

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده فیزیک و مهندسی هسته ای

پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیک اتمی مولکولی

# بررسی تأثیر مشعل پلاسمای سرد اتمسفری بر میزان توکسیسیتی و مهاجرت سلولی سلول های سرطان پستان

نگارنده : اسما اسحقی

اساتید راهنما

دکتر مهدی مومنی

دکتر سید ایمان حسینی

استاد مشاور

دکتر نسیم برهانی

شهریور ۱۳۹۷

شماره:  
تاریخ:

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صور جلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای اسما اسحاقی با شماره دانشجویی ۹۴۰۱۹۳۴ رشته فیزیک اتمی مولکولی گرایش پلاسما تحت عنوان بررسی تاثیر مشعل پلاسمای سرد اتمسفری بر میزان توکسیسمی و مهاجرت سلولی سلول های سرطان پستان که در تاریخ ۹۷/۰۶/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

<input type="checkbox"/> قبول (با درجه: .....)				<input type="checkbox"/> مردود
<input type="checkbox"/> نظری				<input checked="" type="checkbox"/> عملی
نوع تحقیق:				
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء	
۱- استاد راهنمای اول	دکتر مهدی مومنی	استادیار		
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر سید ایمان حسینی	استادیار		
۳- استاد مشاور	دکتر نسیم برهانی	استادیار		
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر احسان لبراهیمی	استادیار		
۵- استاد ممتحن اول	دکتر مجتبی هاشم زاده	استادیار		
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر سمیه مهربان	استادیار		

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر سعید حسامی

تصوه: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).



تقدیم به

مقدس ترین و شریف‌ترین مادر لغت نامه و علم

پدر، مهربانی مشفق، برادر و حامی

مادر مهربانم که زندگیم رویدیو، مهر و عطف و لطفی دهنم

همسرم که نشانه لطف الهی در زندگی منم هست

خواهر و برادرم، هم‌نمایان، همیشگی و پشتیبانان منم زندگیم.

تشکر و سپاس بیکران از :

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران

مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

همسر مهربانم که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود.

استادان فرزانه و فرهیخته جناب آقای دکتر مهدی مومنی و جناب آقای دکتر سید ایمان

حسینی که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

دوست گران مایه ام خانم پروین عنایتی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری نمود.

آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود.

خدایا به من کمک کن تا بتوانم ادای دین کنم و به خواسته ی آنان جامه ی عمل بپوشانم.

پروردگارا حسن عاقبت ، سلامت و سعادت را برای آنان مقدر نما.

خدایا توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همسو با علم و دانش و پژوهش جهت

رشد و شکوفایی ایران کهنسال عنایت بفرما.

## تعهدنامه

اینجانب اسما اسحقی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته فیزیک اتمی مولکولی گرایش پلاسما دانشکده فیزیک و مهندسی هسته ای دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه " بررسی تاثیر مشعل پلاسمای سرد اتمسفری بر میزان توکسیسیتی و مهاجرت سلولی سلول های سرطان پستان " تحت راهنمایی آقایان دکتر مهدی مومنی و دکتر سید ایمان حسینی متعهد می شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

## تاریخ

### امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .  
استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

استفاده از پلاسمای سرد موجب کاهش تکثیر، اتصال و مهاجرت سلولی و القای آپوپتوزیس انتخابی در سلول های نئوپلاستیک شده اما تاثیر مخربی بر روی سلول های سالم ندارد و به همین منظور می تواند روش درمانی مناسبی در مقایسه با دیگر روش های درمانی برای سلول های سرطانی باشد. در این پژوهش از دستگاه جت پلاسما و گاز هلیوم برای ایجاد پلاسما در دمای اتاق به صورت تابش نقطه ای برای درمان سلول های سرطانی پستان (MCF\_7) با فرکانس 20 KHz ، ولتاژ 5 KV ، دبی 2.5 L/min در مدت زمان 120 ثانیه با سه دوز مختلف (duty cycle 3,4,5) استفاده شد و با استفاده از آزمایش سمیت سلولی (MTT) درصد زنده ماندن سلول های تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. تست های مهاجرت سلولی و Real Time PCR نیز انجام شد و نتایج توسط دستگاه الایزا مورد سنجش قرار گرفت. طبق نتایج، در آزمایش MTT در  $duty\ cycle = 5\ \mu sec$  بهترین تاثیر پلاسما و بیشترین آپوپتوز دیده شد، همچنین در 72 ساعت پس از درمان، بیشترین افزایش آپوپتوز را نشان داد. اما در تست مهاجرت سلولی نتایج درمان نشان دهنده افزایش مهاجرت سلولی نسبت به گروه کنترل است. نتایج Real Time PCR نشان دهنده این است که در  $Duty\ cycle = 5\ \mu sec$  بیان ژن Bax (ژن القای آپوپتوز) بیشتر بوده و بدین معنا است که بیشترین القاء آپوپتوز را داشته است.

**کلمات کلیدی:** پلاسمای سرد، MCF\_7، MTT، مهاجرت سلولی، Real Time PCR، جت

پلاسما.

# لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

- ۱- اسحقی اسما ؛ سید ایمان حسینی ؛ مهدی مومنی؛ نسیم برهانی ؛ کبری فروغی ؛ نسرین جعفرزاده ” بررسی تاثیر مشعل پلاسمای سرد اتمسفری بر میزان توکسیسیتی و مهاجرت سلولی سلول های سرطان پستان ” ششمین کنفرانس مهندسی و فیزیک پلاسمای ایران، (۲۷ و ۲۸ تیر ماه ۱۳۹۷) ، قزوین.



# فهرست

۱- فصل اول : مفاهیم اولیه.....	۱
۱-۱ مقدمه.....	۲
۲-۱ سرطان پستان.....	۲
۳-۱ پستان.....	۳
۴-۱ درک بهتر سرطان.....	۴
۵-۱ روش های رایج درمان سرطان.....	۵
۶-۱ پلاسما.....	۶
۱-۶-۱ طبقه بندی پلاسما.....	۸
۲-۶-۱ مشخصات عمومی پلاسمای حرارتی و غیر حرارتی.....	۱۰
۷-۱ کاربرد های فیزیک پلاسما.....	۱۲
۱-۷-۱ پلاسمای جو.....	۱۲
۲-۷-۱ شفق قطبی.....	۱۳
۳-۷-۱ هسته های دنباله دارها.....	۱۳
۴-۷-۱ پلاسمای حالت جامد.....	۱۴
۵-۷-۱ تخلیه های گازی.....	۱۴
۶-۷-۱ فیزیک فضا.....	۱۴
۷-۷-۱ معادله ساها.....	۱۴
۸-۷-۱ حفاظ دبای.....	۱۵
۹-۷-۱ طول دبای.....	۱۶
۱۰-۷-۱ پارامترهای پلاسما.....	۱۶
۸-۱ دستگاه های تولید پلاسما.....	۱۷
۱-۸-۱ تخلیه سد دی الکتریک (DBD).....	۲۰
۲-۸-۱ جت پلاسمای اتمسفری.....	۲۰
۲- فصل دوم: پلاسما در پزشکی ، مروری بر تاریخچه و ضرورت انجام این تحقیق.....	۲۳
۱-۲ کاربردهای پلاسمای سرد در پزشکی.....	۲۴
۱-۱-۲ بهداشت بیمارستان.....	۲۴
۲-۱-۲ درمان ضد قارچی.....	۲۴
۳-۱-۲ مراقبت از دندان.....	۲۵
۴-۱-۲ بیماری های پوستی.....	۲۵
۵-۱-۲ زخم های مزمن.....	۲۶

۲۶	۶-۱-۲ آرایشی و بهداشتی
۲۷	۷-۱-۲ واکنش پلاسمای سرد با سلول ها
۲۷	۸-۱-۲ باکتری
۲۸	۹-۱-۲ درمان سرطان
۲۸	۲-۲ پژوهش های مرتبط
۳۱	۳-۲ پیشینه تحقیق
۳۲	۴-۲ ضرورت انجام تحقیق
۳۳	۵-۲ مزیت های پلاسمای اتمسفری سرد
۳۵	۳- فصل سوم: جزییات مراحل و چیدمان آزمایشگاهی
۳۶	۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز
۴۸	۳-۲ شماتیک دستگاه جت پلاسمای اتمسفری سرد
۴۹	۳-۳ مراحل نصب و روشن کردن دستگاه جت پلاسما
۵۰	۳-۴ روش تحقیق
۵۰	۱-۴-۳ کشت سلولی
۵۶	۲-۴-۳ تست MTT
۵۸	۳-۴-۳ تست مهاجرت سلولی
۵۹	۴-۴-۳ واکنش Real Time PCR و بررسی بیان ژنی
۶۷	۴- فصل چهارم: بحث و نتایج مربوط به پردازش پلاسما بر سلول های سرطانی
۶۸	۱-۴ مقدمه
۶۸	۲-۴ شرح آزمایشات و تحلیل نمودارها
۶۸	۱-۲-۴ تست MTT
۸۳	۲-۲-۴ تست MIGRATION
۸۴	۳-۲-۴ واکنش Real Time PCR و بررسی بیان ژنی
۸۹	۵- فصل پنجم: جمع بندی، نتیجه گیری و پیشنهادات برای پژوهش های آینده
۹۰	۱-۵ نتیجه گیری
۹۱	۲-۵ پیشنهادات و کارهای آینده
۹۲	مراجع

# فهرست اشکال

- شکل (۱-۱) پستان.----- ۴
- شکل (۲-۱) سلول سرطانی.----- ۵
- شکل (۳-۱) حالات مختلف ماده [۹].----- ۶
- شکل (۴-۱) اجزای پلاسما.----- ۷
- شکل (۵-۱) تبدیل گاز به پلاسما [۹].----- ۸
- شکل (۶-۱) طبقه بندی پلاسما (دمای الکترون ها در مقابل چگالی الکترون ها) [۹].----- ۱۲
- شکل (۷-۱) شفق قطبی.----- ۱۳
- شکل (۸-۱) کره ی دبای [۱۱].----- ۱۶
- شکل (۱ - ۹) تخلیه پلاسمای تشکیل شده توسط FE-DBD.----- ۱۸
- شکل (۱ - ۱۰) انواع مختلفی از پلاسماهای غیر مستقیم. ۱- سوزن پلاسما ، ۲- جت پلاسمایی گاز آرگون، ۳- جت پلاسمایی گاز هلیوم، ۴- مشعل پلاسمایی.----- ۱۹
- شکل (۱ - ۱۱) پلاسمای Hand Plaster.----- ۲۰
- شکل (۱ - ۱۲) جت پلاسمای اتمسفری سرد گاز هلیوم.----- ۲۱
- شکل (۱-۲) مسواک پلاسمایی.----- ۲۵
- شکل (۲-۲) تصاویر حاصل از میکروسکوپ معکوس سلولهای MCF-7 تحت تاثیر پلاسمای اتمسفری سرد. A: نمونه شاهد، یعنی سلولهایی که تحت درمان با پلاسما قرار نگرفتند ، B:درمان با پلاسما به مدت 15 ثانیه ، C: درمان با پلاسما به مدت 30 ثانیه، D: درمان با پلاسما به مدت 45 ثانیه [۱۸].----- ۲۹
- شکل (۱-۳) پلیت ۹۶ خونه ای.----- ۳۶
- شکل (۲-۳) دستگاه کلی جت پلاسما شامل منبع تغذیه ، تورچ ، کپسول گاز هلیوم و دستگاه تنظیم جریان گاز.----- ۳۷
- شکل (۳-۳) منبع تغذیه BK9401 و هد پلاسما جت.----- ۳۸
- شکل (۴-۳) دستگاه تنظیم جریان گاز.----- ۴۰
- شکل (۵-۳) کپسول گاز هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹.----- ۴۱
- شکل (۶-۳) Elisa Reader.----- ۴۲
- شکل (۷-۳) انکوباتور کربن دی اکسید.----- ۴۳
- شکل (۸-۳) دستگاه پیکودراپ.----- ۴۵
- شکل (۹-۳) دستگاه الکتروفورز.----- ۴۶
- شکل (۱۰-۳) دستگاه سانتریفیوژ.----- ۴۷
- شکل (۱۱-۳) شکل شماتیکی دستگاه جت پلاسما.----- ۴۸
- شکل (۱۲-۳) مشعل پلاسما.----- ۴۹
- شکل (۱-۴) ظرف ۹۶ خانه ای اولین تست MTT.----- ۶۹

- شکل (۲-۴) عکس های گرفته شده از سلول ها در تست اول MTT. ۷۱-----
- شکل (۳-۴) نمودار جذب نوری ۱۰۰۰۰ سلول برحسب زمان در ولتاژهای ۳ و ۴ کیلو ولت بعد از ۲۴ ساعت. ۷۲-----
- شکل (۴-۴) ظرف ۹۶ خانه ای تست MTT. ۷۵-----
- شکل (۵-۴) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول برحسب پهنای پالس با واحد ( $\mu sec$ ) بعد از ۲۴ ساعت. ۷۶-----
- شکل (۶-۴) عکس های گرفته شده از سلول ۲۴ ساعت بعد از درمان با پلاسما. ۷۷-----
- شکل (۷-۴) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول برحسب پهنای پالس با واحد ( $\mu sec$ ) بعد از ۴۸ ساعت. ۷۸-----
- شکل (۸-۴) عکس های گرفته شده از سلول ۴۸ ساعت بعد از درمان با پلاسما. ۷۹-----
- شکل (۹-۴) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول برحسب duty cycle بعد از ۷۲ ساعت. ۸۰-----
- شکل (۱۰-۴) عکس های گرفته شده از سلول ۷۲ ساعت بعد از درمان با پلاسما. ۸۱-----
- شکل (۱۱-۴) تعداد سلول مهاجرت کرده برحسب duty cycle. ۸۳-----
- شکل (۱۲-۴) تغییرات ژن آپوپتوزی Bax تحت تاثیر Duty Cycle های مختلف پلاسما. ۸۵-----
- شکل (۱۳-۴) منحنی ذوب (melt curve). ۸۶-----

## فهرست جداول

- جدول (۱-۱) طبقه بندی حرارتی پلاسما----- ۹
- جدول (۲-۱) مشخصات عمومی پلاسماهای حرارتی و غیرحرارتی----- ۱۱
- جدول (۱-۴) شکل شماتیکی پلیت تست اول MTT----- ۶۹
- جدول (۲-۴) شرایط مختلف پلاسمایی----- ۷۳
- جدول (۳-۴) خواندن جذب نوری شرایط مختلف پلاسمایی----- ۷۴



# ۱- فصل اول : مفاهيم اوليه

سرطان پستان شایعترین نوع سرطان در میان زنان ساکن در کشورهای توسعه یافته است که متاسفانه ۱۲٪ از سرطانهای پستان در سنین ۲۰ تا ۳۴ سالگی رخ می دهند [۱]. سرطان پستان پنجمین عامل منجر به مرگ در میان سایر بدخیمی هاست. سالانه هشت هزار و نود مورد جدید مبتلا به سرطان پستان شناخته می شوند که از این میان بیش از ۱۳۰۰ بیمار در هر سال جان خود را از دست می دهند. این شیوع بالا مهمترین علت بررسی راه های متفاوت درمان این بیماری است [۲]. پلاسمای پزشکی یک حوزه در حال شکل گیری شامل ترکیبی از فیزیک پلاسمای و مهندسی پزشکی، پزشکی، مهندسی زیستی است که استفاده از پلاسمایها را برای مصارف درمانی بررسی می کند. پیشرفت های اخیر در پلاسمایهای اتمسفری باعث ایجاد پلاسمایهای سرد با درجه حرارت یونی نزدیک به دمای اتاق شده اند. در برنامه های اولیه، با استفاده از پلاسمایها سطوح غیر زنده تحت درمان قرار گرفتند که در نتیجه، اثرات مطلوبی در تحقیقات زیست پزشکی داشته است [۳]. در این پژوهش هدف، بررسی کاربرد پلاسمای اتمسفری سرد در درمان سرطان پستان می باشد.

## ۲-۱ سرطان پستان

سرطان پستان دومین عامل مهم مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان می باشد. سرطان پستان، تمایل زیادی به متاستاز<sup>۱</sup> استخوان دارد که در نتیجه عوارض ناتوان کننده استخوانی را به همراه خواهد داشت. به طور متوسط، ۸۵ درصد از افراد مبتلا به سرطان پستان پیشرفته دچار متاستاز استخوانی می شوند. برای رشد سلول های سرطانی منتشر شده در اسکلت استخوانی، سلول های سرطانی باید در مغز استخوان جای بگیرند، محلی که سلول های متاستاتیک سرطان پستان در استخوان تکثیر شده و فرایندهای بازسازی طبیعی استخوان را مختل می کنند. گزینه های درمانی امروز سرطان پستان شامل جراحی و رادیوتراپی محدودیت های زیادی دارند از جمله ریشه کنی ناکامل و

<sup>1</sup> Metastasis

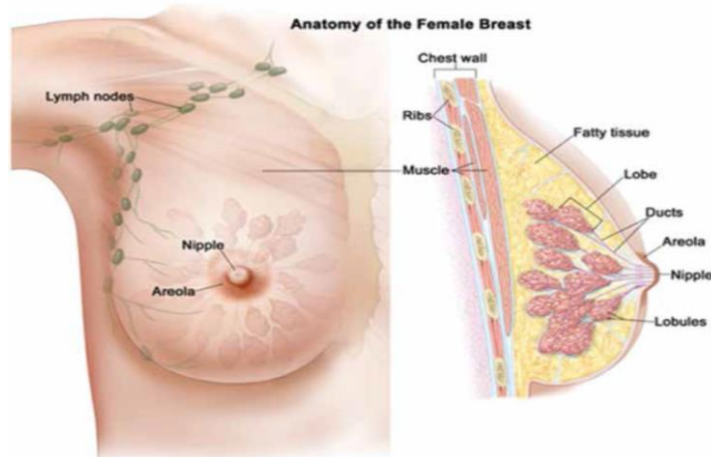


غیرانتخابی سلول های سرطانی. در نتیجه، درمان های جدید می توانند به صورت انتخابی تومورها و سلول های سرطانی گذرا را از بین ببرند، در حالی که تعداد زیادی از سلول های سالم و بافت ها دست نخورده باقی خواهند ماند [۴].

### ۳-۱ پستان

پستان ها در ناحیه قفسه سینه که دنده ها را می پوشانند قرار دارند. هر پستان از ۱۵ تا ۲۰ لوب تشکیل شده، که هر کدام از این لوب ها لوبول های ریزتری دارند. لوبول ها هم شامل غده های ریزی هستند که می توانند شیر تولید کنند. بعد از تولد نوزاد، شیر از لوبول ها به لوله های نازکی به نام مجاری شیری می ریزد و به نوک پستان می رسد. نوک پستان در مرکز ناحیه تیره رنگی از پوست به نام هاله پستان قرار دارد. بین لوبول ها و مجاری شیری را چربی و بافت فیبروز پر کرده است.

در پستان همچنین عروق لنفاوی هم وجود دارند، که این رگ ها به اندام گرد و کوچکی به نام غدد لنفاوی منتهی می شوند. دسته های غدد لنفاوی نزدیک پستان در زیر بغل، بالای استخوان ترقوه و در قفسه سینه پشت پستان قرار دارند. غدد لنفاوی باکتری ها، سلول های سرطانی و هر ماده مضر دیگری را به خود جذب می کنند.



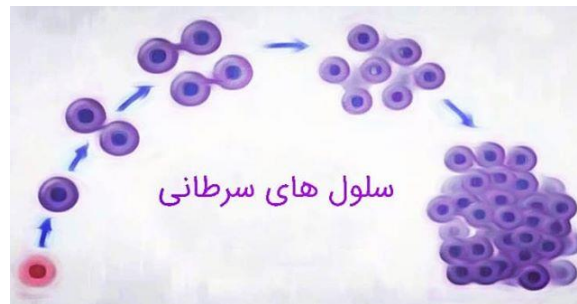
شکل (۱-۱) پستان.

## ۴-۱ درک بهتر سرطان

سرطان از سلول، یعنی بلوک‌هایی که بافت را می‌سازند شروع می‌شود و بافت‌ها هم اعضای بدن را می‌سازد. معمولاً سلول‌ها با نیاز بدن، رشد می‌کنند و سلول‌های جدید را تشکیل می‌دهند. سلولی که پیر می‌شود، می‌میرد و سلول‌های جدید دیگری جای آن را می‌گیرند. گاه در این روند اشکال به وجود می‌آید و در حالی که بدن نیازی ندارد، سلول‌های جدید تشکیل می‌شوند و سلول‌های پیر هم وقتی که باید، نمی‌میرند. این سلول‌های اضافی توده‌ای از بافت‌ها را تشکیل می‌دهند که به آنها توده، غده یا تومور می‌گویند.

سلول‌های سرطانی در صورت انتشار، معمولاً در غدد لنفاوی نزدیک پستان یافت می‌شوند. سرطان پستان هم تقریباً به تمام نقاط دیگر بدن منتشر می‌شود. رایج‌ترین نقاط عبارتند از استخوان‌ها، کبد، ریه‌ها و مغز. تومور جدید هم همان سلول‌های غیرعادی و همان نام تومور اولیه را دارد. مثلاً اگر سرطان پستان به استخوان‌ها سرایت کند، سلول‌های سرطانی داخل استخوان در واقع سلول‌های سرطان پستان هستند. نام بیماری هم سرطان متاستاتیک پستان است، نه سرطان استخوان؛ به همین دلیل درمان آن هم مانند درمان سرطان پستان است نه سرطان استخوان. پزشکان این نوع سرطان

جدید را تومور «دوردست» یا بیماری متاستاتیک می نامند. تومور یا خوش خیم و یا بدخیم است. تومورهای خوش خیم به ندرت خطر جانی دارند ولی تومورهای بدخیم به طور کلی وخیم تر از تومورهای خوش خیم هستند و اغلب خطر جانی دارند [۵].



شکل (۱-۲) سلول سرطانی.

## ۵-۱ روش های رایج درمان سرطان

درمان های رایج شامل جراحی، هورمون درمانی، پرتو درمانی و شیمی درمانی و درمان بیولوژیک است. شناخته شده ترین عوارض آنها شامل ریزش مو، تهوع و استفراغ، کاهش سلولهای خونی، اشکالات قاعدگی و غیره هستند. صرف نظر از عوارض جانبی، مهمترین نقص آن، عملکرد غیرانتخابی این روشهاست، زیرا علاوه بر سلولهای سرطانی، سلولهای سالم را نیز مورد هدف قرار می دهند [۱].

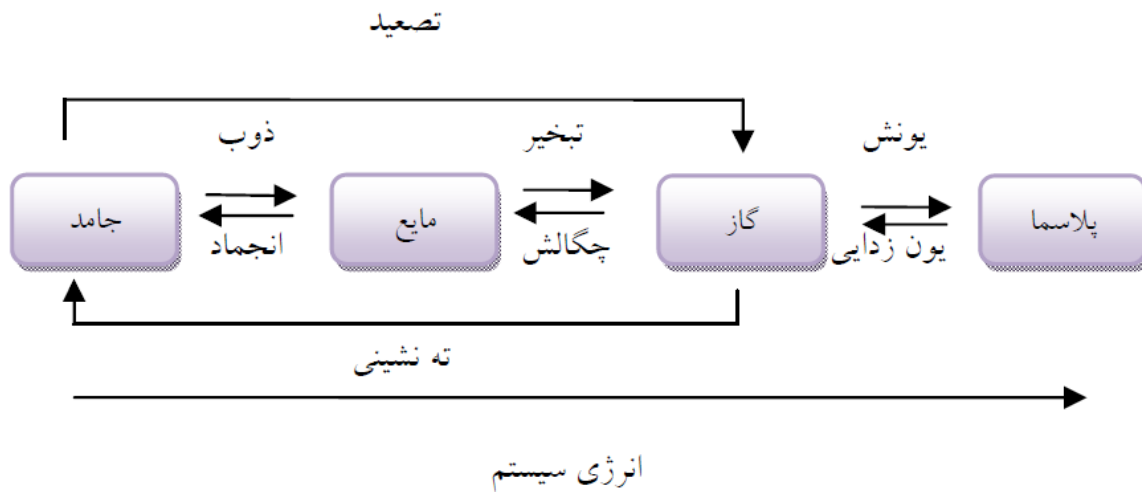
شیمی درمانی و رادیوتراپی به دلیل خواص سمی برای سلول های سالم و سلول های جنسی موجب از دست رفتن عملکرد سلول های سالم و نیز سلول های جنسی در بیضه و تخمدان می شود [۶-۷].

