. این CAP جدید به دلیل توانایی آن در رساندن موثر عوامل القا شده با پلاسما به CCSCs ها انتخاب شد. تکنیک TCAP شامل یک فرآیند تخلیه متوالی است که شامل مراحل اولیه، ثانویه است که از گاز هلیوم استفاده می‌کند. رشته‌های پلاسما تولید شده در این مراحل نقش مهمی در تحویل RONS به CCSCs ها ایفا می‌کنند. یکی از جنبه‌های مهم این مطالعه تأکید بر ملاحظات ایمنی است. افت ولتاژ مشاهده شده در انتهای سیم مسی، همراه با محاسبه توان جت پلاسما خروجی، تعهد به کاهش خطرات احتمالی مرتبط با درمان‌های مبتنی بر پلاسما را نشان می‌دهد [21]. در همین راستا، مقادیر توان زیر 1 وات رویکرد استفاده ایمن TCAP در کاربردهای پزشکی را تضمین می‌کند و امکان آن را برای کارآزمایی‌های بالینی

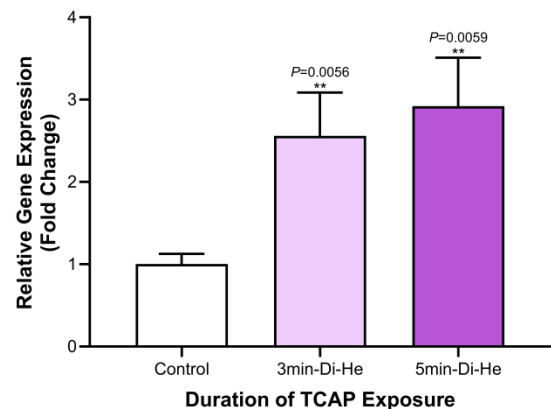
## Bcl-2



شکل 5. نتایج بیان ژن Bcl-2 مربوط به CCSCs ها.

از طرفی، پروتئین ایکس مرتبط با لنفوم 2 لنفوسیت‌های بی (Bax) به‌عنوان یکی از ژن‌های طرفدار آپوپتوز، پروتئینی است که در انسان توسط ژن Bax کُدگذاری می‌شود. در بررسی حاضر، بیان ژن Bax در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشته است (شکل 6). این افزایش در گروهی که به مدت 5 دقیقه توسط TCAP تیمار شدند بیشتر به چشم می‌آید. هم‌چنین، نسبت بین بیان Bcl-2 و Bax نقش مهمی در تعیین سرنوشت سلول‌ها در پاسخ به تحریک آپوپتوز ایفا می‌کند. افزایش نسبت Bax/Bcl-2 باعث کاهش مقاومت سلولی در برابر محرک‌های آپوپتوز می‌شود که منجر به افزایش مرگ سلولی و کاهش بروز تومورها می‌شود.

## Bax



شکل 6. نتایج بیان ژن Bax مربوط به CCSCs ها.

وجود، پیش نیازها و چالش های مهمی در راه این رویکرد درمانی بالقوه وجود دارد. انجام آزمایشات پیش‌بالینی و بالینی کامل، بررسی دقیق اثرات TCAP بر تمام عوامل بیولوژیکی مربوط، ابداع روش‌های انتقال ایمن به بدن، ارزیابی جامع خطرات و اثرات نامطلوب احتمالی مرتبط با TCAP و بررسی اثرات هم‌افزایی آن با سایر روش‌های درمانی ضروری هستند. ارزیابی اثربخشی و ایمنی TCAP در تومورهای مقاوم به درمان‌های فعلی از طریق مدل‌های حیوانی و انسانی یکی از این پیش‌نیازهای ضروری است. بررسی‌ها و ارزیابی‌های دقیق به‌طور بالقوه می‌تواند TCAP را به یک راه‌حل درمانی تقریباً جامع و بی‌نظیر تبدیل کند.