جراحی های لیزر سنتی، مبتنی بر واکنش های حرارتی هستند و باعث مرگ تصادفی سلول ها می شوند و حتی ممکن است آسیب دائمی به بافت وارد کنند. در مقابل، واکنش های غیرحرارتی پلاسماها با بافت می تواند شرایط حذف اختصاصی سلول ها را بدون آسیب زدن به کل بافت فراهم کند. این واکنش ها شامل جدا شدن سلول ها بدون اثرگذاری روی بقای سلول ها و مرگ سلولی قابل

کنترل و غیره می باشند. استفاده از پلاسما به صورت کلی مزیت هایی دارد که هیچ گاه در جراحی های لیزر بسیار پیشرفته در نظر گرفته نشده اند [۸].

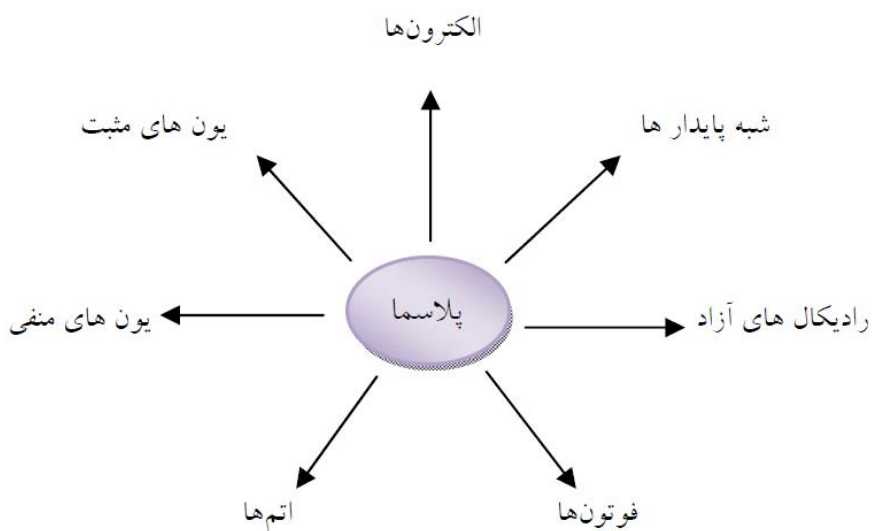
## ۶-۱ پلاسما

پلاسما یکی از چهار فاز اصلی ماده است. (سه فاز دیگر: جامد، مایع، گاز) پلاسما گاز شبه خنثایی از ذرات باردار و خنثی است که رفتار جمعی از خود ارائه می دهد.



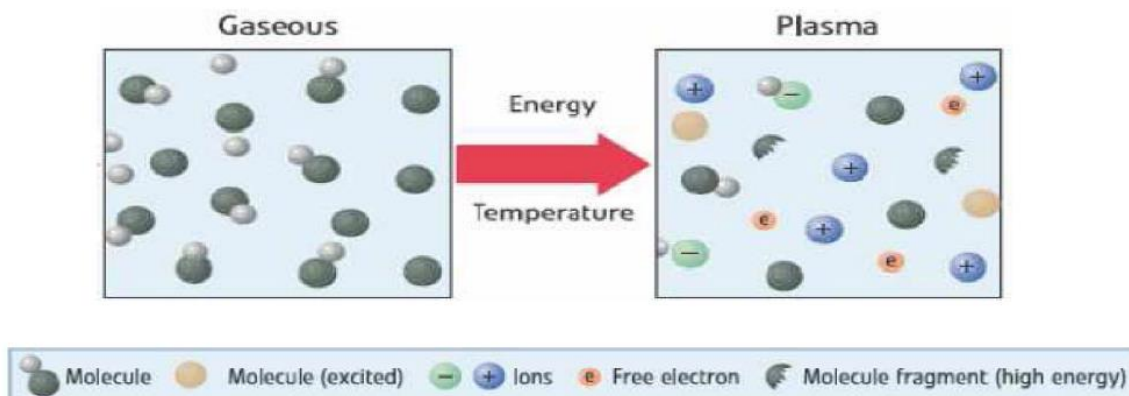
شکل (۱-۳) حالات مختلف ماده [۹].

پلاسما شامل ترکیبی از ذرات فعال، شامل الکترون ها، یون ها، رادیکال های آزاد، مولکول های گاز فعال شده و فوتون ها می باشد. بعضی از این ترکیب شامل اکسیژن فعال و گونه های نیتروژن مانند اوزون، سوپراکسید، رادیکال های هیدروکسیل، اکسیژن های اتمی، اکسید نیتریک، دی اکسید نیتروژن، نیتريت و نیترات می باشد [۱۰].



شکل (۴-۱) اجزای پلازما.

مولکول‌های گازی تحت تاثیر انرژی و دما به مولکول‌های برانگیخته، یون‌های مثبت و منفی، الکترون‌های آزاد و مولکول‌های شکسته شده با انرژی بالا تبدیل می‌شوند، (شکل (۴-۱)) بنابراین پلازما شامل ذرات باردار ( یون‌ها، الکترون‌های آزاد ) و گونه‌های فعال خنثی شامل مولکول‌های گازی، رادیکال‌های آزاد، شبه پایدارها و همچنین فوتون‌های UV می‌باشد. از نقطه نظر کاربردی، پلازما به طور فیزیکی و شیمیایی یک محیط متشکل از گازهای فعال است که می‌تواند به طور مؤثر برای کاربردهای زیادی مورد استفاده قرار گیرد[۹].



شکل (۱-۵) تبدیل گاز به پلاسما [۹].

### ۱-۶-۱ طبقه بندی پلاسما

از نقطه نظر حرارتی، پلاسماها می توانند در دو گروه اصلی یعنی پلاسماهای دمای بالا یا همجوشی و پلاسماهای دمای پایین یا تخلیه ی گازی قرار گیرند که طبقه بندی حرارتی پلاسما در جدول (۱-۱) نشان داده شده است. پلاسماهای دمای بالا اشاره دارد بر این که همه ی گونه ها (یون ها، الکترون ها، گونه های خنثی) در حالت تعادل گرمایی هستند. همانطور که در جدول (۱-۱) می بینیم، پلاسماهای دمای پایین نسبت به پلاسماهای حرارتی بیشتر به اجزای فرعی تقسیم شده است و پلاسماهای شبه متعادل نامیده می شود، که در یک تعادل ترمودینامیکی محلی است و پلاسماهای غیر حرارتی ، پلاسماهای غیر تعادلی یا پلاسماهای سرد نامیده می شود.

در پلاسماهای حرارتی بین الکترون ها، یون ها و گونه های خنثی یک تعادل وجود دارد. در تعادل حرارتی، الکترون های متحرک در میدان الکتریکی منجر به ایجاد انرژی جنبشی و شتاب بالایی می شوند.

اما یون های سنگین به علت اینرسی قابل توجهشان نمی توانند مقدار زیادی از انرژی الکتریکی را جذب کنند. بنابراین نقش کمتری نسبت به الکترون ها برای افزایش شتاب و انرژی جنبشی دارند. همچنین برای رسیدن به تعادل حرارتی با دمای یکنواخت، در توزیع و انتقال انرژی داخلی به منظور

بقای انرژی جنبشی و تکانه در برخورد های الاستیک، انتقال انرژی مؤثر در میان گونه های سنگین (یون ها و گونه های خنثی) ضروری است. این انتقال انرژی به نسبت جرم گونه های واکنشی وابسته می باشد. دستگاه های تولید کننده ی پلاسماهای حرارتی، با تولید جریان بالایی از حرارت به طور عمده در زمینه هایی مانند پزشکی، صنعتی و پردازش مواد مورد استفاده قرار می گیرند.

### جدول (۱-۱) طبقه بندی حرارتی پلاسما

مثال	حالت	پلاسما
پلاسمای همجوشی، پلاسما-های تولید شده با لیزر	$T_e \approx T_i \approx T_g, T_p = 10^6 - 10^8 \text{ K}$ $n_e \geq 10^{14} \text{ cm}^{-3}$	پلاسمای دمای بالا (پلاسمای تعادلی)
	پلاسمای دمای پایین	
پلاسمای قوس، شعله های پلاسما	$T_e \approx T_i \approx T_g \leq 2 \times 10^4 \text{ K}$ $n_e \geq 10^{14} \text{ cm}^{-3}$	پلاسمای حرارتی (پلاسمای شبه متعادل)
تخلیه های تابان، تخلیه ی تاج، DBD، جت پلاسمای فشار اتمسفری	$T_e \gg T_i \approx T_g = 300 - 10^3 \text{ K}$ $n_e \approx 10^4 \text{ cm}^{-3}$	پلاسمای غیرحرارتی (پلاسمای غیر متعادل)

پلاسماهای سرد به پلاسماهایی نسبت داده می شوند که انرژی الکتریکی، کانالی از اجزای الکترونی پلاسما را می سازد، بدین وسیله الکترون های پر انرژی به جای گرم کردن، جریان گازی تولید می کنند که گونه های خنثی و یون ها در دمای اتاق یا نزدیک به دمای اتاق باقی می مانند و چون یون ها و گونه های خنثی نسبتاً سرد هستند، این پلاسماها برای درمان مواد حساس به گرما شامل پلیمرها و بافت های زنده مورد استفاده قرار می گیرند. در پلاسماهای فشار پایین و یونیزه شده ی ضعیف، تعادل غیرحرارتی به علت چگالی کم الکترون، در حدود کمتر از  $10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ، و فرکانس برخوردی پایین متناظر بین الکترونها و ذرات سنگین حاصل می شود. همچنین تعادل غیرحرارتی در تخلیه ی

الکتريکی با عمر کوتاه مثل کانال میکرو تخلیه در تخلیه ی سد دی الکتريک یا رگه های جريان در تخلیه ی کرونا ( $100\text{ ns}$ ) علیرغم چگالی الکترونی محلی بالا ( $10^{20}\text{ cm}^{-3}$ ) و فرکانس برخورد زیاد، در فشار اتمسفر به دست می آید. ویژگی های قابل ملاحظه پلاسمای سرد، بهره برداری از این منابع پلاسمای را در گستره ی وسیعی از کاربردها فراهم می کند.

### ۱-۶-۲ مشخصات عمومی پلاسمای حرارتی و غیر حرارتی

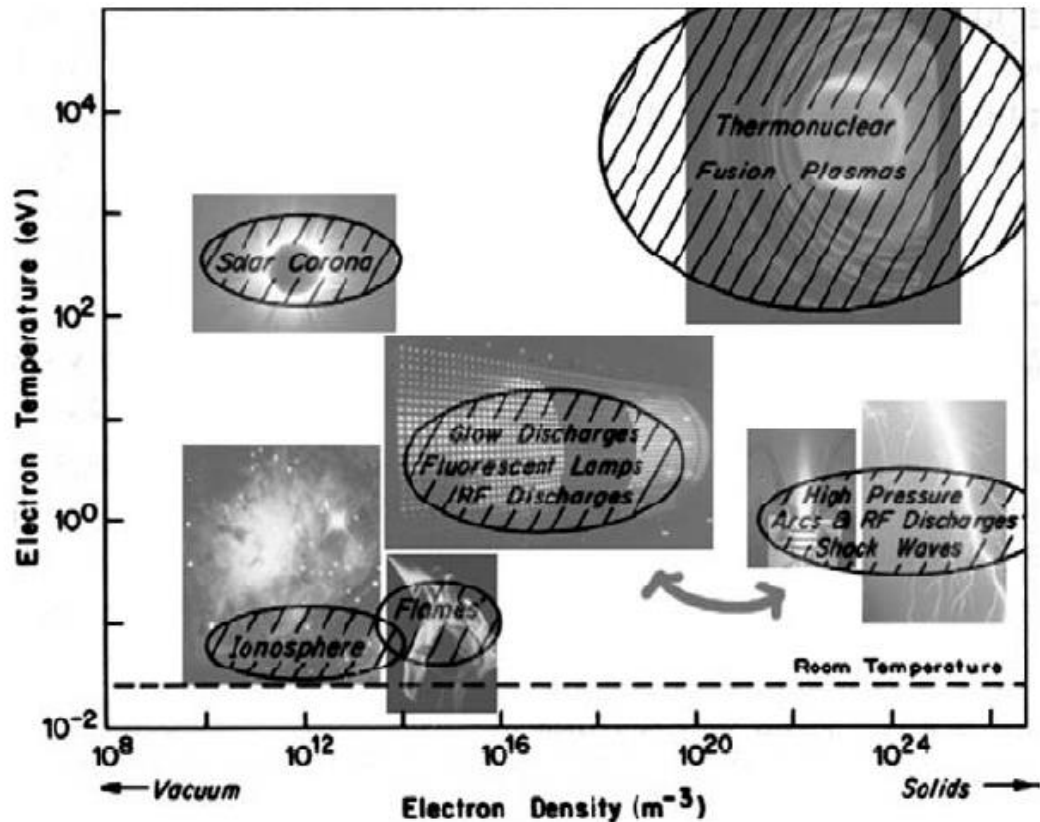
پلاسمای واکنشی غیرحرارتی توسط تخلیه های الکتريکی تغذیه شده با میدان الکتريکی ثابت، متناوب یا پالسی ایجاد می شود. دمای الکترونی در یک پلاسمای غیرحرارتی حدود  $3000 - 10000\text{ K}$  می باشد، اما دمای میانگین گاز زمینه حدود  $300 - 500\text{ K}$  است. الکترون های پر انرژی به علت برخورد با اتم ها و مولکول ها، گونه های فعال شیمیایی متعددی را تولید می کنند. به عنوان مثال، در مورد ترکیبات گازی شامل  $O_2$  و  $H_2O$ ، اکثر رادیکال های اصلی  $O$  و  $OH$  هستند.



## جدول (۱-۲) مشخصات عمومی پلاسماهای حرارتی و غیرحرارتی

پلاسماهای LTE	پلاسماهای Non-LTE
پلاسماهای حرارتی	پلاسماهای غیرحرارتی
$T_e = T_h$	$T_e \gg T_h, T_h < 500 \text{ k}$
چگالی الکترونی بالا: $10^{18} - 10^{22} \text{ cm}^{-3}$ برخوردهای غیر الاستیک بین الکترون‌ها و ذرات سنگین، گونه‌های واکنشی پلاسما را تولید می‌کند، در حالیکه برخوردهای الاستیک موجب گرم شدن ذرات سنگین می‌شوند. بنابراین انرژی الکترون‌ها تحلیل می‌رود.	چگالی الکترونی کمتر از: $10^{13} \text{ cm}^{-3}$ برخوردهای غیر الاستیک بین الکترون‌ها و ذرات سنگین موجب فعالیت شیمیایی پلاسما می‌شود. ذرات سنگین توسط برخوردهای الاستیک گرم می‌شوند. بنابراین انرژی الکترون‌ها بسیار بالا باقی می‌ماند.
پلاسماهای قوس	تخلیه‌های تابان
$T_h = T_e \approx 10000 \text{ K}$	$T_e \approx 1000 - 10000 \text{ K}$ $T_h \approx 300 - 500 \text{ K}$

خواص پلاسما با توجه به نوع منبع انرژی و مقادیر انرژی انتقال یافته به پلاسما، از طریق شرایط چگالی الکترونیکی یا دما تغییر می‌کند. این دو پارامتر پلاسماها را در رده‌های متفاوتی تمایز می‌دهد. نوع گاز پلاسما مهم است، زیرا دمای پلاسما را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در حقیقت، پلاسماهای تخلیه‌های تابان، دماهای پایین و واکنش‌های شیمیایی بالایی را در برمی‌گیرند، در حالیکه تخلیه‌های قوس دماهای بسیار بالاتری را فراهم می‌کنند. بنابراین پلاسماهایی شبیه تخلیه‌های تابان برای کاربردهایی مناسب هستند که نیاز به دمای پایین و واکنش شیمیایی بالایی دارند. پلاسماهای شبیه تخلیه‌های قوس برای کاربردهای دمای بالا مورد نیاز هستند. شکل (۱-۶) طبقه‌بندی منابع مختلف پلاسما را در رابطه با چگالی الکترونی و دما نمایش می‌دهد [۹].



شکل (۶-۱) طبقه بندی پلاسما (دمای الکترون ها در مقابل چگالی الکترون ها) [۹].

## ۷-۱ کاربرد های فیزیک پلاسما

### ۱-۷-۱ پلاسمای جو

نزدیکترین پلاسما به کره زمین، یونسفر است که از ۱۵۰ کیلومتری سطح زمین شروع می شود و به طرف بالا ادامه می یابد. لایه های بالاتر یونسفر، سیستم هایی فیزیکی به فرم پلاسما هستند که توسط تابش های با طول موج کوتاه در طیف وسیعی از پرتوهای فرابنفش گرفته تا پرتوهای ایکس و همچنین پرتوهای کیهانی و الکترون هایی که به یونسفر برخورد می کنند، یونیزه می شوند.

### ۱-۷-۲ شفق قطبی

پدیده شفق شمالی نیز گونه ای پلاسما است که تحت اثر یونیزه شدن ذرات باردار به دام افتاده در میدان مغناطیسی زمین ایجاد می شود. یونسفر پلاسمایی با قابلیت جذب پرتوهای ایکس، فرابنفش، تابش خورشیدی، بازتاب امواج کوتاه و رادیویی اهمیت اساسی در ارتباط رادیویی در سراسر جهان دارد. زهره و مریخ نیز لایه یونسفری دارند.



شکل (۱-۷) شفق قطبی.

### ۱-۷-۳ هسته های دنباله دارها

خورشید منظومه شمسی مانند یک کره پلاسمایی است. درخشندگی زیاد خورشید مانند درخشندگی پلاسمایی است. خورشید از سه بخش گازی فتوسفر، کروموسفر و کورونا (که دمای کرونای آن بیش از یک میلیون درجه سانتی گراد است) تشکیل شده است و انتظار می رود که هزاران سال به درخشندگی خود ادامه بدهد.

## ۴-۷-۱ پلاسمای حالت جامد

الکترون های آزاد و حفره ها در نیمه رساناها، پلاسمایی را تشکیل می دهند که همان نوع نوسانات و ناپایداری های یک پلاسمای گازی را دارد.

## ۵-۷-۱ تخلیه های گازی

قدیمی ترین کار با پلاسمای، مربوط به لانگمیر، تانکس و همکاران آنها در سال ۱۹۲۰ می شود. تحقیقات در این مورد، از نیازی سرچشمه می گرفت که برای توسعه لوله های خلا ای که بتوانند جریانهای قوی را حمل کنند، و در نتیجه می بایست از گازهای یونیزه پر شوند احساس می شد.

## ۶-۷-۱ فیزیک فضا

کاربرد مهم دیگر فیزیک پلاسمای، مطالعه فضای اطراف زمین است. جریان پیوسته هایی از ذرات باردار که باد خورشیدی خوانده می شود، به مگنتوسفر زمین برخورد میکند. درون و جو ستارگان آن قدر داغ هستند که میتوانند در حالت پلاسمای باشند.

## ۷-۷-۱ معادله ساها

این معادله مقدار یونیزاسیون انتظاری یک گاز در تعادل گرمایی را مشخص می کند.

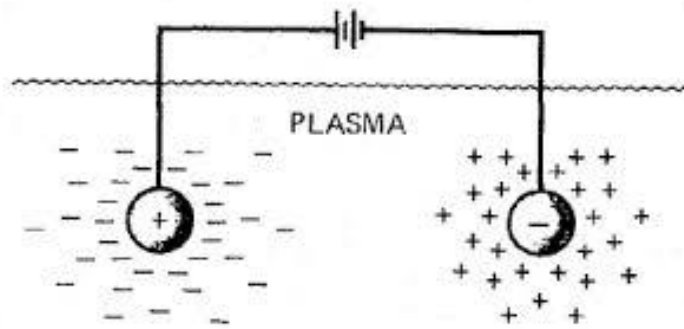
$$\frac{n_i}{n_n} = 2.4 \times 10^{21} \frac{T^{\frac{3}{2}}}{n_i} e^{-\frac{U_i}{KT}} \quad (1-1)$$

در این رابطه  $n_n, n_i$  به ترتیب چگالی اتم های یونیزه شده و اتم های خنثی (تعداد بر متر مکعب) ،  $T$  دمای گاز بر حسب کلونین،  $K$  ثابت بولتزمن و  $U_i$  انرژی یونش گاز است. در دمای اتاق برای هوای معمولی می توان چگالی مولکول ها را در حدود  $3 \times 10^{25} m^{-3}$  ، دما  $300^\circ K$  و انرژی یونش را  $14.5 \text{ eV}$  (برای گاز نیتروژن) در نظر گرفت. کسر یونیزاسیون چیزی در حدود  $10^{-122}$   $\frac{n_i}{n_n}$

است. زمانی که دما افزایش می یابد، درجه ی یونیزاسیون مادامی که  $U_i$  چند برابر  $KT$  است کم باقی می ماند. سپس  $\frac{n_i}{n_n}$  بطور ناگهانی افزایش می یابد و گاز به پلاسما تبدیل می شود. در واقع دلیل اینکه در اجرام آسمانی پلاسما وجود دارد همین دمای بسیار زیاد این اجرام است.

### ۱-۷-۸ حفاظ دبای

اگر مانند شکل دو کره ی رسانا را که به دو قطب یک پتانسیل خارجی متصل است وارد پلاسما کنیم یون ها به سمت کره ی منفی و الکترون ها به سمت کره ی مثبت حرکت می کنند. در این حالت اگر پلاسما سرد باشد و فاقد حرکت های گرمایی باشد، بار زیادی در ابر اطراف کره ها قرار می گیرد که این بار پتانسیل موثر خارجی را تضعیف می کند به طوری که میدان به داخل پلاسما نفوذ نمی کند. به این اثر حفاظ دبای گفته می شود. از طرف دیگر اگر دما محدود و معین باشد ذراتی که در لبه ی ابر، یعنی جایی که میدان ضعیف است قرار دارند، انرژی حرارتی لازم برای فرار از چاه پتانسیل الکترواستاتیکی پیدا می کنند. در این صورت لبه ی ابر در شعاعی واقع می شود که در آن انرژی پتانسیل تقریباً برابر انرژی حرارتی  $KT$  ذرات است و حفاظ کامل نیست. پتانسیل هایی در حدود  $KT/e$  می توانند به داخل پلاسما نشت کرده و سبب ایجاد میدان های الکتریکی معینی در آن شوند.



شکل (۸-۱) کره ی دبای [۱۱].

### ۹-۷-۱ طول دبای

با استفاده از حل معادله ی پواسون یک بعدی و فرض اینکه جرم الکترون ها در مقایسه با جرم یون ها بسیار کوچک است می توان پتانسیل  $\phi(x)$  را بصورت فرمول زیر نوشت.

$$\phi(x) = \phi_0 \exp(-|x|/\lambda_D) \quad (۲-۱)$$

در این رابطه  $\lambda_D$  طول دبای نامیده می شود اندازه ای از فاصله حفاظ یا ضخامت غلاف را می دهد که در آن پتانسیل به  $1/e$  پتانسیل سطح می رسد.

### ۱۰-۷-۱ پارامترهای پلاسما

پلاسما دارای پارامترهای مهمی است که در ادامه به بررسی آنها می پردازیم.

(۱) با استفاده از معادله زیر می توان تعداد ذرات موجود در یک کره ی دبای یعنی  $N_D$  را

محاسبه کنیم.

$$N_D = n \frac{4}{3} \pi \lambda_D^3 = 1.38 \times 10^6 T^{\frac{3}{2}} n^{\frac{1}{2}} \quad (۳-۱)$$

بدیهی است که اگر در ناحیه ی غلاف تعداد اندکی ذره وجود داشته باشد حفاظ دبای از لحاظ

آماری مفهومی غیر معتبر خواهد بود پس باید داشته باشیم:  $N_D \gg 1$

(۲) ملاک پلاسما بودن یک گاز یونیزه این است که چگالی آن به قدری بزرگ باشد که  $\lambda_D$  در مقایسه با ابعاد دستگاه L بسیار کوچک باشد.

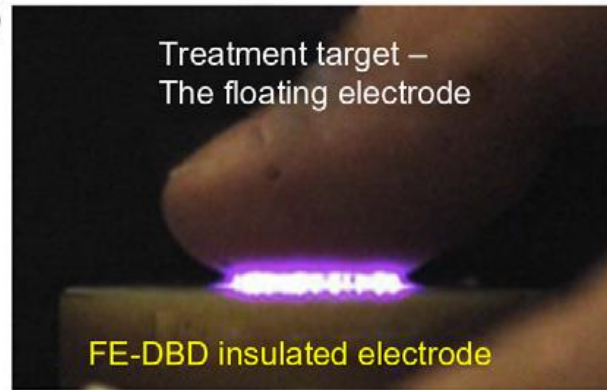
(۳) سومین شرط مهم برای وجود پلاسما این است که در واقع حرکت ذرات بیشتر توسط نیروهای الکترومغناطیسی کنترل شود تا نیروهای هیدرودینامیکی معمولی. اگر  $\omega$  بسامد نوعی نوسانهای پلاسما و  $\tau$  زمان متوسط بین برخوردها با اتمهای خنثی باشد، برای آنکه گاز مانند پلاسما، و نه یک گاز خنثی، رفتار کند لازم است که  $\omega\tau > 1$  [۱۱].

## ۸-۱ دستگاه های تولید پلاسما

روش های مختلف برای تولید پلاسما اتمسفر سرد وجود شرح زیر است: تخلیه دی الکتریک (DBD)، جت پلاسمای فشار اتمسفری (APPJ)، سوزن پلاسما و مداد پلاسمایی.

منابع CAP را می توان براساس مکانیسم اصلی تولید و کاربردها، به سه گروه اصلی زیر تقسیم کرد:

(a) **پلاسماهای مستقیم** که از بافت زنده یا اندام ها به عنوان الکتروود استفاده می کنند، و در نتیجه ذرات بافت های زنده به صورت مستقیم در فرایندهای تخلیه فعال پلاسمها شرکت می کنند. برخی جریان ها از طریق بافت های زنده به شکل جریان هدایتی کوچک، جریان جایگزین یا هر دو جابه جا می شوند. جریان رسانا باید محدود شود تا هیچ اثر حرارتی یا تحریک الکتریکی روی عضلات به وجود نیاید.

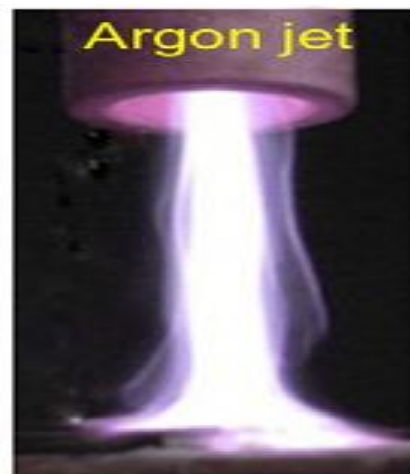


شکل (۱-۹) تخلیه پلاسمای تشکیل شده توسط FE-DBD.

(b) پلاسماهای غیرمستقیم، بین دو الکترود تولید و سپس به ناحیه مورد استفاده و محدود شده در جریان گازی، منتقل می شوند. انواع مختلفی از ساختارهای متفاوت از منابع پلاسمای غیرمستقیم از نظر اندازه، نوع گاز و قدرت وجود دارند. طیف این مواد از سوزن های پلاسمایی بسیار نازک تا مشعل های پلاسمایی بزرگ نشان داده شده در تصویرهای (۱) تا (۴) متغیر است.



(۱)

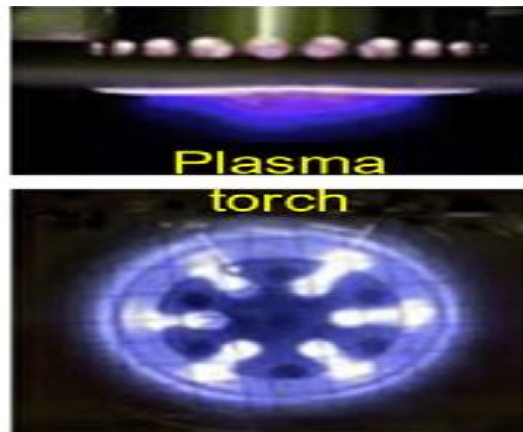


(۲)





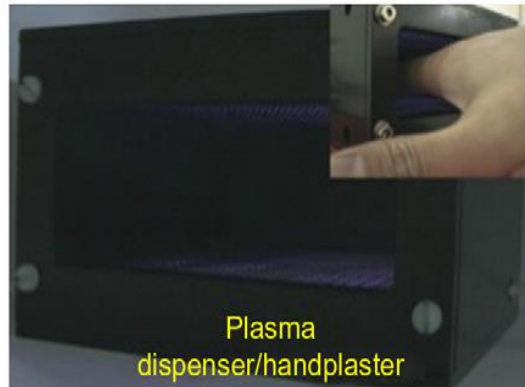
(۳)



(۴)

شکل (۱- ۱۰) انواع مختلفی از پلاسماهای غیر مستقیم. ۱- سوزن پلاسما ، ۲- جت پلاسمایی گاز آرگون، ۳- جت پلاسمایی گاز هلیوم، ۴- مشعل پلاسمایی.

C) پلاسماهای ترکیبی که روش تولید پلاسما مستقیم را با ویژگی های فاقد جریان پلاسما غیرمستقیم ترکیب می کند، ویژگی هایی که با وارد کردن الکتروود شبکه ای سیمی به دست آمده اند، و مقاومت الکتریکی بسیار پایین تری نسبت به پوست دارند. در نتیجه در عمل همه جریان ها از شبکه سیمی عبور می نمایند. یکی از بهترین مثال ها، پخش کننده پلاسما به اسم HandPlaster می باشد که در شکل زیر نشان داده شده است (موسسه ماکس-پلانک، آلمان).



شکل (۱-۱) پلاسمای Hand Plaster.

### ۱-۸-۱ تخلیه سد دی الکتریک (DBD)

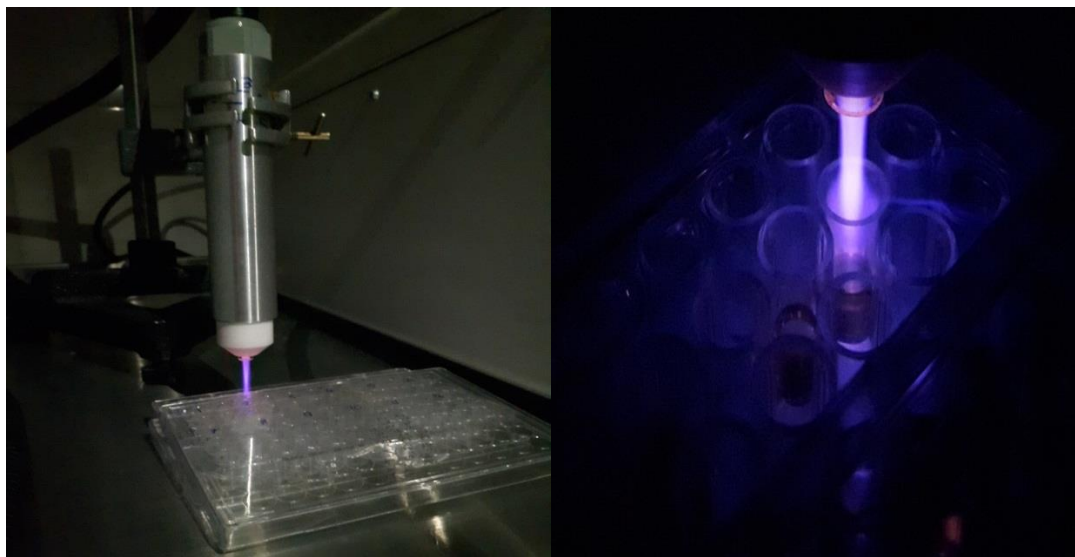
کاربردهای DBD شامل استرلیزاسیون بافت زنده، غیر فعال کردن باکتری، رگ زایی، درمان سطح و غیره است. DBD متشکل از دو الکترود فلزی مسطح که توسط یک ماده دی الکتریک تحت پوشش قرار گرفته است و بین آنها یک گاز یونیزه برای تولید یک پلاسما وجود دارد. یکی از الکترودها الکترود ولتاژ بالا است و الکترود دیگر، الکترود زمینه ای است که برای تولید پلاسما ولتاژ بالا مورد نیاز است.

### ۱-۸-۲ جت پلاسمای اتمسفری

جت های پلاسما، یک نازل گازی را شامل می شوند که در آنها یک یا دو الکترود به کار برده شده است. پلاسما درون نازل تولید می شود و با یک جریان گازی بر روی اجسام منتقل می شود. تعداد بسیار زیادی پلاسما جت وجود دارند که در دسترس هستند و در متون مختلف توصیف شده اند. اصولاً، اختلاف تمام این پلاسما جت ها در پیکربندی الکترود، نوع گاز و فرکانس ولتاژ اعمال شده آنها

است. جت های پلاسمایی باید شرایط خاص زیادی داشته باشند، از جمله درجه حرارت پایین، عملکرد ثابت در فشار جو و عدم خطر جرقه زدن [۱۲].

در این تحقیق ما از دستگاه جت پلاسمای فشار اتمسفری گاز هلیوم برای القاء آپوپتوز در کشت سلول های سرطان پستان انسان رده ی MCF-7 استفاده کردیم.



شکل (۱- ۱۲) جت پلاسمای اتمسفری سرد گاز هلیوم.



**۲ – فصل دوم: پلازما در پزشکی**  
**، مروری بر تاریخچه و ضرورت**  
**انجام این تحقیق**

## ۱-۲ کاربردهای پلاسمای سرد در پزشکی

کاربردهای قبلی پلاسمای سرد در پزشکی عمدتاً مبتنی بر آثار حرارتی آن بوده اند. گرما و درجه حرارت بالا از زمان های خیلی دور در پزشکی برای حذف بافت، استریل کردن به کار می رفته است اما آسیب قابل ملاحظه ای نیز ایجاد می کرد. از این ابزار، برای برش بافتی و مخصوصاً کاربردهای آندوسکوپیک استفاده می شود. در نتیجه مطالعات اخیر درباره پلاسماهای جوی سرد (CAP ها)، پتانسیل خوبی را برای استفاده در موارد زیستی - طبی نشان داده اند. نخستین کاربردهای عملی بسیار امید بخش هستند و رشدی سریع از حوزه جدید پلاسمای پزشکی را میتوان انتظار داشت.

### ۱-۱-۲ بهداشت بیمارستان

رشد باکتری های مقاوم یک مشکل بشار می آید که نیاز به ضدعفونی کردن سریع و مؤثر دارد. دستگاه های پلاسمایی که می توانند این کار را انجام دهند در حال توسعه هستند. بنابراین بهتر است که تمام ساختمان های عمومی، پرورشگاه های کودک، خانه های سالمندان و غیره از جمله این دستگاه بهره مند شوند.

### ۲-۱-۲ درمان ضد قارچی

در مطالعات اخیر نشان داده شده است که پلاسمای سرد می تواند برای مبارزه با بیماری های قارچی مؤثر باشد. اثر پلاسمای سرد می تواند از طریق جوهراب هم منتقل شود. بیماری های شایع مانند عفونت های قارچی پا (پای ورزشکاران) بر ۲۵-۴۰٪ از جمعیت در اروپا، ایالات متحده و ژاپن اثر کرده است. در نتیجه می توانند با استفاده از دستگاه های پلاسمای مناسب در خانه و یا در شیوه های پزشکی درمان شوند [۱۳].

## ۲-۱-۳ مراقبت از دندان

۲۳٪ از افراد بالای ۶۵ سال و بیشتر از ۷۵٪ از زنان باردار از عفونت های periodontal (واقع در اطراف دندان ها) رنج می برند [۱۲]. از دیگر بیماری های دندانی، عفونت کانال ریشه یا التهاب لثه نیز هست. این عفونت ها به نوبه خود خطر ابتلا به بیماری های قلبی و سایر عوارض پزشکی را افزایش می دهند. با توجه به توانایی پلاسما در نفوذ به منافذ میکروسکوپی بین دندان ها و لثه، این روش یکی از شیوه های مناسب برای برای درمان و مراقبت طبیعی از دندان می باشد. علاوه بر این پلاسما ها در سفید کردن دندان ها نیز کاربرد دارند.



شکل (۲-۱) مسواک پلاسمایی.

## ۲-۱-۴ بیماری های پوستی

بسیاری از مشکلات پوستی با اثرهای باکتریایی یا قارچی همراه است. بیش از یک هزار بیماری های پوستی اعم از جوش های acneiform ، dermatitis ، melanocytic (سرطانی) ، وجود دارند. در حالی که براساس تکنولوژی فعلی ما، درمان چنین بیماری هایی توسط پلاسما بعید است، آنها می توانند به کاهش عوارض از طریق باکتری ها و قارچ ها کمک کنند.

با توجه به وضع موجود در پژوهش های بالینی، درمان های پلاسما در درماتولوژی (بیماری های پوستی) و همچنین جراحی پلاستیک و زیبایی بهترین چشم انداز به موفقیت را دارند [۱۴].

## ۲-۱-۵ زخم های مزمن

حدود ۱٪ از جمعیت در کشورهای توسعه یافته از زخم های مزمن رنج می برند. علل مختلف وجود دارد، که برای مثال می توان بیماری های وریدی یا سیاهرگی، بیماری شریانی، دیابت، گانگرنوزوم<sup>۲</sup> پوستی، سرطان ناشی در بافت پوششی پوست اشاره کرد. با پیر شدن، احتمال وقوع این بیماری ها به احتمال زیاد افزایش می یابند. زخم ها زمانی ایجاد می شوند که ترمیم مختل شده باشد و در صورت عدم درمان می توانند منجر به قطع عضو و مرگ شوند [۱۵].

## ۲-۱-۶ آرایشی و بهداشتی

معمولا وقتی افراد چین و چروک هایی را بر روی پوست خود مشاهده می کنند بلافاصله به دنبال راه درمان آن هستند زیرا تا زمانی که شما از پوستی شاداب و زیبا بهره مند هستید جوان به نظر می آید اما به محض بروز اولین چین و چروک حس پیری در شما افزایش پیدا می کند همانطور که گفته شد روش های زیادی وجود دارد ولی یکی از پرطرفدار ترین آنها جوانسازی پوست با پلاسما می باشد. برای جوانسازی پوست با پلاسما نیاز است بدانید که در این روش از یک دستگاه برای ارائه انرژی به صورت پلاسما برای بهبود صورت و چین و چروک و ترمیم تغییرات پوستی ناشی از اشعه UV کاربرد دارد. این دستگاه پالس های پلاسمای را به صورت میلی ثانیه ای به پوست اعمال می نماید. این انرژی حاوی پلاسما از طریق دهانه باریکی بر روی پوست اعمال می شود. انرژی ارائه شده، گرمایی را بر روی

---

<sup>2</sup> Gangrenosum



سطح پوست تولید می کند که موجب حذف سلول های اپیدرمی آسیب دیده قدیمی و زیر سطح پوست یا درم ها به منظور افزایش رشد کلاژن می شود.

## ۲-۱-۷ واکنش پلاسمای سرد با سلول ها

در میان سایر موارد، استفاده از CAP، باعث اصلاح مهاجرت و جا بجایی سلول ها می شود. با کنترل مهاجرت سلول ها، می توان زخم ها را تثبیت کرد. در برخی مطالعات نشان داده است که گونه های یونی، مهم ترین نقش را در واکنش میان سلول ها و پلاسمها دارند، به این صورت که اجزای بیوشیمیایی داخل سلولی را تحریک می کنند. در مقابل، پژوهش های دیگری پیشنهاد می کنند که گونه های خنثی نقش مهمی در برخی مسیرهای واکنش میان سلول ها و پلاسمها دارند.

## ۲-۱-۸ باکتری

بدن انسان حاوی حدود 1.5 کیلوگرم باکتری اطراف 100 تریلیون میکروب است. بسیاری از این باکتری ها عوامل بیماری زا نیستند بلکه بیماری ها را تحریک می کنند و احتمالاً مرگ آنها برای بدن مفید است. با فناوری امروزه، درمان پلاسم با باکتریایی را در منطقه درمان کاهش می دهد. در شرایط آزمایشگاهی، کاهش یک عامل ۱ میلیونی در چند ثانیه اتفاق می افتد. درمان پلاسم باید یک یا دو بار در روز ادامه داشته باشد تا تهدید به عفونت برطرف شود [۱۲].

پاسخ چند ثانیه ای باکتری ها به پلاسم، عدم وجود یک سیستم دفاعی به پلاسم و سطح نسبتاً پایین از عوارض جانبی ناخواسته، نشان میدهد که پلاسم مناسب طراحی شده است [۱۶].

## ۲-۱-۹ درمان سرطان

سرطان به عنوان یک تومور بدخیم یا نئوپلاسم (رشد جدید و غیر طبیعی بافت در بخشی از بدن، به ویژه به عنوان یک مشخصه سرطان است) شامل طیف وسیعی از بیماری های مختلف در نقاط مختلف بدن است [۱۷]. امروزه با وجود پیشرفت های قابل توجهی در علوم پزشکی، سرطان یکی از مهم ترین بیماری های قرن حاضر و دومین علت مرگ پس از بیماری های قلبی عروقی است. درمان با استفاده از پلاسما برای این بیماری نیز اثر بخش بوده است [۱۲].

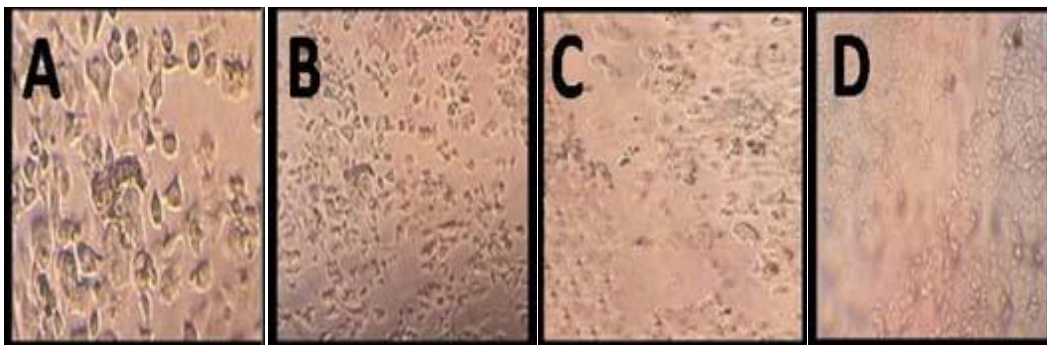
## ۲-۲ پژوهش های مرتبط

برخی تحقیقات محدود در ارتباط با کاربرد پلاسمای سرد برای درمان سرطان انجام شده اند. نشان داده شده که درمان با پلاسمای سرد، اثری انتخابی دارد، به این صورت که موجب آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود. تحقیقات جدیدتر، نتایج اولیه ای را روی درمان موش های مبتلا به گلیوما U87 نشان داده اند. همچنین مشخص شده که درمان تومورهای گلیوما U87-luc با پلاسمای سرد باعث کاهش شدت پراکنش زیستی تومور و حجم آن می شود. همچنین نشان داده شده که استفاده از پلاسمای سرد، آثار زیر را ایجاد خواهد کرد:

(a) ریشه کن کردن انتخابی سلول های سرطانی در محیط آزمایشگاهی و اثر کمتر روی سلول های طبیعی. (b) کاهش قابل ملاحظه اندازه توده در بدن موجودات زنده.

در تحقیقی دیگر گفته شده که یک بار درمان منفرد با پلاسما می تواند منجر به ریشه کن شدن تومور بدون آسیب سلول های سالم مجاور شود. تومورهایی با قطر 5 میلی متر پس از دو دقیقه درمان با پلاسما ریشه کن شدند در حالی که در مورد تومورهایی با اندازه های بزرگ تر، مشاهده کاهش اندازه آن بودیم. جالب توجه است که تومورهای ریشه کن شده دیگر رشد نکردند، در حالی که تومورهایی

که کوچک شده بودند، یک هفته پس از درمان مجدداً رشد کردند. سرعت رشد تومور پس از درمان با پلاسمای سرد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. درمان با پلاسمای سرد باعث افزایش دمای پوست در حدود ۲ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای اتاق می‌شود که پایین‌تر از دمای لازم برای آسیب به پوست است.



شکل (۲-۲) تصاویر حاصل از میکروسکوپ معکوس سلولهای MCF-7 تحت تاثیر پلاسمای اتمسفری سرد. A: نمونه شاهد، یعنی سلولهایی که تحت درمان با پلاسما قرار نگرفتند، B: درمان با پلاسما به مدت 15 ثانیه، C: درمان با پلاسما به مدت 30 ثانیه، D: درمان با پلاسما به مدت 45 ثانیه [۱۸].

بسیاری از مطالعات در مورد مکانیسم‌های مولکولی CAP در سلول‌های سرطانی توسط محققان انجام شده است که در این بخش تعدادی از آنها را بررسی می‌کنیم.

استافل و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تحقیقاتی بر روی سوزن پلاسما انجام دادند و آن را بر روی سلولهای سرطانی به کار برده و جدا شدگی سلولها را مشاهده کردند.

فریدمن و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به کمک FE-DBDs در هوا، آپتوز سلولهای ملانومای پوست را مشاهده کردند.

در سال ۲۰۱۱ کیم و همکارانش تاثیر القای آپوپتوز به وسیله میکروپلازما جت انعطاف پذیر مجهز به فیبر نوری را بر روی سلولهای کارسینومای ریه بررسی کردند.

کیم و همکارانش در سال ۲۰۱۰، پلاسمای غیرحرارتی با پالس DC با قدرت ده ها کیلو هرتز را بر روی سلول های MCF-7 در سرطان پستان مورد استفاده قرار دادند. در پژوهش کیم و همکاران نشان داده شد که پلاسمای هلیوم به همراه گاز اکسیژن بسیار موثر بوده و روشی نوید بخش در درمان سرطان پستان می تواند باشد.

لاروسی و لو، عملکرد یک پلازما سرد را با استفاده از هلیوم به عنوان حامل گازی تشریح کرده اند. آن ها نشان داده اند که می توان پلازما را با دستن بدون محافظ لمس کرد و پلازما در تماس با دست و لته های دندانانی هیچ احساس گرما یا دردی ایجاد نمی کند. ابزاری که بعدها پلاسمای مدادی نام گرفت، نیز توسط لاروسی و همکارانش معرفی شده است. جت های پلازما فشار اتمسفر بین نامزدها موجه ترین به نابد کردن سلولهای سرطانی بدون آسیب به سلول های سالم می باشد. این جت پلازما یک حالت موثر درمان سلول سرطانی پستان انسان را فراهم می کند [۱۲].

اخیرا Chirokov و همکارانش الکترودهای مسطح FE-DBD را مورد استفاده قرار دادند. FE-DBD دقیقا همان DBD اصلی شامل دو الکتروده، یکی از الکترودها عایق شده ولتاژ بالا است و الکتروده دوم فعال است. تفاوت بین DBD و FE-DBD در الکتروده دوم است که این زمینه ای نیست بلکه فعال است، این بدان معنی است که الکتروده دوم می توانید یک نمونه از پوست انسان و یا هر ارگان بدن باشد FE-DBD. مورد استفاده در سلول های اندوتلیال، ملانوم پوست و بدخیمی های خونی FE-DBD. نیز در استریلیزه کردن بافت زنده استفاده می شود. در حال حاضر جت های پلازما که از سیستم DBD استفاده شده نیز تولید می شود [۱۲].

وانگ و همکارانش دریافتند که سلول های BRCA (Breast Cancer) حساسیت بیشتری به این روش های درمان CAP نسبت به MSC (Mesenchymal Stem Cell) در شرایط دوزهای پلازما آزمایش شده دارند. همچنین برای اولین بار نشان داده شده که CAP می تواند به صورت انتخابی سلول های BRCA متاستاتیک را در محیط آزمایشگاه بدون آسیب به سلول های MSC سالم حذف کند [۴].

پارک و همکارانش تاثیر پلازما را در متیلاسیون دو نوع مکرر سلول های سرطانی سینه یعنی MCF-7 با استروژن مثبت و MDA-MB-231 با استروژن منفی مورد بررسی قرار دادند [۱۰].

وی و همکارانش دریافتند که ترکیبی از نانوذرات و CAP می تواند مانع از رشد سلول های سرطان پستان برای ۲۴ ساعت شود [۱۲].