## منابع و مراجع

- [1] Siegel, R.L., A.N. Giaquinto, and A. Jemal, Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*, 2024. 74(1): p. 12-49
- [2] Siegel, R.L., et al., Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2023. 73(3): p. 233-254
- [3] Sobral, D., et al., Genetic and microenvironmental intra-tumor heterogeneity impacts colorectal cancer evolution and metastatic development. *Communications Biology*, 2022. 5(1): p. 937
- [4] Eid, R.A., et al., Targeting cancer stem cells as the key driver of carcinogenesis and therapeutic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. 24(2): p. 1786
- [5] Atashzar, M.R., et al., Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *Journal of cellular physiology*, 2020. 235(2): p. 790-803
- [6] Afify, S.M., et al., Functional and Molecular Characters of Cancer Stem Cells Through Development to Establishment, in *Cancer Stem Cell Markers and Related Network Pathways*. 2023, Springer. p. 83-101.
- [7] Ebrahimi, N., et al., Cancer stem cells in colorectal cancer: Signaling pathways involved in stemness and therapy resistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2023. 182: p. 103920
- [8] Garza Treviño, E.N., et al., Cell therapy as target therapy against colon cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. 24(9): p. 8163
- [9] Shen, M. and Y. Kang, Cancer fitness genes: emerging therapeutic targets for metastasis. *Trends in Cancer*, 2023. 9(1): p. 69-82
- [10] Laroussi, M., M. Keidar, and V.I. Kolobov, Low-Temperature Plasma for Biomedical Applications. 2023: *Frontiers Media SA*.
- [11] Karthik, C., S.C. Sarngadharan, and V. Thomas, Low-Temperature Plasma Techniques in Biomedical Applications and Therapeutics: An Overview.

آینده افزایش می‌دهد. علاوه بر این، شناسایی گونه‌های فعال از طریق طیف‌سنجی نشر نوری به درک اثرات TCAP عمق می‌بخشد. طیف متنوعی از گونه‌های برانگیخته مشاهده‌شده در جت پلاسمای خروجی هلیوم بر تأثیر بالقوه آن بر پاسخ‌های سلولی مانند پروتئین‌های Bax و Bcl-2 که همگی نشان‌دهنده تحریک یا القای آپوپتوز هستند، تأکید می‌کند. بررسی‌ها وجود سلول‌های آپوپتوز معمولی را در تمام گروه‌های در معرض TCAP نشان داد (شکل 4). در تأیید بیشتر مشاهدات فوق، استفاده از CCSCs های دو رنگ آمیزی شده با Annexin V-FITC و PI برای تعیین کمیت سلول‌های آپوپتوز (همان‌طور که در شکل 4 نشان داده شده است) افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های آپوپتوز در CCSCs های تیمار شده با TCAP نشان داد. این افزایش در مدت زمان 5 دقیقه بیشتر از مدت زمان 3 دقیقه به چشم می‌خورد. علاوه بر این، ذکر این نکته مهم است که سطوح بیان ژن Bcl-2 و Bax به-عنوان نشانگرهای استاندارد برای تشخیص آپوپتوز شناسایی شدند [36]. تحقیقات نشان می‌دهد که CAP تأثیر مفیدی بر بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax دارد. طبق همان اصول، همان‌طور که در شکل‌های 5 و 6 نشان داده شده است، هدف قرار دادن CCSCs ها با TCAP منجر به کاهش قابل توجه بیان ژن Bcl-2 و افزایش قابل توجهی در بیان ژن Bax در همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد. علاوه بر این، این شکل‌ها بر ارتباط مستقیم بین مدت قرار گرفتن در معرض TCAP و میزان تغییرات در بیان ژن تأکید می‌کند. به‌طور دقیق‌تر، سطح بیان-ژن در مدت زمان تیمار 5 دقیقه بالاتر از سطح بیان‌ژن در مدت زمان 3 دقیقه بود. نتایج سنجش MTT نشان دهنده کاهش نرخ بقای CCSCs ها در تمام گروه‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه کنترل است، همان‌طور که در شکل 7 نشان داده شده است. با توجه به شکل 7، کاهش چشمگیری در زنده‌مانی CCSCs های تیمار شده با TCAP دیده می‌شود که این کاهش در مدت زمان 5 دقیقه بیشتر از 3 دقیقه است.

بنابراین، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از TCAP هلیوم می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در سرطان کولورکتال را افزایش داده و میزان آپوپتوز را نیز افزایش دهد. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که مدت زمان قرار گرفتن در معرض TCAP نقش مهمی در تأثیرگذاری بر بیان ژن و تغییرات سلولی دارد. به‌طور خلاصه، این مطالعه اثر TCAP را بر وقوع آپوپتوز CCSCs در محیط‌های کشت سه‌بعدی نشان می‌دهد. یافته‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که TCAP یک ابزار بیولوژیکی جدید با کاربردهای درمانی بالقوه است که می‌تواند بر ساختار و عملکرد سلول تأثیر بگذارد و آپوپتوز را القا کند. نکته مهم این است که TCAP می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی برای درمان CCSCs استفاده شود. با این

- Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2018. 18(6): p. 805-814
- [25] Gao, Y., K. Francis, and X. Zhang, Review on formation of cold plasma activated water (PAW) and the applications in food and agriculture. *Food Research International*, 2022. 157: p. 111246
- [26] Trink, B., et al., The effect of cold atmospheric plasma treatment on cancer stem cells. *Plasma Medicine*, 2015. 5(1)
- [27] Li, H., et al., Experiment on inducing apoptosis of melanoma cells by micro-plasma jet. *Nanotechnology and Precision Engineering (NPE)*, 2024. 7(1)
- [28] Tayebi, T., et al., Evaluation of Inducing Apoptosis as Cell Death Mechanism by Cold Atmospheric Plasma in Cervix Cancer Cell Line (Hela). *Journal of Isfahan Medical School*, 2020. 37(556): p. 1354-1360
- [29] Song, C.-H., et al., Cocktail of reactive species generated by cold atmospheric plasma: oral administration induces non-small cell lung cancer cell death. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2021. 54(18): p. 185202
- [30] Schuster, M., et al., Side effects in cold plasma treatment of advanced oral cancer—Clinical data and biological interpretation. *Clinical Plasma Medicine*, 2018. 10: p. 9-15
- [31] He, Y., et al., Cold atmospheric plasma stabilizes mismatch repair for effective, uniform treatment of diverse colorectal cancer cell types. *Scientific Reports*, 2024. 14(1): p. 3599
- [32] Lin, A.G., et al., Non-thermal plasma induces immunogenic cell death in vivo in murine CT26 colorectal tumors. *Oncoimmunology*, 2018. 7(9): p. e1484978
- [33] Wang, Y., et al., Piezoelectric cold atmospheric plasma induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through blocking glycolysis and AKT/mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023. 208: p. 134-152
- [34] Daeschlein, G., et al., Enhanced anticancer efficacy by drug chemotherapy and cold atmospheric plasma against melanoma and glioblastoma cell lines in vitro. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, 2018. 2(2): p. 153-159
- [35] Li, W., et al., Cold atmospheric plasma and iron oxide-based magnetic nanoparticles for synergetic lung cancer therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019. 130: p. 71-81
- [36] Czabotar, P.E. and A.J. Garcia-Saez, Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2023. 24(10): p. 732-748
- [12] Bai, F. and Y. Xia. Analysis of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Cold Atmospheric Plasma Activated Water. in *International Symposium on Insulation and Discharge Computation for Power Equipment*. 2023. Springer.
- [13] Lee, C.-M., et al., The effect of cold atmospheric plasma (CAP) on the formation of reactive oxygen species and treatment of *Porphyromonas gingivalis* biofilm in vitro for application in treatment of peri-implantitis. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2023. 40(3): p. 618-629
- [14] Braný, D., et al., Cold atmospheric plasma: A powerful tool for modern medicine. *International journal of molecular sciences*, 2020. 21(8): p. 2932
- [15] Moritz, S., et al., Surface modifications caused by cold atmospheric plasma sterilization treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2020. 53(32): p. 325203
- [16] Dubey, S.K., et al., Cold atmospheric plasma therapy in wound healing. *Process Biochemistry*, 2022. 112: p. 112-123
- [17] Silva, N., et al., The applications of cold atmospheric plasma in dentistry. *Plasma Processes and Polymers*, 2023. 20(12): p. e2300067
- [18] Eldeighdye, S.M., K.M. Ahmed, and T.M. Allam, Revealing the Main Mechanism of Reversible Synthetic Blood Coagulation by Atmospheric Cold Plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2022. 50(9): p. 2989-2997
- [19] Yan, D., et al., Cold atmospheric plasma cancer treatment, a critical review. *Applied Sciences*, 2021. 11(16): p. 7757
- [20] Chen, Z., et al., Cold atmospheric plasma delivery for biomedical applications. *materials today*, 2022. 54: p. 153-188
- [21] Kostov, K.G., et al., Transfer of a cold atmospheric pressure plasma jet through a long flexible plastic tube. *Plasma Sources Science and Technology*, 2015. 24(2): p. 025038
- [22] Nascimento, F., K. Petroski, and K. Kostov, Effects of O<sub>2</sub> addition on the discharge parameters and production of reactive species of a transferred atmospheric pressure plasma jet. *Applied Sciences*, 2021. 11(14): p. 6311
- [23] Laroussi, M., Cold plasma in medicine and healthcare: The new frontier in low temperature plasma applications. *Frontiers in Physics*, 2020. 8: p. 74
- [24] Attri, P., et al., How does plasma activated media treatment differ from direct cold plasma treatment? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current*