## ۳-۲ پیشینه تحقیق

نتایج مطالعات بر روی مدل های *in vitro* و *in vivo* در سرطان پوست نشان می دهد که استفاده از پلازما سرد موجب کاهش تکثیر، اتصال و مهاجرت سلولی و القای آپوپتوزیس انتخابی در سلول های نئوپلاستیک شده اما تاثیر مخربی بر روی سلول های سالم ندارد. این محققین بر این باورند که اختلاف عملکرد بین سلول های سالم و نئوپلاستیک می تواند به دلیل شرایط متفاوت اکسیداتیو و فاز چرخه سلولی باشد. افزایش رادیکال های اکسیداتیو ناشی از پلازما سرد می تواند با آسیب DNA و خارج کردن سلول های نئوپلاستیک از چرخه تکثیر سلولی موجب ورود این سلول ها به سمت نکروز و آپوپتوز گردد [۱۹]. علاوه بر این گزارش شده است که پلازما سرد قابلیت ضدسرطانی بالایی بر رده های مختلف سلول های سرطانی از قبیل کارسینوما [۲۰]، ملانوما، بدخیمی های نورواکتودرمی و بدخیمی های هماتوپوئیتیک دارد [۲۱]. علاوه بر این، این در حالی است که سلول های سالم مقاومت بیشتری نسبت به آثار مخرب از خود نشان می دهند که همانگونه که پیش تر نیز ذکر شد می تواند

به دلیل افزایش محتوای گونه های آزاد اکسیژن در سلول های توموری باشد [۲۲]. نتایج مطالعات Weiss و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان می دهد که میزان رشد سلول های (LNCaP سرطان پروستات) پس از تیمار با پلاسمای سرد به شدت کاهش می یابد و این کاهش رشد به دلیل تغییر در بیان ژن های پروآپتوتیک P53، P21، کاسپاز ۳، Bax و Survivin می باشد [۲۳]. علاوه بر این نتایج مطالعات بر روی سرطان کلورکتال نشان می دهد که روش درمانی متشکل از ترکیب تابش پلاسمای سرد و استفاده از نانو ذرات طلا موجب کاهش رشد سلول های سرطانی می شود [۲۴]. نتایج مطالعات دیگر که در سال ۲۰۱۶ منتشر شده نشان می دهد که روشهای ترکیبی استفاده از نانوداروها و پلاسمای سرد می تواند به صورت سینرژیک عمل کرده و موجب مهار رشد سلول های سرطان گردد [۲۵].

با توجه به نتایج متفاوتی که طی چند سال اخیر انتشار یافته و از آنجا که تعداد بررسی های صورت گرفته در زمینه امکان استفاده از پلاسمای سرد در درمان سرطان، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان توکسیسیتی، مهاجرت سلولی و بیان ژن های آپتوزی Bax و Bcl2 پس از تابش پلاسمای بر سلول های سرطان های پستان است، می باشد.

## ۲-۴ ضرورت انجام تحقیق

امروزه سرطان به عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر به شمار می رود. آمارهای سال ۲۰۱۲ نشان می دهد که سالانه ۱۴ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان گزارش می شود [۲۶]. از سوی دیگر در همین زمان افزایش 0.6 در صدی سالانه در میزان ابتلا به سرطان در کودکان ۱۴ ساله یا کمتر از ۱۴ سال در فاصله سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۷ دیده می شود [۲۷]. روش های رایج و قدیمی درمان سرطان همانطور که گفته شد عوارض زیادی به همراه دارند. از این رو بسیاری از محققین در صدد

هستند که با ابداع و ایجاد روش ها و تکنیک های جدید که آثار مخرب کمتری روی سلول های سالم دارند، از آسیب همه جانبه به بافت های سالم و به خصوص غدد جنسی بکاهند. یکی از این روش ها استفاده از پلاسمای سرد می باشد که در سال های اخیر به صورت گسترده ای در بسیاری از زمینه های پزشکی وارد شده است و برای استفاده در درمان سرطان نیز مطالعاتی در حال انجام می باشد. برای کاربردهای بالینی بیشتر، می توان از CAP برای تومورها در هر محلی در بیماران مبتلا به سرطان پستان از طریق یک لوله آندوسکوپیک برای درمان آندوسکوپیک استفاده کرد. اگر اندازه توده بزرگ باشد، که بیماران مبتلا به مراحل انتهایی سرطان پستان شایع است، قبل از جراحی، انتظار داریم که تماس آندوسکوپیک مستقیم CAP با تومور به صورت کاملاً موثری اندازه تومور را کاهش دهد، پس از جراحی برداشت تومور نیز می توان از CAP برای حذف سلول های سرطانی موجود یا باقی مانده و جلوگیری از متاستاز استفاده کرد. از آنجا که سرطان پستان اولین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان می باشد، هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان بیان ژنهای دخیل در مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) در رده سلول های MCF-7 پس از تیمارهای مختلف با پلاسمای سرد می باشد [۴].

## ۲-۵ مزیت های پلاسمای اتمسفری سرد

- درمان با پلاسما می تواند یک نوع درمان جراحی کم تهاجمی باشد که امکان حذف سلول های اختصاصی را بدون اثرگذاری روی کل بافت فراهم می کند.
- باعث جداسدن سلول ها بدون اثرگذاری روی بقای سلول ها و مرگ سلولی قابل کنترل می شود.
- در پلاسماهای حرارتی با فشار اتمسفریک، دمای گاز به طور معمول بسیار بالا است. به دلیل این درجه حرارت بسیار بالا و نیاز به خنک کننده متوالی، قابلیت اجراء و استفاده از آنها محدود است. اما

پلاسماهای غیر حرارتی (سرد) با فشار اتمسفریک در دمای پایین و بدون هرگونه خنک کننده اضافی می توانند برای درمان اشیاء حساس به حرارت استفاده شوند.

• پلاسمای غیر حرارتی خاصیت حذف بافت با دقت بالا بدون التهاب و یا آسیب، تغییر بافت ها در سطح سلولی و جلوگیری از التهاب و زخم را دارد. این نوع پلاسما تنها تاثیر کمی بر روی بافت های سالم اطراف می گذارد.

• شکل گازی آن این امکان را به نفوذ حتی در سطوح ناهمگن، حفره ها و شکاف ها تا مقیاس میکرومتری می دهد که در اینجا مایع های مرسوم و تکنیک های شیمیایی با شکست مواجه می شوند. (دسترسی آسان آنها به فضاهای باریک و محدود)

• سیستم غیر تهاجمی و خاص دستگاه تولید پلاسما، بدون تماس مستقیم، استریل کننده و بدون درد بودن از دیگر مزایای درمان پلاسما است که امکان انتقال دارو در سطح مولکولی را نیز ارائه می دهد.

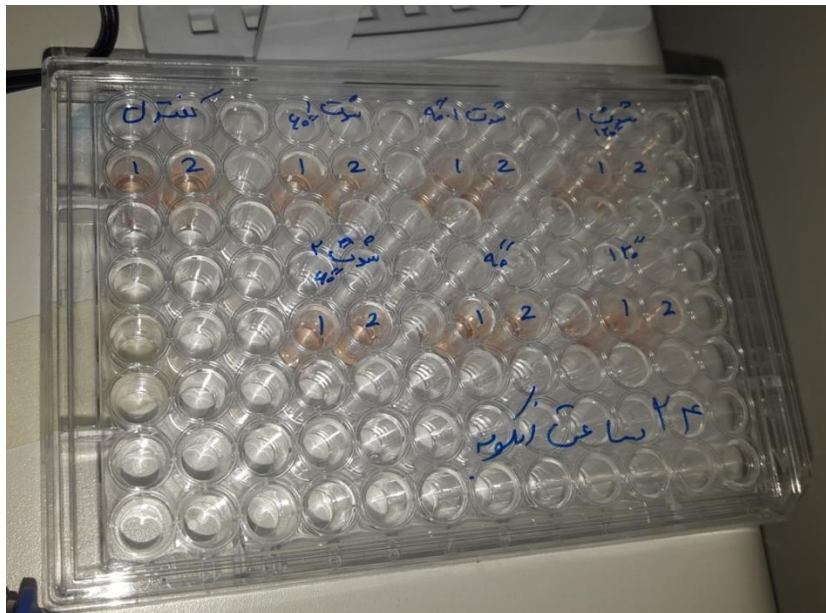
• تمیز کردن سطوح ناپایدار و ناهمگن با استفاده از مواد شیمیایی کار دشواری است و حتی ممکن است باعث نابود شدن آنها شوند. بنابراین پلاسما ارائه کننده یک جایگزین مهم و خوشایند است [۱۲].



# ۳- فصل سوم: جزییات مراحل و چیدمان آزمایشگاهی

### ۱-۳ مواد و وسایل مورد نیاز

- سلول سرطانی MCF\_7 به صورت تازه از دانشگاه علوم پزشکی مشهد تحویل گرفته شد. اولین پاساژ (کم کردن تراکم سلول‌های ظرف کشت به منظور تکثیر و حفظ بقای سلول‌ها) سلول‌های MCF\_7 صورت گرفت و سپس سلول‌ها را به دو فلاسک T\_25 منتقل کردیم. دو روز بعد، دومین پاساژ سلول‌ها انجام شد و سلول‌ها را در دو فلاسک T\_25 و دو فلاسک T\_75 قرار دادیم. جهت ماندگاری سلول‌ها در زمان طولانی‌تر، فلاسک‌های T\_25 را فریز کردیم.
- پیت پاستور، پلیت مهاجرت، پلیت ۹۶ خانه‌ای، تریپسین EDTA و PenStrp، الکل ۹۶ درصد، گاز استریل، پلاستیک فریزر، قرص PBS و غیره را خریداری کردیم.



شکل (۱-۳) پلیت ۹۶ خانه‌ای.

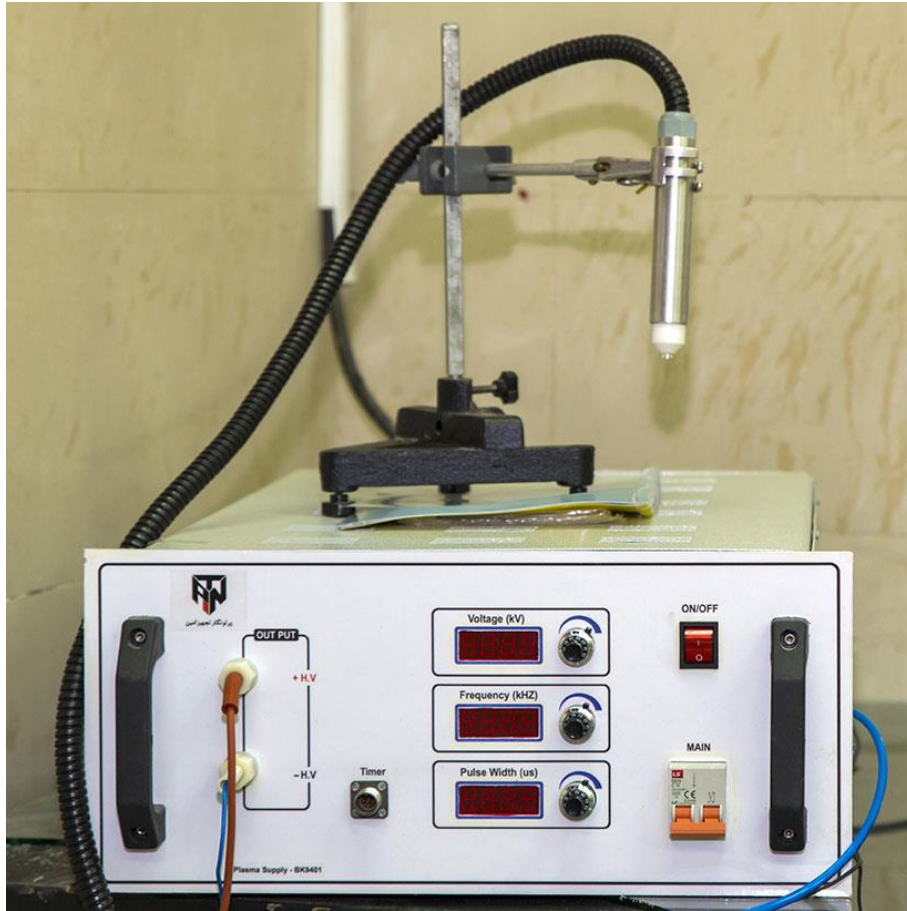
• دستگاه جت پلاسمای اتمسفر سرد



شکل (۲-۳) دستگاه کلی جت پلاسما شامل منبع تغذیه ، تورچ ، کپسول گاز هلیوم و دستگاه تنظیم

جریان گاز.

شکل ۲-۳ دستگاهی را نشان می دهد که ما از آن برای انجام آزمایشات استفاده کردیم.



شکل (۳-۳) منبع تغذیه BK9401 و هد پلاسما جت.

دستگاه جت پلاسما مدل BK9401 با هدف تولید ولتاژ، فرکانس و پهنای پالس متغییر، که شرایط لازم برای تولید پلاسما را محقق می سازد، طراحی و ساخته شده است. پارامترهای خروجی منبع پلاسما با رویکرد تحقیقات و پژوهش در حوزه های مختلف، بگونه ای انتخاب شده است تا کاربران این دستگاه بتوانند با شرایط مشابه سایر پژوهشگران به تحقیق و توسعه در زمینه پلاسما و موضوعات مرتبط بپردازند.

## اجزای منبع تغذیه

- کلید MAIN
- کلید ON/OFF
- نمایشگر ولتاژ
- نمایشگر فرکانس
- نمایشگر پهنای پالس
- ترمینال خروجی ولتاژ بالا ( کاتد/ آند )
- کانکتور زمان سنج ( مولتی تایمر )

## مشخصات فنی

- ✓ ولتاژ ورودی : 220 – 240 V ، AC 50 Hz
- ✓ ولتاژ خروجی : 1 – 10 kV
- ✓ فرکانس خروجی : 3 – 40 kHz
- ✓ پهنای پالس : 2 – 300  $\mu$ sec
- ✓ توان خروجی : 300 W
- ✓ جریان خروجی : حداکثر 30 mA

## اجزای هد

- ❖ آند (سیم قرمز)
- ❖ کاتد (سیم آبی)
- ❖ لوله ورودی گاز
- ❖ لوله خرطومی
- ❖ هد پلاσμα

- دستگاه کنترل کننده شار Alicat سری MC (MultiCon)



شکل (۳-۴) دستگاه تنظیم جریان گاز.

کنترل کننده جریان گازی الیکت<sup>۳</sup> بسیار پایدار و با سرعت پاسخ کمتر از ۱۰۰ میلی ثانیه است. بازه جریان فلوکنترلرهای Alicat از ۰٫۵ میلی لیتر بر دقیقه تا ۵۰ لیتر بر دقیقه متغیر و حداکثر فشار کاری ۱۰ بار است. دقت بسیار بالا و کالیبراسیون همزمان برای چندین گاز خالص و مخلوط گازها، این دستگاه را انتخابی مطمئن برای کاربردهای مختلف آزمایشگاهی و پایلوت کرده است. همچنین امکان انجام تنظیمات دستگاه از طریق دکمه ها و نمایشگر دستگاه وجود دارد.

- کپسول گاز هلیوم



شکل (۳-۵) کپسول گاز هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹.

---

<sup>3</sup> Alicat

هلیوم سبک ترین عنصر از گروه پایدار گازهای نجیب می باشد که می تواند با انرژی بسیار کم یونیزه شود. نتیجه آن یک روش درمانی منفرد می باشد که می تواند با انعطاف پذیری فوق العاده ای اثر برشی، انعقادی و فرسایشی ایجاد کند. از کاهش حجم بافت بیمار در پیرامون ساختارهای حیاتی گرفته تا برش و لیزر بافت های متراکم، پلاسمای هلیوم در توانایی برای سازگاری با نیازهای پویای اتاق عمل بی همتا است. و پلاسماجت هلیوم تنها وسیله ای است که می تواند این کار را انجام دهد.

#### • دستگاه Elisa Reader



شکل (۳-۶) Elisa Reader

دستگاه Elisa Reader<sup>۴</sup> یک اسپکتروفوتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج فتومتریک آزمایش الایزا طراحی شده است. از تکنیک الیزا به منظور تعیین حضور آنتی بادی ها یا آنتی ژن های اختصاصی در نمونه ها استفاده می شود. این تکنیک براساس تشخیص یک آنتی ژن یا آنتی بادی روی یک سطح جامد به صورت مستقیم یا ثانویه، به کمک آنتی

<sup>۴</sup> واژه الایزا (ELISA) اختصاری از کلمات (Enzyme-Linked Sorbent Assay) است.



بادی های نشاندار و ایجاد شدن محصولاتی استوار است که می توان آنها را توسط اسپکتروفتومتر خواند.

- دستگاه انکوباتور<sup>۵</sup>



شکل (۷-۳) انکوباتور کربن دی اکسید.

انکوباتورها دستگاه هایی هستند که با ایجاد حرارت یکنواخت محیط مناسبی جهت رشد انواع میکرو اورگانیسم ها و باکتریهای ایجاد می کنند و در آزمایشگاههای متفاوت صنعتی و تحقیقاتی و پزشکی استفاده می شوند. انکوباتورها از جهت روش توزیع گرما به دو دسته فن دار و بدون فن و از جهت رنج دما به دو دسته حرارتی و یخچالدار تقسیم شده و در اندازه های متفاوت مورد استفاده قرار می گیرند. در بعضی موارد از جهت جنس بدنه و نوع کنترلر نیز دسته بندی می شوند.

---

<sup>5</sup> Incubator

انکوباتورها معمولا دارای کنترلر دما، دریچه تخلیه هوا (جهت خروج بخارات و رطوبت داخل دستگاه) و تایمر هستند که در مدل‌های پیشرفته، قابلیت‌هایی مانند برنامه ریزی، تنظیم شیب حرارتی (RAMP) و تایمر تاخیری (جهت تنظیم زمان روشن شدن دستگاه) نیز وجود دارد. این دستگاه بر روی دمای ۳۷ درجه و 5% CO2 تنظیم شده است.

## • میکروسکوپ



بدنه میکروسکوپ از عدسی‌ها، دوربین دو چشمی، شکاف‌دهنده پرتو نور، تغییر دهنده بزرگنمایی، کنترل کننده کانون قرارگیری جسم، عدسی شیء و یک اتصال دو طرفه به پایه میکروسکوپ تشکیل یافته و وظیفه انجام انواع بزرگنمایی‌های اپتیکی از اجسام کوچک را جهت داشتن تصویری واضح‌تر و بزرگ‌تر از محل انجام فرایند را به عهده دارد.

• دستگاه پیکودراپ<sup>۶</sup>

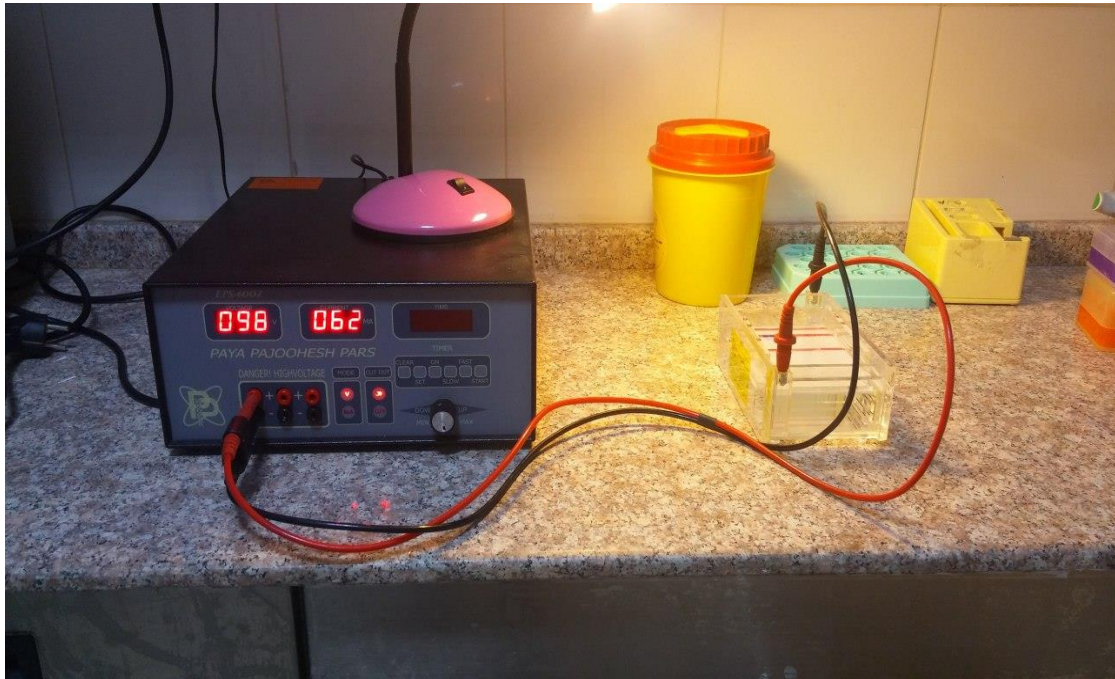


شکل (۳-۸) دستگاه پیکودراپ.

دستگاه Real time PCR نوعی از دستگاههای PCR است که علاوه بر کیفیت کمیت را نیز نشان می دهد و در واقع میزان تکثیر سلولی را نشان می دهد که البته این کار را به صورت آنی انجام میدهد.

---

<sup>۶</sup> picodrop



شکل (۳-۹) دستگاه الکتروفورز.

الکتروفورز به حرکات ذرات در یک مایع تحت میدان الکتریکی گویند. به سبب اینکه ماکرومولکولهای زیستی مانند دی‌ان‌ای و پروتئینها باردار هستند می‌توان با قرار دادن آن‌ها در یک میدان الکتریکی، آن‌ها را بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی، تفکیک کرد. برای این منظور از روشی بنام الکتروفورز استفاده می‌شود. روش‌های مختلف الکتروفورزی برای تفکیک و مطالعه بیومولکول‌ها اعم از اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین‌ها ابداع شده‌است. از این دستگاه به منظور جدا کردن مولکولهای باردار و تفکیک قطعات DNA به منظور تجزیه و تحلیل آنها استفاده می‌شود.

<sup>7</sup> Electrophoresis

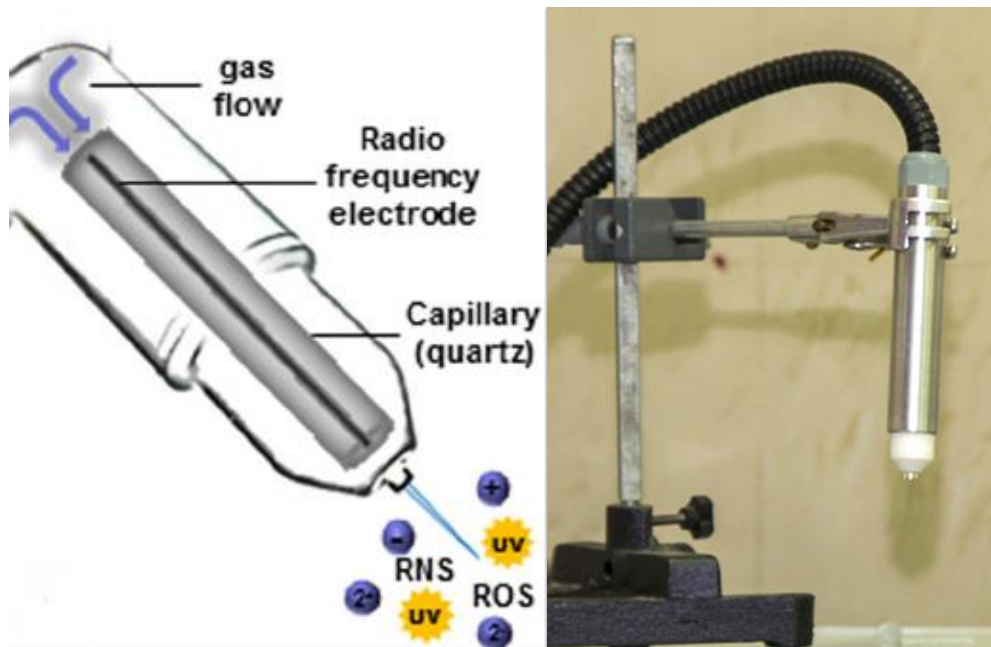
## • سانتریفیوژ



شکل (۳-۱۰) دستگاه سانتریفیوژ.

دستگاهی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز مواد را از یکدیگر جدا می‌کنند. دانشمندان معمولاً دستگاه سانتریفیوژ را برای جدا کردن ذرات جامد از یک مایع یا تقسیم مخلوط مایعات به اجزای مختلف آن به کار می‌گیرند. از این دستگاه می‌توان به منظور ته نشین کردن سلول‌ها یا جدا کردن سلول‌ها از محلول کشت استفاده کرد.

## ۲-۳ شماتیک دستگاه جت پلاسمای اتمسفری سرد



شکل (۳-۱۱) شماتیکی دستگاه جت پلاسما.

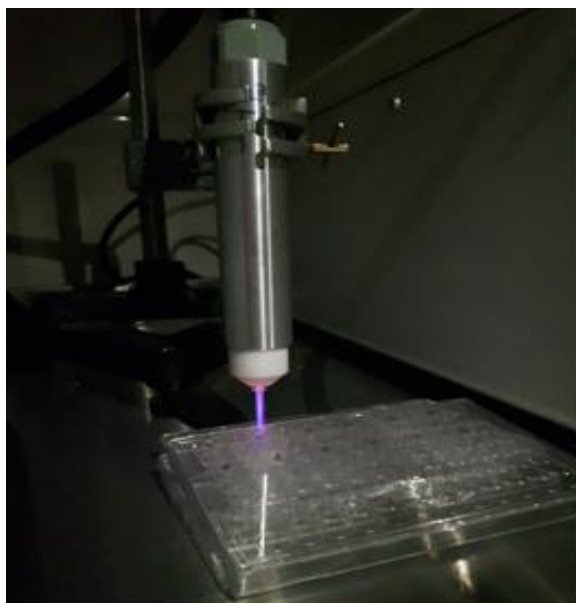
تورچ پلاسما شامل میله نازکی است که اطراف آن را غلاف شیشه ای در بر گرفته است. تفلون سفید رنگی که در انتهای دستگاه قرار دارد دی الکتریک را نشان می دهد. ای ن دستگاه شامل دو الکترود است، یک الکترود که به زمین متصل شده است و الکترود دیگر در وسط دستگاه قرار گرفته و به برق ولتاژ وصل است و گاز از کنار این الکترود عبور می کند. میدان الکتریکی بین این دو الکترود وجود دارد که وقتی این میدان شدید می شود گازی که از آن ناحیه عبور می کند را به پلاسما تبدیل می کند که این پلاسمای تولید شده شامل گونه های فعال اکسیژن ROS و RNS و یون هایی با انرژی بالا است.



### ۳-۳ مراحل نصب و روشن کردن دستگاه جت پلاسما

ابتدا دستگاه تنظیم شار گاز را به ورودی و خروجی گاز هلیوم وصل میکنیم. پس از آن سیم اتصال به زمین را وصل میکنیم. سپس رگولاتور کپسول گاز را تا درجه مشخصی باز میکنیم. در نتیجه گاز به دستگاه تنظیم فلو گاز میرسد. حال دستگاه را به برق میزنیم و جریان گاز را روی ۵ L/min تنظیم میکنیم. جت پلاسما را روشن می کنیم ( ابتدا دکمه MAIN و سپس دکمه Off/ON).

ابتدا پهنای پالس را افزایش می دهیم . سپس ولتاژ را کم کم زیاد میکنیم. در همین حین فرکانس را نیز زیاد می کنیم. حال با تنظیم فرکانس بر روی ۳ کیلو هرتز و ولتاژ بر روی ۴ کیلوولت ما میتوانیم پلاسما را ببینیم. ما در این آزمایش فاصله نازل تا نمونه را حدودا ۱ سانتی متر در نظر گرفتیم.



شکل (۳-۱۲) مشعل پلاسما.

## ۴-۳ روش تحقیق

سلول های رده MCF-7 در محیط کشت DMEM در انکوباتور کشت داده می شوند. در ادامه فلاسک های حاوی سلول به صورت اتفاقی به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم بندی می شوند. گروه های تجربی در دوزهای متفاوت و مدت زمان تعیین شده با پلاسمای سرد تیمار می شوند. بعد از ۲۴ ساعت میزان توکسیسیتی تیمار پلاسمایی از طریق انجام تست MTT (تا مدت ۷۲ ساعت پس از تابش پلاسمای) بررسی می شود. تست بررسی میزان مهاجرت سلولی<sup>۸</sup> نیز انجام می شود. در ادامه برای بررسی میزان بیان ژن آپوپتوزی Bax سلول های گروه کنترل و تجربی استخراج می شود. پس از سنتز cDNA واکنش Real Time PCR گذاشته می شود. قابل ذکر است آزمایش های هر گروه تکرار خواهد شد و در نهایت داده های آماری آنالیز شده و نتایج حاصل گزارش می گردد.

## ۱-۴-۳ کشت سلولی

### تجهیزات و امکانات آزمایشگاه کشت سلولی

تجهیزات و امکانات آزمایشگاه کشت سلولی هرچه امکانات اتاق کشت بیشتر باشد کارایی و کیفیت کار بهتر خواهد بود و سهولت دریافت نتایج و تکرار پذیری آنها بیشتر خواهد بود. بطور کلی مهمترین تجهیزاتی که در اغلب آزمایشگاه های کشت سلولی وجود دارند شامل موارد زیر است:

---

<sup>8</sup> Migration Assay



هود لامینار، انکوباتورها، میکروسکوپ ها، سانتریفیوژ، سیستم های خنک کننده شامل یخچال، فریزر و تانک نیتروژن، دستگاه آب مقطرگیری از نوع دیونیزه کننده، دستگاه های استریلیزاسیون شامل اتوکلاو و فور، پمپ خلأ، بن ماری.

بعضی از آزمایشگاه ها با توجه به نوع کاربری آزمایشگاه دارای یک سری تجهیزات بیشتر نظیر دستگاه لیوفیلیزاتور نیز هستند. علاوه بر تجهیزات فوق تجهیزات معمول آزمایشگاهی مانند دستگاه pH متر، ترازوی آزمایشگاهی، شیکر، روتاتور، سمپلرهای ثابت و متغیر در اندازه های مختلف، لام هموسیستمتر، وسایل یک بار مصرف شامل فلاسک ها، پیپت ها، لوله های آزمایش، انواع فیلترها و غیره نیز از جمله وسایلی هستند که در هر آزمایشگاهی وجود دارند.

### محیط کشت سلولی و خصوصیات آن

سلول ها برای رشد نیازمند یک محیط استریل، مواد غذایی و اکسیژن هستند. بعلاوه باید محیط رشد سلول از نظر اسیدیته (pH) و حرارت مناسب بوده و مقدار متعادلی از نمک های مختلف داشته باشد. امروزه با وجود محیط کشت های استاندارد تجارتي و انکوباتورهای پیشرفته، کشت سلول ها بسیار آسان شده است.

اوایل محلول هایی با غلظت نمکی متعادل به عنوان محیط های پایه رشد برای کشت سلول ها استفاده می شدند. این محلول ها حاوی مقادیر متعادلی آب، یون های نمکی و کربوهیدرات هایی مانند گلوکز بودند که علاوه بر ایجاد سیستم بافري و ایجاد توازن اسمزی بین داخل و خارج سلول، منبع انرژی و متابولیسم سلول را نیز فراهم می کردند. امروزه این محلول ها برای شستشو، انتقال و رقیق سازی سلول ها بکار می روند.

بطور کلی محیط های کشت حاوی متابولیت های ضروری نظیر یون های معدنی، قندها، اسیدهای آمینه، پپتیدها، هورمون ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی هستند. اغلب مواد مذکور

بصورت ترکیبات شیمیایی به محیط اضافه می شوند اما برای بهبود شرایط رشد سلول ها باید علاوه بر مواد فوق ترکیبات بیولوژیک دیگری نیز افزوده شود. در بین مواد بیولوژیک اضافه شده به محیط کشت، سرم جایگاه خاصی دارد و اغلب به نسبت ۵ الی ۲۰ درصد به محیط کشت افزوده می شود. در حقیقت سرم محلول بسیار پیچیده ای بوده و مهمترین ماده ای است که باعث بهبود مناسبی در رشد سلول ها گردیده است. البته میزان مواد مؤثر آن در مارک های تجارتي مختلف متفاوت است. امروزه سعی بر این است که محیط های بدون سرم جایگزین سیستم فوق شود و با افزودن ترکیبات بیولوژیک شناخته شده نظیر هورمون ها و فاکتورهای رشد نوترکیب، محیط های استانداردتری تهیه شود [۲۸].

### تعویض محیط کشت

با توجه به اینکه محیط کشت حاوی فنل رد ( شناساگر PH ) می باشد، به ما کمک می کند تا زمان تعویض را تشخیص دهیم. اگر محیط کشت اسیدی شود رنگ محیط کشت به سمت زرد تغییر می کند. اگر محیط کشت بازی گردد رنگ محیط کشت به سمت ارغوانی تغییر می کند. تقریباً هر دو روز محیط کشت را عوض می کنیم. ابتدا محیط کشت درون فلاسک را خارج می کنیم و سپس با توجه به اندازه فلاسک محیط کشت تازه را در فلاسک می ریزیم. محیط کشت باید به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گیرد تا گرم شود و سپس استفاده شود.

برای یک فلاسک T-25 ۳ تا ۵ میلی لیتر محیط کشت و برای یک فلاسک T-75 بین ۸ تا ۱۵ میلی لیتر محیط کشت استفاده می کنیم.

## افزایش مقیاس تکثیر سلولی

اغلب موارد، کشت سلولی در مقیاس کوچک و آزمایشگاهی انجام می شود، زیرا بیشتر اوقات تعداد محدودی سلول برای انجام آزمایشات لازم است. برای تکثیر سلول ها در مقیاس شکل ۲۵ تا ۱۷۵ سانتی متر مربع استفاده می شود. تعداد T آزمایشگاهی از فلاسک های سلول حاصل از یک فلاسک ۱۷۵ سانتی متر مربعی در مورد اغلب تیره های سلولی چسبیده حدود ۱۰ میلیون است. بطور کلی تعداد دقیق سلول ها به خصوصیات تیره سلولی بستگی شکل استاندارد، عملاً تعداد سلول بدست آمده از T دارد. در صورت استفاده از فلاسک های مقادیر مذکور بالاتر نخواهد بود، زیرا برای تولید سلول بیشتر باید پاساژهای متعدد صورت گیرد که باعث افزایش مخارج و اشغال فضای انکوباتور خواهد شد. در صورتی که بخواهیم مقیاس تولید را افزایش دهیم باید عوامل مختلفی را در نظر گرفته و بهینه سازی هایی را انجام داد تا نتایج رضایت بخش باشد. در چنین شرایطی باید میزان مواد غذایی لازم برای تغذیه سلول ها، تبادلات گازی بخصوص اکسیژن رسانی به سلول ها و تولید محصولات جانبی سمی نظیر آمونیاک و اسید لاکتیک را در نظر گرفت. برای بهینه سازی چنین فرآیندهایی در حجم بیشتر از یک لیتر، بایستی از متخصصین طراحی این سیستم ها کمک گرفت. با وجود این امروزه سیستم های تجارتي زیادی وجود دارند که نیاز به استفاده از متخصصین فوق را کاهش داده اند [۲۸].

## روش افزایش تکثیر سلولی

- ✓ ابتدا محیط کشت را از فلاسک با کمک پمپ خارج می کنیم.
- ✓ دو بار فلاسک را با ۵ میلی لیتر PBS شستشو می دهیم. این کار را آرام انجام می دهیم تا از کنده شدن سلول ها جلوگیری کنیم. (محیط کشت حاوی FBS که مهار کننده تریپسین

است که در مرحله بعد استفاده خواهد شد بخاطر همین باید با PBS کل سطح فلاسک را شستشو دهیم).

✓ برای یک فلاسک T-25 ، ۳ میلی لیتر و برای یک فلاسک T-75، ۵ میلی لیتر تریپسین 0.05% برای جداسازی و منفرد کردن سلول ها در فلاسک می ریزیم.

✓ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه فلاسک را در انکوباتور قرار می دهیم تا تریپسین فعال شود و نسبت به جداسازی سلول ها از سطح فعالیت انجام دهد.

✓ سپس سلول ها را در زیر میکروسکوپ چک می کنیم تا ببینیم آیا جدا شده اند یا نه و اگر هنوز مقداری از سلول ها جدا نشده بودند با ضربه زدن به فلاسک به جدا شدن سریع تر آن کمک می کنیم.

✓ هم اندازه تریپسینی که در فلاسک ریخته ایم محیط کشت حاوی FBS به اضافه می کنیم تا تریپسین غیر فعال گردد.

✓ سپس به کمک پیپت سلول هایی که بهم چسبیده اند را پیپتینگ می کنیم تا سلول ها را از هم جدا کنیم.

✓ اکنون سلول های جدا شده را با نسبت ۱ به ۳ به فلاسک های جدید انتقال می دهیم و حجم باقی مانده را محیط کشت می ریزیم و سپس در انکوباتور قرار می دهیم.

## منجمد کردن و نگهداری سلول ها

کسانی که در آزمایشگاه کشت سلولی کار می کنند با سلول های مختلفی سروکار دارند، اما معمولاً در هر زمان فقط با یک سلول خاص کار می کنند و سایر سلول ها به صورت منجمد در تانک نیتروژن هستند. بنابراین تکنیک انجماد سلولی یکی از فرآیندهای روزمره اتاق کشت است. در حقیقت هدف از انجماد سلولی این است که بتوان سلول ها را در دمای بسیار پائین ذخیره کرد تا نیاز به کشت دائمی

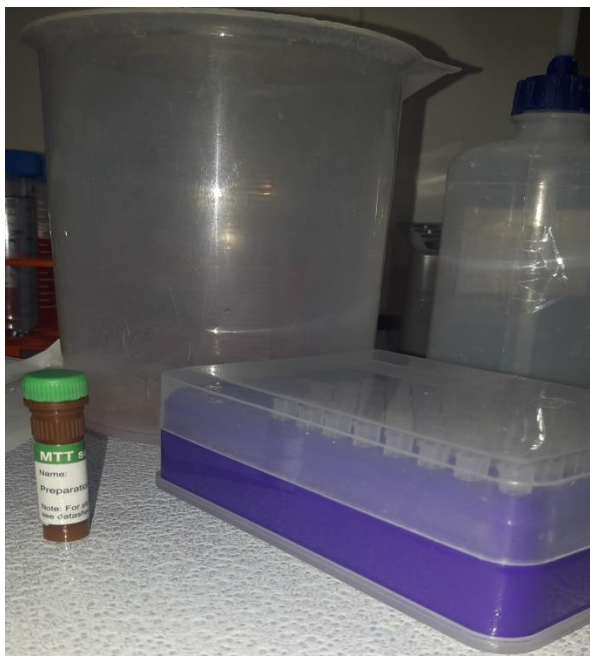
سلول ها نباشد. بخصوص هنگام کار با سلول های دارای عمر محدود این موضوع بسیار حیاتی است. چنین سلول هایی را در مواقع ضروری می توان دوباره ذوب نموده و استفاده کرد [۲۸].

#### آماده سازی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM:

- ۱,۳۷ گرم پودر را با آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰ سی سی می رسانیم و سپس ۰,۰۳۷ گرم سدیم بی کربنات اضافه کردیم و با PH متر PH آن را می سنجیم که باید ۷,۴ باشد که در صورت تفاوت با استفاده از HCl و NaOH آن را به PH دلخواه رساندیم.

#### تهیه ۵۰ سی سی محیط کشت DEME 10 درصد FBS:

- 4.5 سی سی FBS، 5.4 سی سی DEME و ۴۵۰ میکرولیتر PenStrp را با هم مخلوط کرده و تمام مواد را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم تا گرم شوند.



اندازه گیری حیات، رشد و تکثیر سلولها کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. یکی از قدیمی ترین روشها رنگ آمیزی سلولها با تریپان بلو است که حساسیت کافی نداشته و نیاز به بررسی میکروسکوپی دارد. روشهای دیگری نظیر اندازه گیری میزان کل اسیدهای هسته ای و میزان پروتئین در لیفات سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی باشند. اندازه گیری جذب مواد رادیواکتیو توسط سلولهای در حال رشد روش دقیقی است. ترکیباتی نظیر تیمیدین نشاندار شده با تریتیوم و بروموتئوکسی اوریدین هنگام پرولیفراسیون سلول وارد ساختمان هسته سلول شده و باعث نشاندار شدن سلولها می شوند. اما این روش نیز وقت گیر بوده و بعلاوه نیازمند هاروست کردن سلولها پس از تحریک سلولی است. همچنین مشکلات مربوط به کار با مواد رادیواکتیو نظیر دفع مواد باقی مانده و حفاظت از اشعه را نیز به دنبال دارد. در سال 1983 آزمایش MTT بعنوان جایگزینی برای روش رادیواکتیو پیشنهاد شد. در این روش آنزیماتیک بعنوان سوبسترای واکنش از نمکهای محلول تترازولیوم که مهمترین آنها MTT است استفاده می شود. بوسیله این آزمایش ساده و دقیق می توان پاسخ سلولهای مختلف را به

فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیائی ارزیابی کرد. بطوریکه میزان فعالیت و سرعت تکثیر سلولها ممکن است تحت تاثیر هورمونها، فاکتورهای رشد، سایتوکینها و میتوزنها افزایش یافته یا تغییری نکند. همچنین تحت تاثیر بعضی از داروها و عوامل سایتوتوکسیک نظیر داروهای ضد سرطان ممکن است سلولها دچار نکروز یا آپوپتوز شده و سرعت تکثیر یا رشدشان کاهش یابد [۲۹].

### روش انجام آزمایش:

- ۱- با استفاده از تریپسین / EDTA سلول ها را منفرد می کنیم.
- ۲- سلول ها را سانتریفوژ می کنیم و سپس مایع رویی را خارج می کنیم و محیط کشت اضافه می کنیم.
- ۳- محلول حاوی سلول را با استفاده از لام نئوبار می شماریم.
- ۴- تقریباً ۵ تا ۱۰ هزار سلول در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ای (تقریباً ۱۰۰ میکرولیتر) که قرار است به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوبه شوند اضافه می کنیم. حال پلیت ها را برای انکوباسیون در انکوباتور قرار می دهیم.
- نکته: در این زمان باید مراقب باشیم سلول ها نیاز به محیط کشت دارند مخصوصاً آن هایی که مدت زیادی باقی می ماند و باید به آن ها محیط کشت اضافه کنیم.
- ۵- بعد از پایان دوره انکوباسیون پلیت ها را خارج می کنیم و ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT را در هر خانه اضافه می کنیم.
- ۶- سپس پلیت ها را برای ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم. ( در هر خانه باید بیش از ۱۰۰ هزار سلول وجود داشته باشد).
- ۷- محیط کشت حاوی MTT را خارج می کنیم.
- ۸- ۵۰ میکرولیتر DMSO را به هر خانه اضافه می کنیم و با استفاده از پپیت مخلوط می کنیم.

۹- در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه انکوبه می شود.

۱۰- هر نمونه دوباره پیپتینگ شود و جذب آن در ۵۷۰ نانومتر خوانده می شود.

### ۳-۴-۳ تست مهاجرت سلولی

مهاجرت سلول ها قدم مهمی در گسترش تومور به سایر نقاط است و تنظیم این فرایند به درمان های مناسب منجر می شود. سلول های سرطانی پستان سطح بالایی از گیرنده فاکتور رشد اپی تلیالی را بیان می کنند و باعث افزایش مهاجرت، تکثیر، تهاجم و پیشرفت فنوتیپ بدخیم این سلول ها می شود.

### روش کار

۱- آماده سازی دو سری محیط کشت ۲ درصد FBS برای معلق کردن سلول ها در آن و ۲۰ درصد FBS برای اتاقتک پایین پلیت.

۲- سلول ها را از سطح پلیت کشت با استفاده از محلول ۰,۲۵٪ تریپسین جدا می کنیم، سپس درون فالكون می ریزیم و سانتریفوژ می کنیم و سلول ها را دوباره در محیط کشت ۲ درصد FBS معلق می کنیم. سلول ها را با لام نئوبار می شماریم.

۳- محیط کشت ۲۰ درصد FBS را در اتاقتک پایین ظرف تا جایی می ریزیم که فقط انتهای ظرف را خیس کند و از آن بالاتر نباشد. سپس به آرامی ۶۰۰ هزار سلول حاوی محیط کشت ۲ درصد را در transwell insert می ریزیم و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه می کنیم.

۴- بعد از انکوباسیون، محیط کشت های درون اتاقتک و transwell insert را خارج می کنیم و چند بار با PBS شستشو می دهیم از بالا و پایین تمام قسمت های آن را کامل می شوئیم.



۵- transwell insert را درون یک اتاقک خالی قرار می دهیم و سپس از بالا و پایین تریپسن EDTA اضافه می کنیم تا اینکه همه سلول هایی که به پایین یا در وسط منافذ transwell insert قرار دارند شسته شوند و به پایین و در اتاقک سرازیر شوند. سلول هایی که در بالا قرار دارند به خاطر اینکه منافذ ۰,۸ میکرون هستند قادر به عبور نیستند و همان بالا خواهند ماند.

۶- سپس transwell insert را بر می داریم و تریپسن حاوی سلول ها را درون فالكون می ریزیم سانتریفوژ می کنیم و سپس با ۰,۵ سی سی محیط کشت معلق می کنیم و شمارش سلولی انجام می شود.

۷- در آخر مقایسه تعداد سلول ها در نمونه کنترل و نمونه هایی که شدت های مختلف پلاسما به آنها تابیده شدند برای آنالیز تست مهاجرت سلولی صورت می گیرد [۳۰].

### ۴-۴-۳ واکنش Real Time PCR و بررسی بیان ژنی

#### بررسی نمونه های بافتی

RNA نمونه های انتقال یافته به آزمایشگاه، طبق پروتوکل کیت AllPrep DNA/RNA که در ادامه آمده است، استخراج و در فریزر با دمای ۸۰- نگهداری شدند تا سایر مواد مورد نیاز برای مراحل بعدی فراهم شوند.

به وسیله کیت Allprep DNA/RNA Mini kit (کیاژن، امریکا) به طور همزمان DNA و RNA از یک نمونه بافتی استخراج گردید. ابتدا بافر لیز کننده حاوی سلول های بافت مورد نظر به ستون DNA منتقل شده و موجب جدا شدن DNA می گردد. در ادامه این محلول به ستون RNA منتقل می شود و RNA از نمونه بافتی استخراج می گردد.

در ابتدا برای جداسازی RNA از نمونه های بافتی، ۱۰ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول به ازای هر میلی لیتر بافر RLT اضافه گردید (این محلول به مدت ۱ ماه در دمای اتاق قابل نگهداری است). برای تهیه محلول کاری، بافر RPE به نسبت ۱ به ۴ با اتانول مطلق ترکیب شد.

۱- نمونه بافتی ۳۰ میلی گرمی به میکروتیوب ۱,۵ میلی لیتری حاوی ۶۰۰ میکرولیتر بافر RLT حاوی بتا مرکاپتواتانول اضافه گردید و به خوبی توسط ابزار مخصوص کوبیده و لیز شد. سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۲- مجموعه ی فوق به ستون DNA و میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل گردید و به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۳- محلول درون میکروتیوب ۲ میلی لیتری جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

۴- ستون مذکور جهت به میکروتیوب ۲ میلی لیتری جدید منتقل و برای جداسازی DNA در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

## استخراج RNA

۱- ۳۵۰ میکرولیتر اتانول مطلق به محلول درون میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه و به کمک پیپت کردن با هم مخلوط شد.

۲- ۷۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به ستون RNA قرار گرفته روی میکروتیوب ۲ میلی لیتری منتقل شده و به مدت ۱۵ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید (میکروتیوب مذکور پس از خالی کردن در مراحل ۳، ۴ و ۵ نیز مورد استفاده قرار گرفت).

۳-۷۰۰ میکرولیتر از بافر RW1 به ستون RNA منتقل شد و پس از بستن درب، به مدت ۱۵ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و محلول درون میکروتیوب دور ریخته شد.

۴-۵۰۰ میکرولیتر از محلول RPE به ستون RNA منتقل شده و پس از بستن درب، به مدت ۱۵ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و محلول درون میکروتیوب دور ریخته شد.

۵-۵۰۰ میکرولیتر از محلول RPE به ستون RNA منتقل شده و پس از بستن درب، به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. برای نتیجه بهتر، ستون به میکروتیوب ۲ میلی لیتری جدید منتقل شده و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ جهت خشک شدن و حذف کامل محلول از ستون RNA سانتریفوژ گردید.

۶-ستون به میکروتیوب ۲ میلی لیتری جدید منتقل شده و ۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase به ستون منتقل شده و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۷-در ادامه برای تهیه RNA با غلظت و کیفیت بالاتر، ۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase به ستون منتقل شده و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. RNA حاصل تا زمان سنتز cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### بررسی کیفیت و کمیت RNA

مولکول RNA مولکول بسیار حساسی می باشد، به همین جهت تمامی مراحل استخراج RNA بایستی در زیر هود و با استفاده از ابزارهای استریل و دستکش صورت گیرد، زیرا RNase های میکروبی محیط و انگشتان دست موجب تجزیه RNA می شوند. به همین جهت بعد از استخراج RNA بوسیله الکتروفورز ژل آگارز کیفیت استخراج RNA را بررسی می کنیم. بدین خاطر ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه کرده و ۵ میکرولیتر از محصول RNA های استخراج شده را با آن الکتروفورز می

کنیم. بعد از الکتروفورز، ژل را در Gel doc قرار داده و مشاهده می کنیم. در صورتی که در تمام مراحل استخراج RNA سالم بماند و تجزیه نشود بایستی دو باند قابل توجه مربوط به RNA های ریبوزومی  $s^{18}$  و  $s^{28}$  دیده شوند.

برای سنتز cDNA بایستی میزان RNA که در واکنش استفاده می شود در تمام نمونه ها تقریباً مساوی باشد تا در واکنش Real time PCR نرمالیزاسیون راحت تر صورت گرفته و خطای ناشی از تفاوت در مقدار الگوی اولیه ی واکنش Real Time- PCR به حداقل برسد. تعیین کمیت RNA استخراج شده با کمک اسپکتروفوتومتر انجام گرفت.

### سنتز cDNA

مرحله اول Real time PCR تبدیل RNA به cDNA تک رشته ای است. یک پرایمر یا RNA هیبرید شده و توسط یک DNA پلیمرز وابسته به RNA از روی RNA رشته DNA تک رشته ای بنام cDNA سنتز می گردد. بسته به هدف آزمایش، پرایمر مورد استفاده برای ساخت cDNA می تواند به طور اختصاصی طراحی شده باشد به طوری که فقط با یک ژن خاص هیبرید شود و یا بصورت غیر اختصاصی باشد که به تمام mRNA ها وصل شود.

۱. (Oligo -dT): با ۱۲ - ۱۸ نوکلوتید که به دم PolyA در mRNA پستانداران متصل می شود، می تواند به عنوان یک پرایمر کلی برای ساخت رشته اول cDNA به کار رود.

۲. پرایمر اختصاصی: می تواند به یک ناحیه خاص در یک RNA هدف خاص یا خانواده ای از mRNA ها متصل شود.

۳. آغازگر کاتوره ای: معمولاً بصورت هگزامر است و می تواند باعث شروع ساخت cDNA در نقاط متعدد در طول الگوی RNA شود و کپی های تکه تکه شده ای از تمام جمعیت مولکول های RNA بسازد. این نوع پرایمر به خصوص وقتی مفید است که RNA هدف بسیار بلند باشد یا ساختارهای

ثانویه زیادی داشته باشد به طوری که ساخت cDNA نتواند به طور کارآمد با (Oligo \_dT) یا پرایمرهای اختصاصی صورت گیرد. در مرحله بعد PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی cDNA هدف صورت می گیرد.

در این مطالعه از کیت Prime script RT reagent (تاکارا، ژاپن) برای سنتز cDNA استفاده شد که طی آن واکنش رونویسی معکوس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و سپس مرحله غیر فعال سازی آنزیم ترانسکریپتاز معکوس به مدت ۱۰-۵ ثانیه در دمای ۸۵°C برای غیر فعال سازی آنزیم ترانسکریپتاز معکوس انجام شد. این مرحله برای این انجام شد که آنزیم ترانسکریپتاز معکوس دارای فعالیت اگزونوکلئازی است و لذا بایستی آنرا غیر فعال نمود تا cDNA سنتز شده را تخریب ننماید. فرمول واکنش سنتز cDNA در جدول ۳-۷ آورده شده است.

### تست صحت cDNA

در این قسمت از کار برای اینکه cDNA های سنتز شده را از نظر سالم بودنشان تست کنیم RT-PCR از ژن GAPDH [ با استفاده از پرایمر های GAPDH f و GAPDH r ] از cDNA ساخته شده انجام شد. سپس برای تایید سنتز cDNA از آن در واکنش PCR معمولی به عنوان الگو استفاده شد. cDNA ساخته شده در فریزر ۸۰- تا زمان فرا رسیدن آزمایش های Real Time PCR نگهداری گردید.

### آزمایش های Real Time PCR با استفاده از cDNA

آزمایش Real Time PCR یکی از حساسترین و قابل اعتمادترین روش های تخمین کمی بیان ژنی می باشد. این تکنیک بطور گسترده در تایید نتایج میکرو آرایه ای، تایید وجود پاتوژن ها، وجود

سرطان، تایید تعداد کپی ترانسژن و مطالعات دارو درمانی مورد استفاده قرار می گیرد. یک PCR دارای سه فاز تصاعدی، خطی و پلاتو می باشد. در فاز تصاعدی که اولین بخش در هر PCR می باشد، محصولات در هر مرحله به طور تصاعدی افزایش می یابد. Real Time PCR بر این اساس استوار می باشد که مقدار محصولات PCR در فاز تصاعدی، تحت شرایط ایده ال متناسب با میزان الگوی اولیه می باشد. در طول فاز لگاریتمی محصول PCR در هر سیکل در صورت کارایی کافی، دو برابر می شود. برای کارایی ۱۰۰ درصد PCR در طول فاز لگاریتمی، شرایط PCR، غلظت پرایمر، خلوص الگو و طول قطعات تکثیر شونده باید بهینه گردد. DNA ژنومیک و cDNA سنتز شده از RNA می توانند به عنوان الگو برای Real time PCR مورد استفاده قرار گیرند. فعالیت PCR به طور معمول بوسیله رنگ های اتصالی به DNA همچون سایبر گرین یا پروب های اتصالی به DNA مثل Molecular Beacons و پروب های Taqman مشخص می شوند. در نمودار تکثیر محصولات PCR می توان یک Base line و یک سطح Threshold در نظر گرفت. تعداد سیکل PCR در سطح threshold فلورسانس به عنوان Ct در نظر گرفته می شود. مقادیر Ct بطور معکوس با میزان اسید نوکلئیک هدف در نمونه ارتباط دارد. (میزان پایین تر Ct متناسب است با مقدار بالاتری از محصول هدف و بر عکس) نرمالیزاسیون سطوح mRNA با استفاده از ژن های رفرانس اندوژن صورت می گیرد که برای مقایسه دقیق بیان ژنی بین نمونه های مختلف مهم می باشد.

### **Real time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green I**

رنگ SYBR Green I توانایی اتصال به شیار کوچک (Minor DNA groove) دو رشته ای را دارد و پس از اتصال، قدرت ساطع کردن فلورسانس در آن افزایش می یابد. با افزایش تعداد سیکل های PCR تعداد DNA دو رشته ای نیز افزایش می یابد. این امر باعث افزایش اتصال رنگ SYBR Green I به DNA دورشته ای شده که در نتیجه افزایش ساطع شدن فلورسانس را به همراه دارد. افزایش

فلورسانس در فاز extension اتفاق می افتد. به عبارتی حداکثر فلورسانس در پایان مرحله extension و حداقل آن در مرحله Denaturation اتفاق می افتد. به عبارتی حداکثر فلورسانس در پایان مرحله extension و حداقل آن در مرحله Denaturation است. فلورسانس ساطع شده بوسیله دستگاه قابل شناسایی و اندازه گیری است.

آزمایش های Real time PCR با استفاده از دستگاه (Corbett Rotter-gene 6000) انجام گرفت. در این آزمایش ها حجم کلی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر که متشکل از ۱۰ میکرولیتر از master sybr green (تاکارا، ژاپن)، ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای Forward و Reverse و ۱ میکرولیتر از cDNA مورد نظر بود [۳۱].

### روش انجام واکنش های Real time PCR

این واکنش در حجم 20 mL انجام شد و در آن از رنگ SYBR Green به منظور ردیابی قطعات cDNA محصول واکنش PCR استفاده شد. پروفایل دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش ها عبارتست از ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۹۵ درجه برای ۱۰ ثانیه و سپس ۶۰ درجه به مدت ۳۵ ثانیه. برای انجام واکنش از مخلوط واکنش Real time RT-PCR آماده ساخت شرکت تاکارا (ژاپن) استفاده شد.

برای بررسی میزان تکثیر محصول PCR، به نمونه ها نور سبز با طول موج 470 nm تابیده شده و سیگنال فلورسانس در طول موج 510 nm اندازه گیری شد. ردیابی سیگنال های فلورسانس در دمای 72°C انجام گردید که این کار میزان دخالت محصولات ناشی از ایجاد دایمر پرایمر در نتیجه واکنش را به حداقل می رساند. در نهایت به منظور اطمینان از صحت واکنش و اختصاصی بودن واکنش در انتهای واکنش منحنی ذوب محصولات از دمای 62°C تا 95°C رسم شده و وجود یک باند اختصاصی

در واکنش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج واکنش با استفاده از برنامه REST9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان نرمالایزر استفاده شد.

### **پرایمر های مورد استفاده در Real Time PCR**

پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین میزان بیان ژن های مورد مطالعه در واکنش های Real time PCR از وب سایت Primer Bank استخراج شده و سفارش داده شدند. برای تایید پرایمرها در تکثیر اختصاصی ژن هدف، در گام اول از (primer Blast NCBI) استفاده گردید و سپس در آزمایشگاه محصول و اندازه آن ها مورد تایید قرار گرفت.

### **روش تجزیه و تحلیل آماری**

در بخش بررسی ژنتیکی نمونه های خون، روش های آماری معمول به کار گرفته نمی شود و درصدگیری ساده برای ارائه میزان شیوع پلی مورفیسم های مورد نظر و تغییرات احتمالی جدید مورد استفاده قرار گرفت.



# **۴ – فصل چهارم: بحث و نتایج**

## **مربوط به پردازش پلاسما بر**

### **سلول های سرطانی**

## ۱-۴ مقدمه

مشاهدات آزمایشگاهی بر روی سلول های سرطانی پستان رده ی MCF\_7 توسط تاثیر دستگاه جت پلاسما اتمسفری سرد (APJ) با استفاده از گاز هلیوم انجام شد که در این فصل گزارشی از مشاهدات آزمایش را ارائه می دهیم و رفتار مربوط به هر نمودار را تحلیل خواهیم نمود.

## ۲-۴ شرح آزمایشات و تحلیل نمودارها

ابتدا تست MTT یک بار به صورت آزمایشی انجام می شود. در دومین تست MTT شرایط مختلفی از پارامتر های پلاسما را مورد بررسی قرار خواهیم داد و بهترین دوزها برای مرگ سلول های سرطانی را انتخاب کرده و برای جلوگیری از خطا های آزمایشگاهی مجددا سلول های سرطانی را با دوزهای انتخابی آزمایش می کنیم و نتایج بدست آمده را به صورت نمودار نمایش می دهیم. تست مهاجرت سلولی نیز با دوز هایی که در تست MTT داشتیم مورد بررسی قرار می گیرد. در انتها تست بیان ژن آپوپتوز سلولی را بر روی سلول های سرطانی که توسط پلاسما درمان شدند، مورد بررسی قرار می دهیم. در انتهای هر تست نتیجه و تحلیل آزمایش بیان می شود.

## ۱-۲-۴ تست MTT

در اولین تست MTT، ۱ عدد ظرف ۹۶ خانه ای با ۱۰ هزار سلول در هر چاهک را با دو ولتاژ مختلف (۳ و ۴ کیلو ولت) و زمان های مختلف (۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه)، فرکانس 3.5 kHz و Duty Cycle را برابر 2  $\mu$ sec تحت تابش پلاسما قرار دادیم.

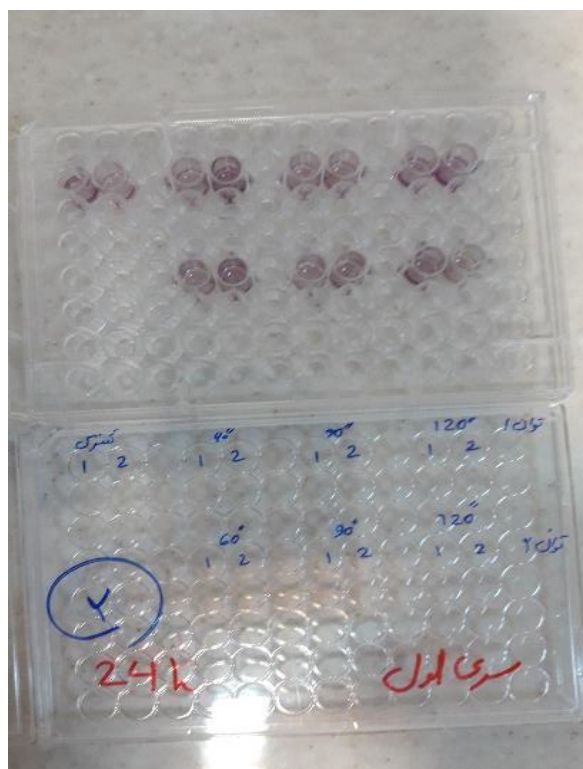
برای ولتاژ ۴ فاصله نوک شعله تا سلول را 1 cm و برای ولتاژ ۳، 0.5 cm تنظیم کردیم.

همانطور که در جدول (۱-۴) مشاهده می کنید، ۱۴ خانه از هر ظرف دارای سلول بودند.

جدول (۱-۴) شکل شماتیکی پلیت تست اول MTT

کنترل		ولتاژ ۴ برای ۶۰ ثانیه		ولتاژ ۴ برای ۹۰ ثانیه		ولتاژ ۴ برای ۱۲۰ ثانیه	
۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲
		ولتاژ ۳ برای ۶۰ ثانیه		ولتاژ ۳ برای ۹۰ ثانیه		ولتاژ ۳ برای ۱۲۰ ثانیه	
		۱	۲	۱	۲	۱	۲

برای جلوگیری از خطا در آزمایشات، هر نمونه یا هر چاهک به صورت دابل قرار داده شده است.



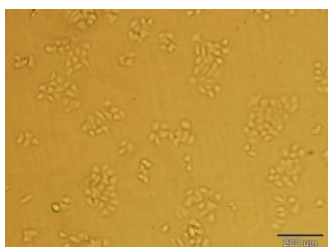
شکل (۱-۴) ظرف ۹۶ خانه ای اولین تست MTT.

شکل (۴-۲) عکس های گرفته شده از سلول های سرطانی تحت درمان با پلاسما را نمایش می دهد که توسط میکروسکوپ عکسبرداری شده اند.

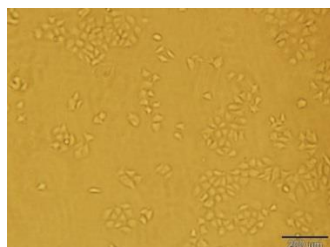
باید توجه داشت که این عکسبرداری ها پس از ۲۴ ساعت بعد از درمان با پلاسما صورت گرفته است.

( در این فاصله ۲۴ ساعته سلول ها در انکوباتور نگه داری شده اند. )

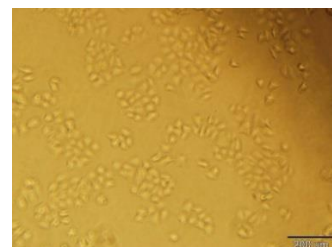
### خانه شماره ۱ با ولتاژ ۴ کیلو ولت



۱۲۰ ثانیه

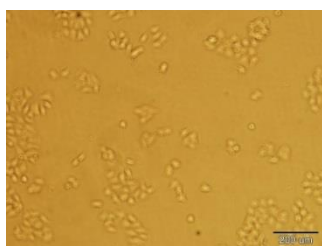


۹۰ ثانیه

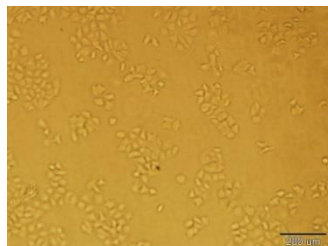


۶۰ ثانیه

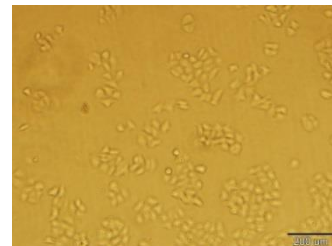
### خانه شماره ۲ با ولتاژ ۴ کیلو ولت ( تکرار )



۱۲۰ ثانیه



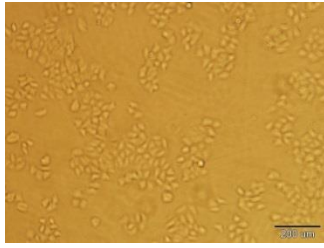
۹۰ ثانیه



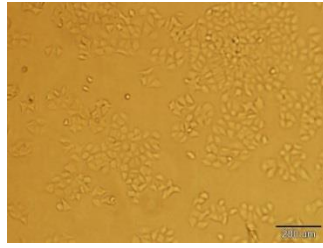
۶۰ ثانیه

### خانه شماره ۱ با ولتاژ ۳ کیلو ولت

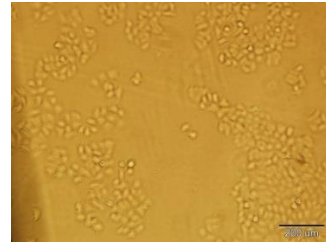
۷۰



۱۲۰ ثانیه

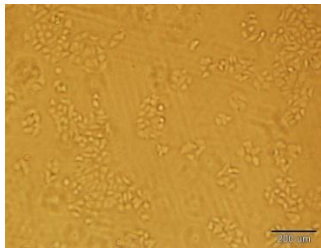


۹۰ ثانیه

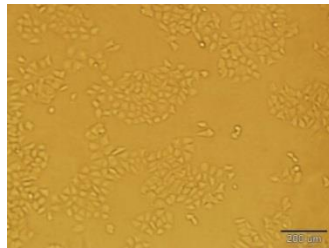


۶۰ ثانیه

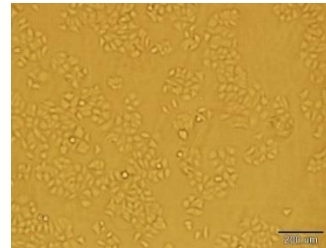
**خانه شماره ۲ با ولتاژ ۳ کیلوولت (تکرار)**



۱۲۰ ثانیه

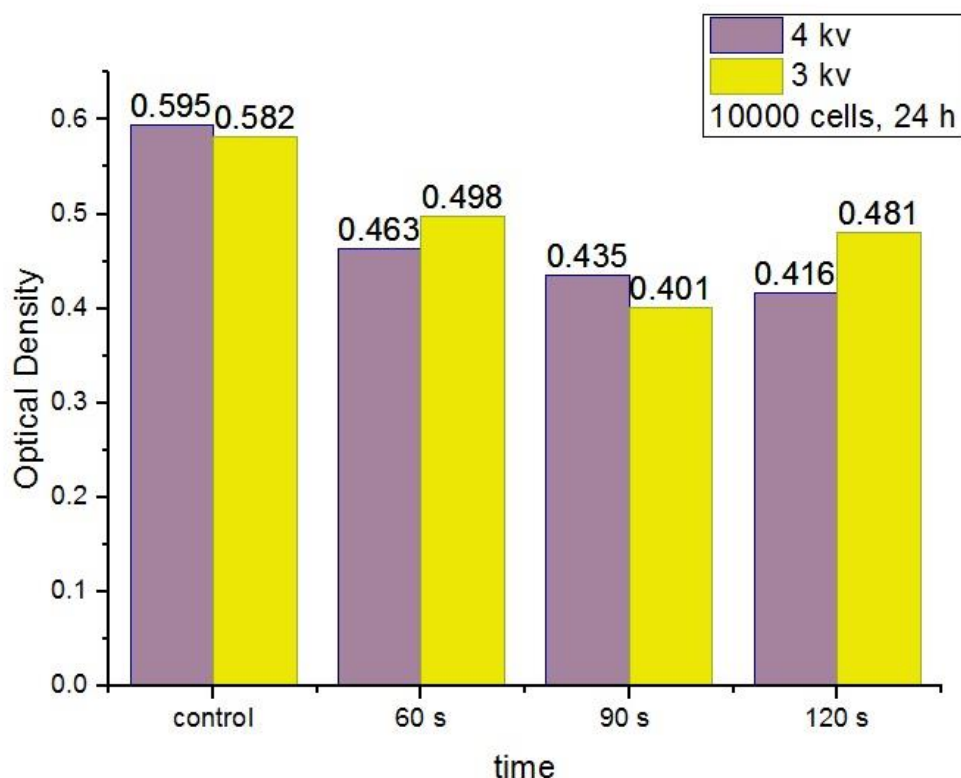


۹۰ ثانیه



۶۰ ثانیه

شکل (۲-۴) عکس های گرفته شده از سلول ها در تست اول MTT.



شکل (۳-۴) نمودار جذب نوری ۱۰۰۰۰ سلول برحسب زمان در ولتاژهای ۳ و ۴ کیلو ولت بعد از ۲۴ ساعت.

با توجه به تصاویر (۲-۴) و نمودار (۳-۴)، سلول‌هایی که با ولتاژ ۴ کیلو ولت تحت درمان پلاسما قرار گرفتند روند آپوپتوزی بهتری نسبت به تابش با ولتاژ ۳ کیلو ولت را داشته‌اند و همچنین هر چه زمان تابش پلاسما بیشتر شده است باعث جدا شدگی بین زنجیره‌ی سلول‌های سرطانی شده و موجب مرگ آنها می‌شود و این روند مطابق با انتظار ماست.

اما در این تست به دلیل زیاد بودن تعداد سلول‌ها در هر چاهک، شاهد آپوپتوز قابل توجهی نبودیم زیرا پلاسما فقط بر روی سطح سلول‌ها تاثیر گذاشته است و طبق مشاهدات میکروسکوپی مقدار زیادی از سلول‌ها هنوز در کف ظرف چسبیده بودند.

با توجه به نتایجی که در آزمایش قبلی داشتیم، در این آزمایش از تعداد ۵ هزار سلول در هر چاهک استفاده کردیم و زمان تابش پلاسما را ۱۲۰ ثانیه در نظر گرفتیم.

در این تست تاثیر پلاسما را با ولتاژ و Duty cycle و دبی های مختلف بر روی سلول ها امتحان میکنیم تا بهترین شرایطی که میتواند تاثیر خوبی بر روی سلول ها بگذارد را پیدا کنیم.

جدول (۲-۴) شرایط مختلف پلاسمایی

شماره ی خانه در پلیت	ولتاژ (kV)	پهنای پالس (μsec)	فرکانس (kHz)	جریان گاز (L/min)	فاصله (cm)
۱	۳ تا کنترل				
۲	6.5	2	20	5	1
۳	3.5	4	20	5	1
۴	5	4	20	5	1
۵	5	5	20	5	1
۶	5	5	20	2.5	0.5
۷	5	5	20	2.5	0.5
۸	6	4	20	2.5	0.5
۹	5	3	20	2.5	1

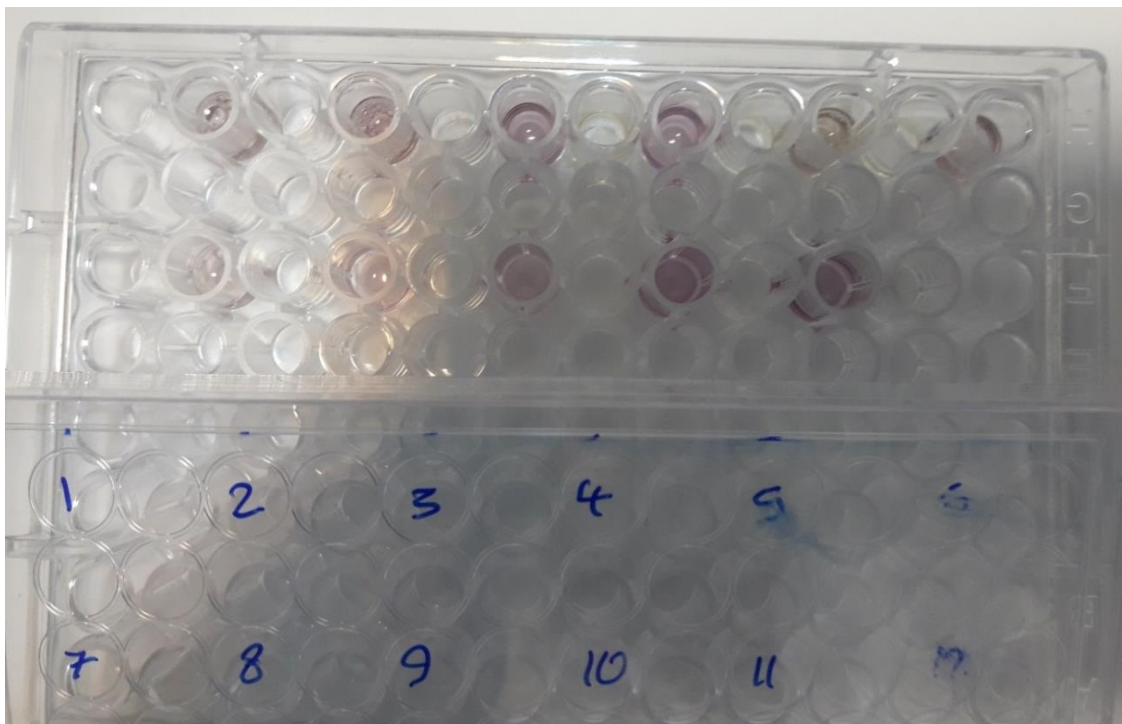
نتیجه این تست بعد از ۲۴ ساعت توسط دستگاه Elisa Reader خوانده شد.

جدول (۳-۴) مقدار جذب نوری بدست آمده از هر نمونه را نمایش می دهد.

جدول (۳-۴) خواندن جذب نوری شرایط مختلف پلاسمایی

جذب	فاصله (cm)	جریان گاز (L/min)	فرکانس (kHz)	پهنای پالس ( $\mu\text{sec}$ )	ولتاژ (kV)	شماره ی خانه در پلیت
0.106, 0.115, 0.146	۳ تا کنترل					۱
0.175	1	5	20	2	6.5	۲
0.089	1	5	20	4	3.5	۳
0.090	1	5	20	4	5	۴
0.092	1	5	20	5	5	۵
0.051	0.5	2.5	20	5	5	۶
0.091	0.5	2.5	20	5	5	۷
0.066	0.5	2.5	20	4	6	۸
0.072	1	2.5	20	3	5	۹





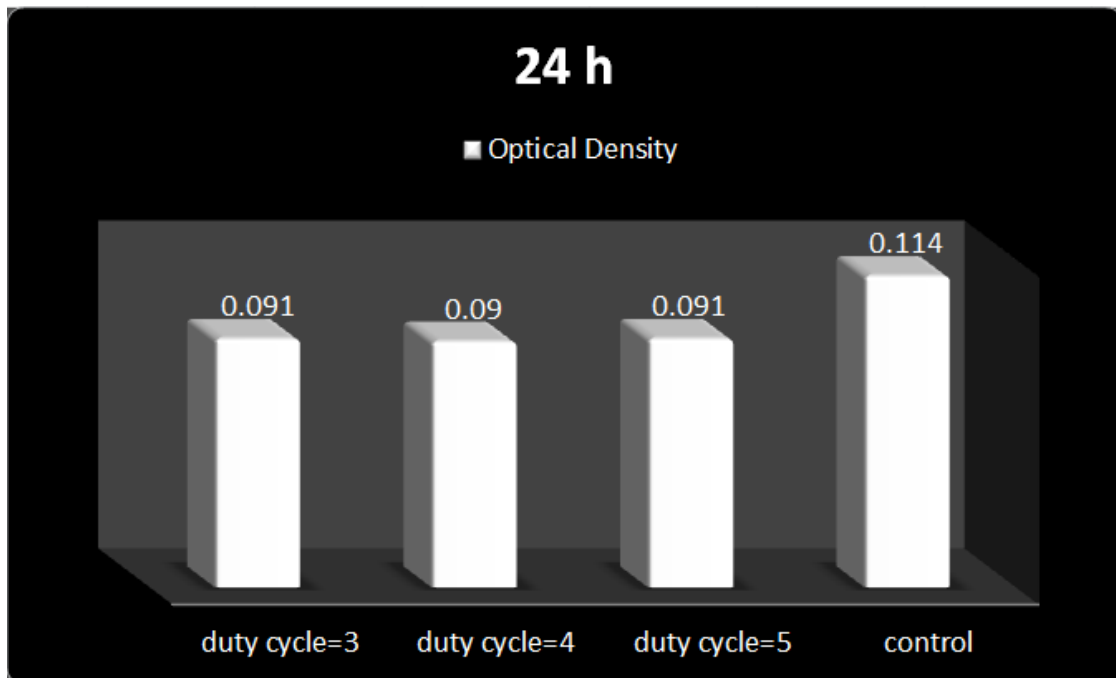
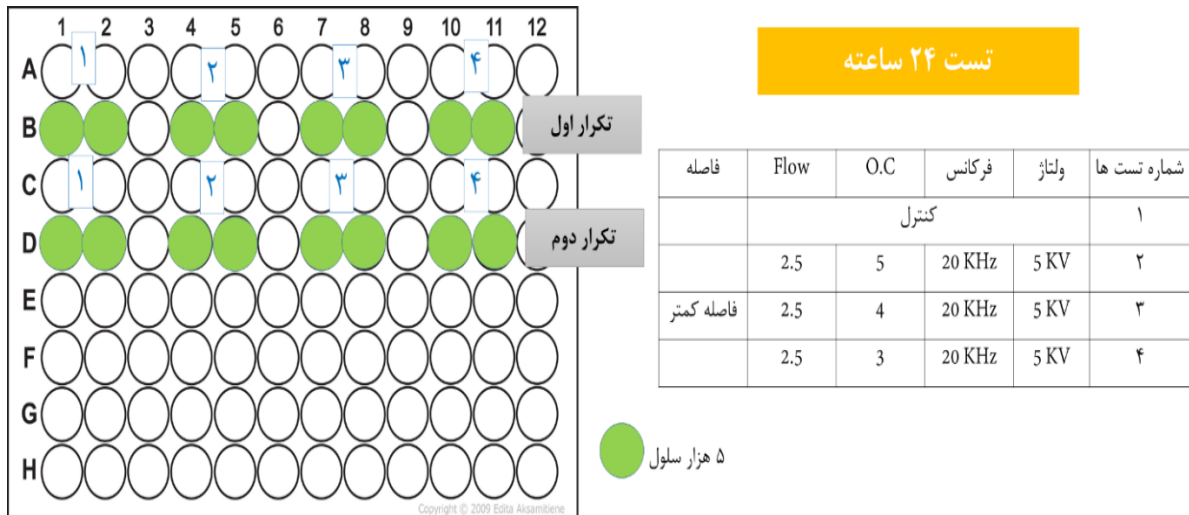
شکل (۴-۴) ظرف ۹۶ خانه ای تست MTT.

با توجه به اعداد جذب نوری نشان داده شده در جدول، جذب نوری در خانه های ۶، ۸ و ۹ خیلی کمتر از دیگر خانه ها است و نشان دهنده این است که در این خانه ها تعداد سلول ها کمتر شده و بدین معناست که آپوپتوز بیشتری رخ داده است. با نگاه کردن به پلیت آزمایشگاهی و رنگ مایع ها نیز میتوان کم و زیاد بودن سلول ها در چاهک ها را تشخیص داد به این صورت که خانه هایی که مایع داخل آن به رنگ ارغوانی است نشان دهنده وجود سلول های زیاد و خانه هایی که مایع داخل آن کم رنگتر و رو به زردی میرود، نمایانگر تعداد کمی از سلول ها یا مرگ سلولی است.

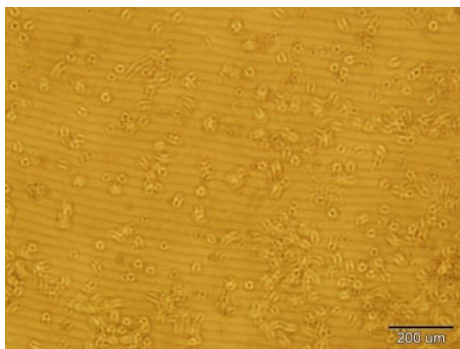
از آنجایی که آزمایش بر روی سلول های زنده ممکن است همراه با خطاهای زیادی صورت گیرد، در نتیجه برای اطمینان از درست بودن نتایج بدست آمده، آزمایشات مورد تایید در جدول (۴-۳) را برای بار دوم تکرار می کنیم.

## تکرار آزمایش

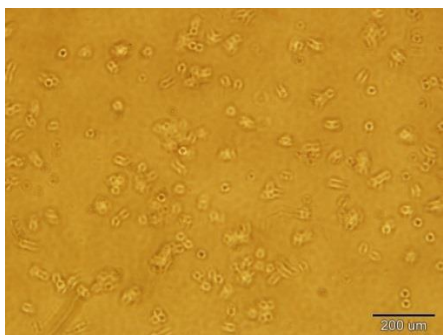
تاثیر پلاسما بر روی سلول های سرطانی بعد از ۲۴ ساعت



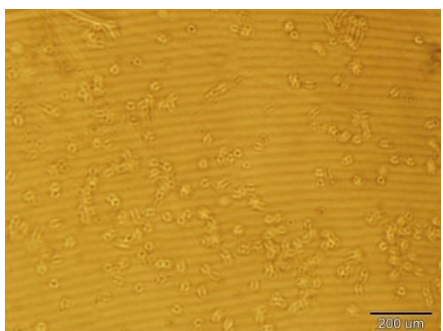
شکل (۴-۵) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول برحسب پهنای پالس با واحد (μsec) بعد از ۲۴ ساعت.



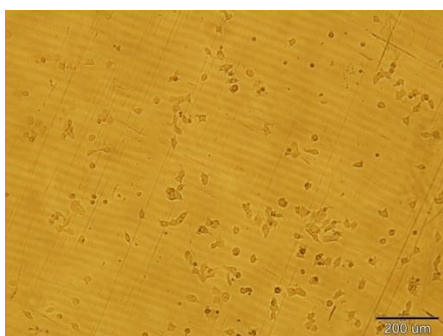
کنترل



درمان با پهنای پالس  $3 \mu\text{sec}$



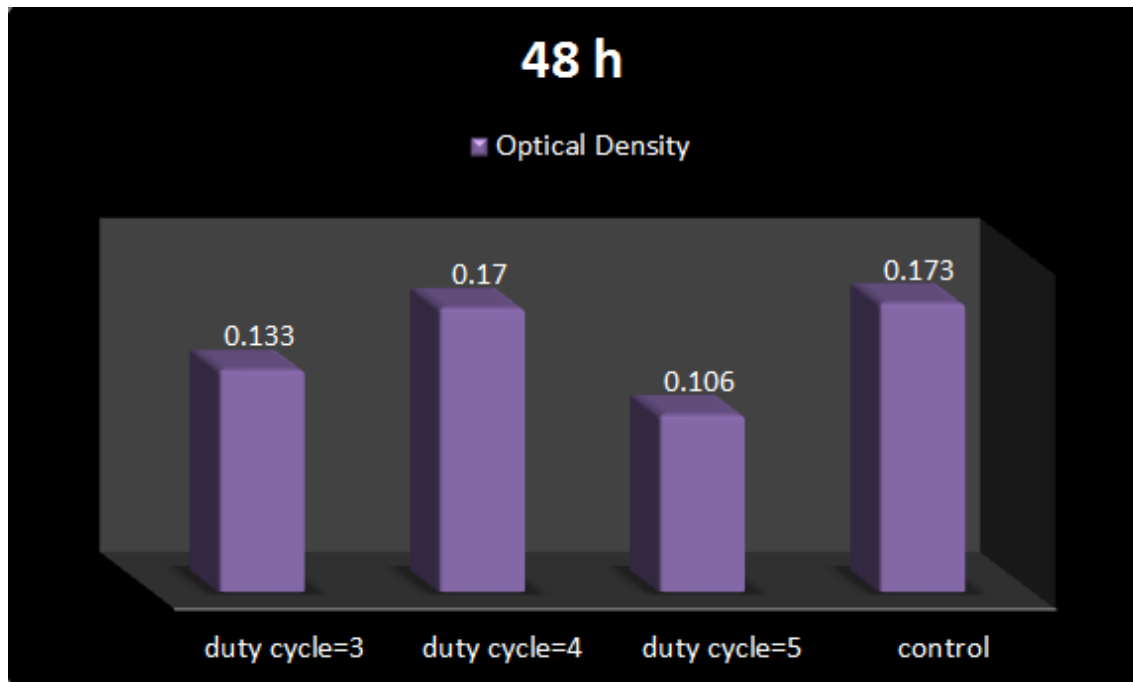
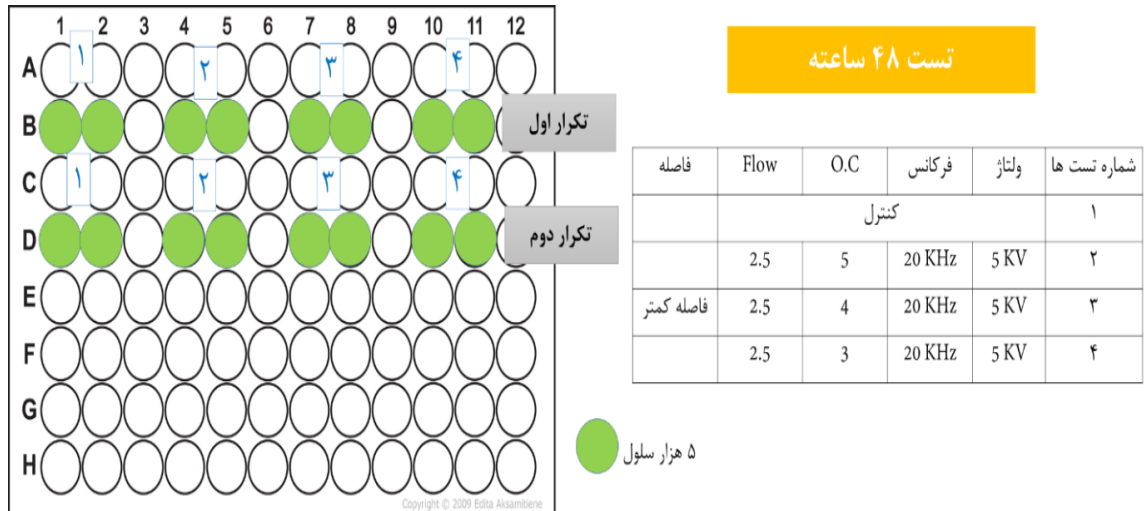
درمان با پهنای پالس  $4 \mu\text{sec}$



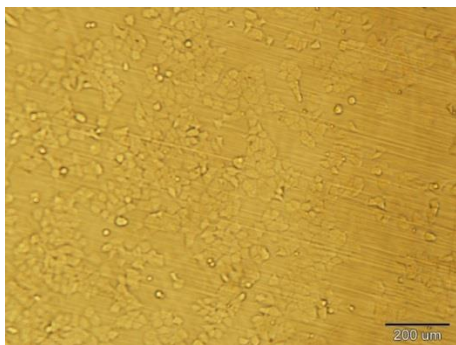
درمان با پهنای پالس  $5 \mu\text{sec}$

شکل (۴-۶) عکس های گرفته شده از سلول ۲۴ ساعت بعد از درمان با پلاسما.

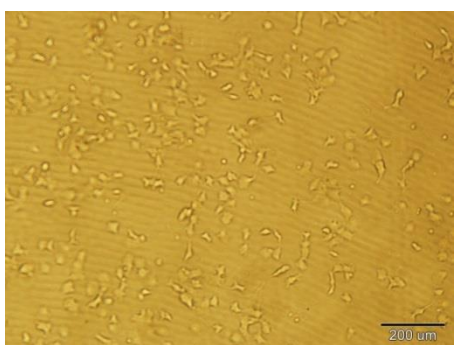
- تاثیر پلاسما بر روی سلول های سرطانی بعد از ۴۸ ساعت



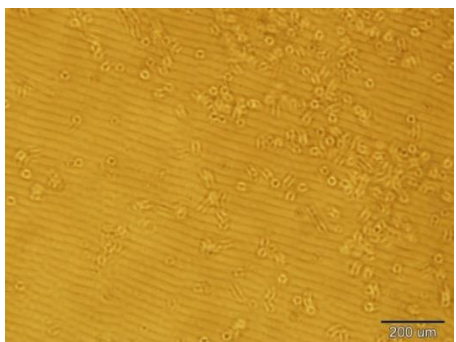
شکل (۴-۷) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول بر حسب پهنای پالس با واحد ( $\mu sec$ ) بعد از ۴۸ ساعت.



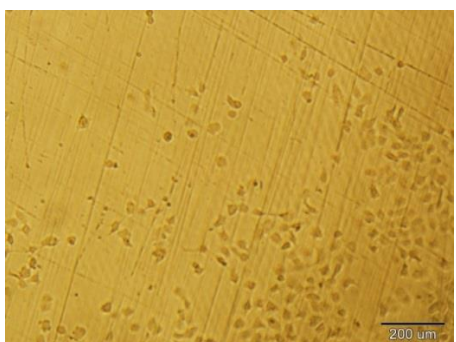
کنترل



درمان با پهناي پالس  $3 \mu sec$



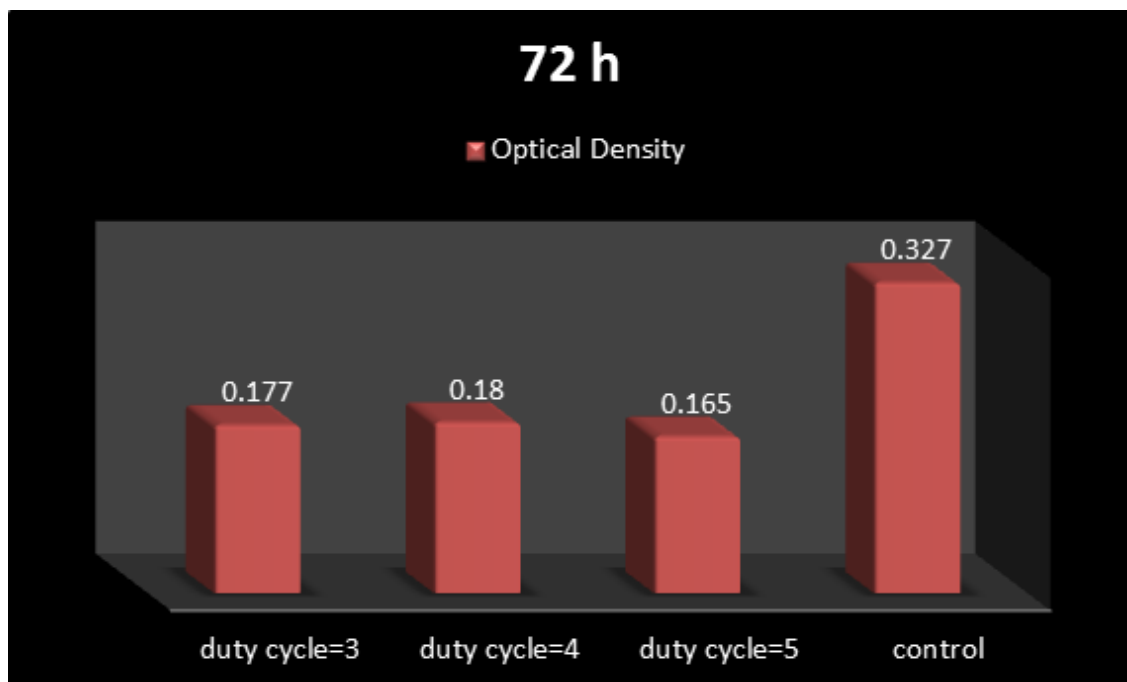
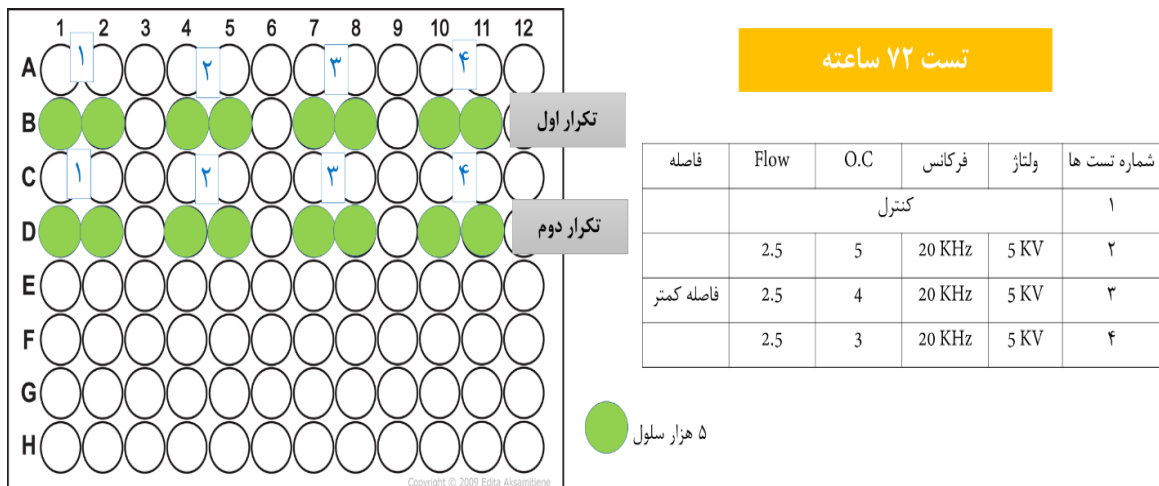
درمان با پهناي پالس  $4 \mu sec$



درمان با پهناي پالس  $5 \mu sec$

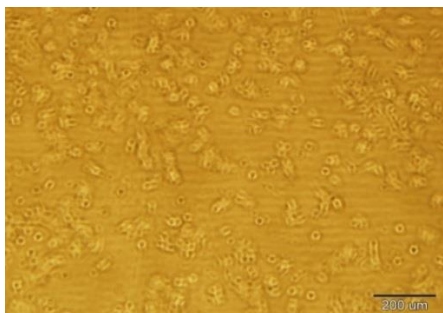
شکل (۴-۸) عکس های گرفته شده از سلول ۴۸ ساعت بعد از درمان با پلاسما.

- تاثیر پلاسما بر روی سلول های سرطانی بعد از ۷۲ ساعت

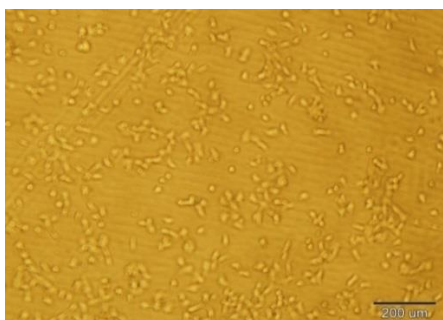


شکل (۴-۹) نمودار جذب نوری ۵۰۰۰ سلول بر حسب duty cycle بعد از ۷۲ ساعت.

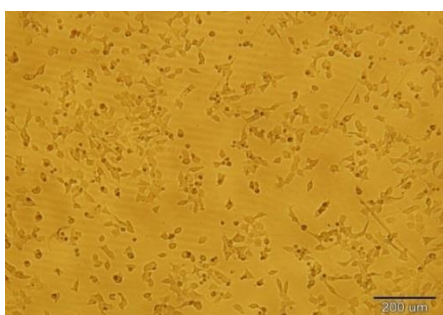




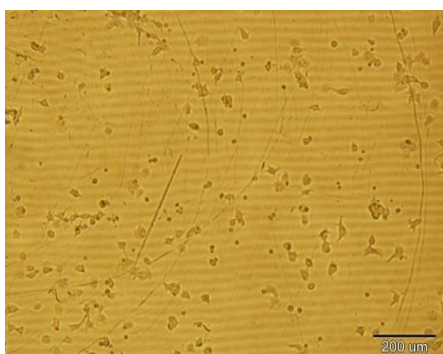
کنترل



درمان با پهنای پالس  $3 \mu sec$



درمان با پهنای پالس  $4 \mu sec$



درمان با پهنای پالس  $5 \mu sec$

شکل (۴-۱۰) عکس‌های گرفته شده از سلول ۷۲ ساعت بعد از درمان با پلاسما.

با دقت در نمودار ها و تفاوت بین عکس ها می توان دید که درمان پلاسما با پهنای پالس  $5 \mu sec$  بهترین تاثیر را بر روی سلول ها گذاشته است و هر چه زمان بیشتری میگذرد، سلول نه تنها رشد نمیکند بلکه آپوپتوز آن همچنان ادامه دارد.

تحقیقات نشان می دهد که پلاسما سرد به شدت از رشد تومور در موش ها جلوگیری می نماید [۳۲]. مکانیسم های مختلفی در این باره پیشنهاد شده است. اول اینکه محتوای گونه های آزاد اکسیژن (ROS) پس از تیمار با پلاسما سرد در سلول های مذکور افزایش یافته و موجب آسیب قابل توجه سیستم آنتی اکسیدانی و شکست های دورشته ای DNA در حد کشنده بودن برای سلول ها می گردد [۳۳]. دوم اینکه آسیب شدید DNA سلولی و سایر تاثیرات پلاسما سرد به صورت وابسته به دوز موجب توقف چرخه سلولی، آپوپتوز یا نکروز می گردد. سوم اینکه احتمال بر این است که در میان گونه های مختلف رادیکال های آزاد  $H_2O_2$  و NO کلیدی ترین مولکول ها برای کشتن سلول های سرطانی می باشد [۳۲].

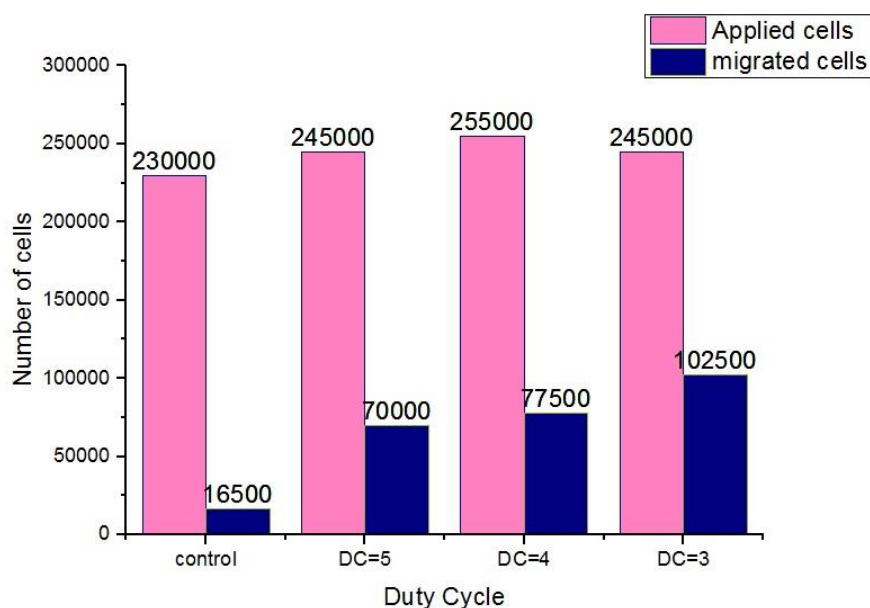
همچنین گزارش شده است که تغییر pH ناشی از CAP در محیط کشت سلولی باعث تحریک آپوپتوز می شود. از نظر فیزیکی، تماس با CAP می تواند غشای سلولی را تحت تاثیر گرما باز کند، که معمولاً در مقیاس چند میکروثانیه اتفاق می افتد و امکان انتقال گونه های تولید شده تحت تاثیر CAP را فراهم می کند که نتیجه آن پاسخ های سلولی مختلف است. به علاوه، فوتون های UV با انرژی پایین می توانند به صورت غیرمستقیم روی ژن ها اثر بگذارند و منجر به مرگ سلولی شوند. به علاوه، به این دلیل که سلول های سرطانی تکثیر سریع تری نسبت به سلول های طبیعی دارند، گزارش شده که CAP می تواند به صورت انتخابی سلول های سرطانی را هدف قرار داده و در مرحله میتوز چرخه سلولی اختلال ایجاد کند [۴].



## ۲-۲-۴ تست MIGRATION

در تست مهاجرت حدود 250 هزار سلول را در ۴ ظرف ۳,۵ سانتی متری (petri dish) با فرکانس 20 kHz، (duty cycle 3,4,5)، ولتاژ 5 kV، دبی 2.5 L/min در مدت زمان 120 ثانیه به صورت دورانی تحت تابش پلاسما قرار گرفتند.

به دلیل بزرگ بودن ظرف، پلاسما را به صورت دورانی روی سلول ها تابانیدیم. و در پایان سلول های تحت درمان را جهت شمارش منفرد کرده و به ظرف های مهاجرت انتقال دادیم سپس با استفاده از میکوسکوپ تعداد سلول هایی که مهاجرت داشته اند را شمارش می کنیم.



شکل (۴-۱۱) تعداد سلول مهاجرت کرده بر حسب duty cycle.

با اینکه پلاسما در تست MTT تاثیر خوبی در آپتوز سلول ها داشته ولی در این آزمایش نشان داده شده است که مهاجرت سلول های سرطانی تحت تابش پلاسما افزایش می یابد. این افزایش می تواند به این دلیل باشد که کم شدن duty cycle دستگاه پلاسما باعث افزایش پروتئین اینتگرین موجود در سلول ها که واسطه چسبندگی سلولی و مهاجرت هستند شده است.

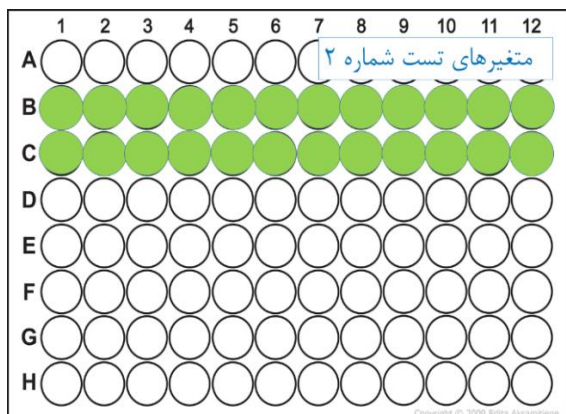
اینترگرین ها سیگنال های مکانیکی و شیمیایی را انتقال می دهند. این سیگنال ها علاوه بر سازماندهی و بازسازی سلول ها در طی چسبندگی و مهاجرت، کنترل دقیقی بر روی بقای سلولی و تکثیر سلولی را اعمال میکنند [۳۴].

مطابق با مطالعات انجام شده روی چسبندگی و تکثیر سلولی، این فرضیه مطرح شده که تماس با CAP می تواند روی ژن های مربوط به مهاجرت سلولی و متاستاز اثر بگذارد [۴].

### ۳-۲-۴ واکنش Real Time PCR و بررسی بیان ژنی

مشابه تست MIGRATION سلول ها تحت درمان پلازما قرار گرفتند و در ادامه استخراج RNA ها پس از ۲۴ ساعت و خواندن غلظت RNA توسط پیکودراپ و انجام تست integrity بر اساس پروتوکل، سنتز cDNA و انجام تست cDNA صورت گرفت.

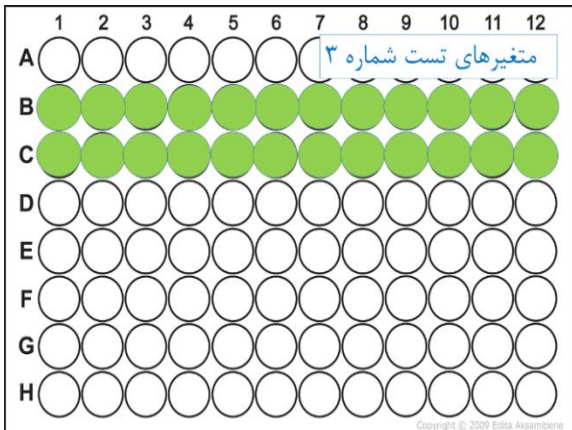
شکل های زیر کشت سلول های سرطانی در سه ظرف را برای استخراج RNA و تست Real-Time نشان می دهند.



قبل از تابش ۲۴ ساعت انکوبه و بعد از تابش ۲۴ ساعت انکوبه سپس استخراج RNA

فاصله	Flow	O.C	فرکانس	ولتاژ	شماره تست ها
					۱
		کنترل			
	2.5	5	20 KHz	5 KV	۲
فاصله کمتر	2.5	4	20 KHz	5 KV	۳
	2.5	3	20 KHz	5 KV	۴

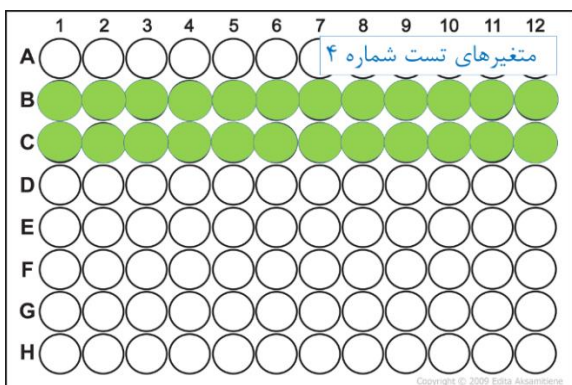
● ۵ هزار سلول



قبل از تابش ۲۴ ساعت انکوبه و بعد از تابش  
۲۴ ساعت انکوبه سپس استخراج RNA

فاصله	Flow	O.C	فرکانس	ولتاژ	شماره تست ها
	کنترل				۱
	2.5	5	20 KHz	5 KV	۲
فاصله کمتر	2.5	4	20 KHz	5 KV	۳
	2.5	3	20 KHz	5 KV	۴

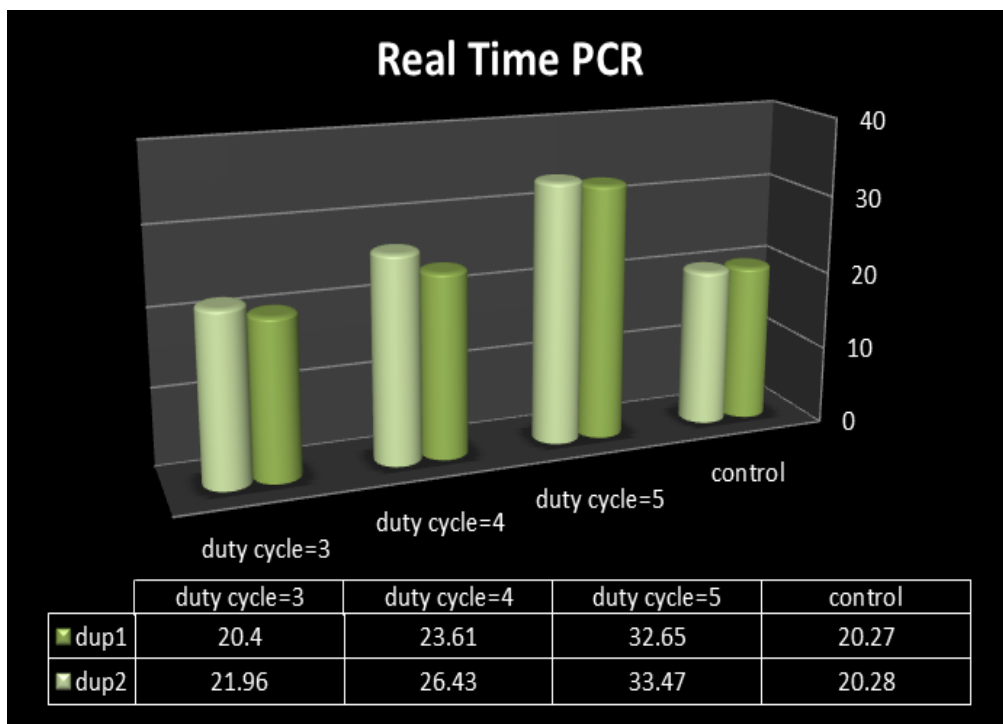
● ۵ هزار سلول



قبل از تابش ۲۴ ساعت انکوبه و بعد از تابش  
۲۴ ساعت انکوبه سپس استخراج RNA

فاصله	Flow	O.C	فرکانس	ولتاژ	شماره تست ها
	کنترل				۱
	2.5	5	20 KHz	5 KV	۲
فاصله کمتر	2.5	4	20 KHz	5 KV	۳
	2.5	3	20 KHz	5 KV	۴

● ۵ هزار سلول

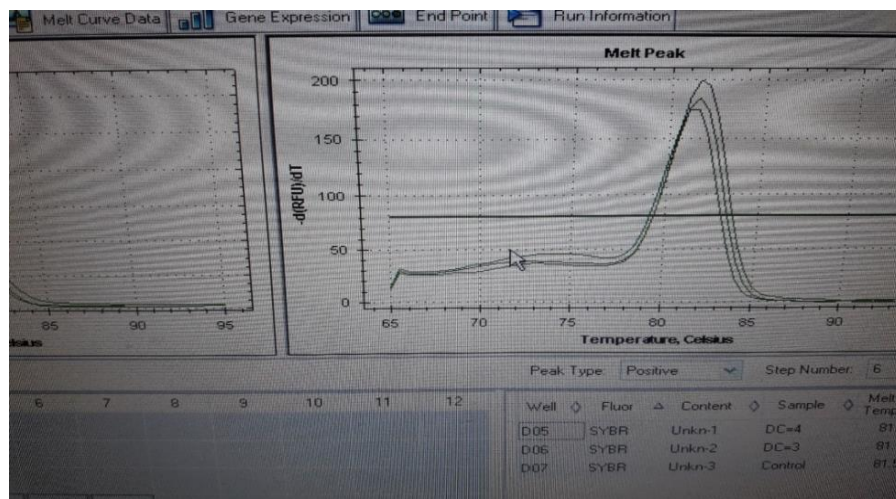


شکل (۴-۱۲) تغییرات ژن آپوتوزی Bax تحت تاثیر Duty Cycle های مختلف پلاسما.

همانطور که در نمودار دیده میشود ژن Bax در D.C=5 بیشترین مقدار را دارد و این بیانگر آن است که سلول های سرطانی در این مقدار جریان پلاسمایی بیشترین آپوتوز را دارند.

ژن های Bcl-2 و Bax از جمله ژن های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوتوز به شمار می روند. از آنجا که در سلول های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوتوز به هم خورده و سلول ها برای رشد و تکثیر بی رویه خود نیاز به مهار آپوتوز دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن ها و فرایند سرطانی شدن وجود دارد. بنابراین بررسی تغییرات بیانی این ژن ها می تواند از جمله هدف های درمانی و یا تشخیصی در مطالعات سرطان به شمار رود [۳۵]. شکل (۴-۱۲) تغییرات ژن آپوتوزی Bax را تحت تاثیر جریان های متفاوت پلازما نشان می دهد. همانطور که در نمودار دیده شد ژن Bax در Duty Cycle = 5 بیشترین مقدار را دارد و این بیانگر آن است که سلول های سرطانی در این مقدار جریان پلاسمایی بیشترین آپوتوز را دارند.

در تست MTT نیز همین مقدار دوز پلازما بیشترین مرگ سلولی را به همراه داشت، در نتیجه با این تست میتوان صحت نتایج تست MTT را ثابت کرد.



شکل (۴-۱۳) منحنی ذوب (melt curve).

شکل (۴-۱۳) منحنی ذوب (melt curve) نمونه‌ها را نشان می‌دهد. از آنجایی که هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود می‌باشد بنابراین منحنی‌های یک ژن در تمام نمونه‌ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید تمام منحنی‌ها تک قله باشند. در نتیجه نمودار بدست آمده در آزمایش ما یک نمودار قابل قبول است.

یافته‌ها ما نشان دهنده‌ی درستی این فرضیه هستند که تنظیم فرسایشی اپی ژنیک در سلول‌های سرطانی شامل سلول‌های سرطانی تومور‌ها ممکن است در اثر پلاسما ایجاد شود. بررسی‌های بیشتری در این زمینه باید انجام شود تا تاثیر شرایط مختلف متیلاسیون شناسایی شود. همچنین بررسی‌های بیشتر میتواند نقش اپی ژنیک پلاسما را بیشتر مشخص کند تا روش‌های درمانی بهتری برای بافت‌های سرطانی شناسایی شود.



# ۵ – فصل پنجم: جمع بندی، نتیجه گیری و پیشنهادات برای پژوهش های آینده

## ۱-۵ نتیجه گیری

در این پژوهش اثر پلاسمای اتمسفری سرد بر سلول های سرطانی پستان رده ی MCF\_7 با استفاده از تست های سمیت سلولی MTT، مهاجرت سلولی و واکنش Real Time PCR بررسی شده است. نتایج حاصل به طور خلاصه به شرح زیر می باشند.

**تست MTT:** این تست نشان می دهد که با افزایش Duty cycle در سلول های سرطانی آپوپتوز رخ می دهد و تعداد سلول ها کاهش می یابد و همچنین با گذشت زمان این کاهش سلول ادامه دارد که این موضوع حاکی از افزایش گونه های فعال اکسیژن و مواد سمی از قبیل  $H_2O_2$  و  $NO$  بین مواد غذایی سلول است. این مولکول ها با وارد شدن به داخل سلول های سرطانی آسیب قابل توجهی به سیستم آنتی اکسیدانی و باعث شکست دو رشته ای DNA می شوند.

**تست مهاجرت سلولی:** با استفاده از تست مهاجرت سلولی می توان تاثیر پلاسما را بر مهاجرت سلول ها بررسی کرد. مشاهدات نشان می دهند که مهاجرت سلول های سرطانی تحت تاثیر تابش پلاسما افزایش می یابد. همچنین این تست نشان می دهد که با کاهش Duty Cycle مهاجرت سلول های سرطانی افزایش می یابد که این موضوع حاکی از افزایش پروتئین اینتگرین موجود در سلول ها است. پروتئین اینتگرین واسطه چسبندگی سلولی و مهاجرت سلولی است.

**تست Real Time PCR و بررسی بیان ژنی:** تست Real Time تغییرات ژن Bax که ژن القای آپوپتوز است را تحت تاثیر پارامتر های مختلف پلاسما نشان می دهد. مشاهدات نشان می دهند که با افزایش Duty Cycle ژن Bax موجود در سلول ها افزایش می یابد و این موضوع حاکی از افزایش آپوپتوز در بین سلول ها است.



## ۲-۵ پیشنهادات و کارهای آینده

- ۱- استفاده ترکیبی از  $O_2$  و  $He$  می تواند نتایج بهتری در آپوتوز سلول های سرطانی نشان دهد. اضافه کردن درصدی از گاز اکسیژن باعث افزایش گونه های فعال اکسیژن در پلاسما میشود و تاثیر بیشتری را در متلاشی کردن سلول های سرطانی دارد.
- ۲- درمان ترکیبی نانوذرات و پلاسما می تواند تاثیر متفاوتی بر روی سلول ها داشته باشد.
- ۳- تغییر در میزان محیط کشت. میزان محیط کشت سلول می تواند بر میزان تاثیر پلاسما بر روی سلول های کف ظرف موثر باشد.
- ۴- تاثیر تابش پلاسما بر روی سلول های سالم.

# مراجع

- [1] Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Hum Reprod Update* 2009; 15:323-39.
- [2] Akbari ME, Khayamzadeh M, Khoshnevis SJ, Nafisi N, Akbari A. Five and ten years survival in breast cancer patient's mastectomies vs. breast conserving surgeries personal experience. *Iran J Cancer Prev* 2008; 1:53-56.
- [3] Lowe SW, and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-95.
- [4] Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M, et al. (2013) Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 8(9): e73741. doi:10.1371/journal.pone.0073741
- [5] KATHERINE L. NATHANSON , RICHARD WOOSTER & BARBARA L. WEBER . Breast cancer genetics: What we know and what we need . 2001 Nature Publishing Group
- [6] Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reproductive biomedicine online*. 2005;10(6):729-34.
- [7] von Wolff M, Montag M, Dittrich R, Denschlag D, Nawroth F, Lawrenz B. Fertility preservation in women--a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPROTEKT. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011;284(2):427-35

[8] Williams SA, Schreier AM. The effect of education in managing side effects in women receiving chemotherapy for treatment of breast cancer. *Oncol Nurs Forum* 2004;31(1):E16–23.

[۹] معصومه فرهادی , دکتر فرشاد صحبت زاده, دکتر سعید میرزا نژاد. مطالعه تجربی جت

پلاسمای تولید شده از گازهای الکترونگاتیو و بی اثر. دانشگاه مازندران. سال ۱۳۹۰

[10] 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.

[11] F.F.Chen, Introduction to plasma physics and controlled fusion, Volume : Plasma Physics (1984)

[12] Akram Mohammadi Nokhandani, Syede Mahsa Taheri Otaghsara, Mahboubeh Khadem Abolfazli , Masoumeh karimi, Fereshteh Adel , Hamed babapour, Gholamreza Atae. A Review of New Method of Cold Plasma in Cancer Treatment. Babol University of Medical Science, Babol, Iran. Azad Islamic University- Sciences and Researches Branch, Tehran, Iran

[13] Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Experimental dermatology*. 2016.

[14] Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2010;8(12):968-76.

[15] Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the

wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. PloS one. 2013;8(11):e79325.

[16] Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. Archives of biochemistry and biophysics. 2016;605:76-85.

[17] von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. European journal of cancer. 2009;45(9):1547-53.

[۱۸] آویده محمدی ، شیوا ایرانی ، سید محمد اطمیابی " بررسی مهار رشد سلولهای سرطانی پستان با استفاده از پلاسمای اتمسفری سرد " مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد\_ دوره ۲۵ ، شماره ۲، تابستان ۹۴ ، صفحات ۱۲۵ تا ۱۳۱

[19] Gay-Mimbrera J, Garcia MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, Garcia-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. Advances in therapy. 2016;33(6):894-909.

[20] 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.

[21] 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. Scientific reports. 2015;5:18339.

[22] 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. British journal of cancer. 2011;105(9):1295-301.

- [23] Weiss M, Gumbel D, Gelbrich N, Brandenburg LO, Mandelkow R, Zimmermann U, et al. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. *In vivo*. 2015;29(5):611-6.
- [24] Irani S, Shahmirani Z, Atyabi SM, Mirpoor S. Induction of growth arrest in colorectal cancer cells by cold plasma and gold nanoparticles. *Archives of medical science : AMS*. 2015;11(6):1286-95.
- [25] Zhu W, Lee SJ, Castro NJ, Yan D, Keidar M, Zhang LG. Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma and Drug Loaded Core-shell Nanoparticles on Inhibiting Breast Cancer Cell Growth. *Scientific reports*. 2016;6:21974.
- [26] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
- [27] Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Ehemann C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(9):714-36.

[۲۸] خرمی زاده م ، فلک ر ، تهرانی م ، بروک ا ، (۱۳۸۸) " مبانی و اصول مقدماتی تکنیک

های کشت سلولی " چاپ اول ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، تهران ، ص ۶۰ ، ص ۷۸ .

- [29] van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree I. (eds) *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 731. Humana Press.
- [30] C R. Justus, N Leffler, M Ruiz-Echevarria, and Li V. Yang , *In vitro Cell Migration and Invasion Assays, Journal of Visualized Experiments* ,(2014).

- [31] Van der Velden, VHJ, Hochhaus, A Cazziga, G and et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR : principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003. 1013-1034.
- [32] Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer*. 2012;130(9):2185-94.
- [33] Koritzer J, Boxhammer V, Schafer A, Shimizu T, Klampfl TG, Li YF, et al. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma. *PloS one*. 2013;8(5):e64498.
- [34] Wenjun Guo and Filippo G. Giancotti , Integrin signalling during tumour progression , *Nature reviews Molecular cell biology*, 2004
- [35] H Azimian, M Dayyani, MTB Toossi , Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy , *Iranian journal of basic* , 2018



## **Abstract**

Using cold plasma reduces cell proliferation, binding and migration and induces apoptosis in neoplastic cells, while show no damaging effect on healthy cells. Therefore, it can be a good therapeutic treatment compared to other treatments for cancer cells. In this study, helium plasma jet was used to generate create plasma at room temperature as a Spot radiation for the treatment of breast cancer cells (MCF\_7) with a frequency of 20 kHz, voltage 5 kv, flow 2.5 L/min in time 120 seconds with Three different doses (duty cycle 3,4,5). Using the cytotoxicity test (MTT), the percent survival of the treated cells was examined. Also, Migration Assay and Real Time PCR tests were performed and the results were evaluated by ELISA Reader. According to the results, in MTT experiment at duty cycle = 5  $\mu$ sec , the best effect of plasma and the highest apoptosis was observed, also showed the highest increase in apoptosis in 72 hours after treatment. But in the cell migration test, the results of the treatment indicated an increase in cell migration compared to the control group. Real Time PCR results indicate that Bax gene (Gene induced apoptosis) expression was higher in Duty cycle = 5  $\mu$ sec, which means that it has the most induction of apoptosis.

**Keywords:** Cold Plasma, MCF\_7, MTT, Migration, Real Time PCR, Plasma jet







**Faculty of Physics and Nuclear Engineering**  
**M.Sc. Thesis in Atomic and Molecular Physics**

**Investigation the effect of cold atmospheric plasma torch on toxicity  
and cell migration of breast cancer**

**By**

**Asma Eshaghi**

**Supervisors**

**Dr. Mehdi Momeni**

**Dr. Seyed Iman Hosseini**

**Advisor**

**Dr. Nasim Borhani**

**September 2018**