

Research of the effect of cold atmospheric plasma using helium gas on cervical cell lines

Mahsa Vatani¹, Simzar Hosseinzadeh^{2,3}, Amirhossein Sari¹, Azam Rahimpour^{2,3}, Hamidreza Ghomi Marzdashti⁴

¹ Department of Physics, S.R.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Invasive cervical cancer is well-known as the second most common malignancy in women after breast cancer, with an increasing incidence. Here, for the first time, the influence of the corresponding plasma type was examined on the human epithelial carcinoma (HeLa) cell line in the presence of cold plasma of He.

Materials and methods: OES confirmed the development of radical species of $N_2I_2^+$, N_2II^- , $He\cdot$ and $O\cdot$. biological impacts were investigated by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Real-Time PCR.

Results: Electron density and temperature were measured using the Stark broadening method at atmospheric pressure in two emission lines. In general, this method is defined based on Stark broadening, which is dependent on temperature and electron density. BY using MTT method, apoptotic effect of the plasma showed the group with the smallest distance from the jet (3 cm) and longest treatment time (3 min) led the cell shape into a collapsed round type, and the cells lost their attachment over time. When measuring the remaining radical developed by DPPH, more radical formation occurred when the incubation time was increased from 30s to 60s. Real-time PCR confirmed the highest levels of p53, Bax and caspase 3/8 expressions after 60 s. The expression of Bcl2 as an anti-apoptotic gene showed a significantly lower value.

Conclusion: Taken together, the results confirmed cold plasma parameters are essential factors that must be optimized to reach therapeutic outcomes in clinical trials.

Keywords: Cervical cancer, Cold atmospheric plasma, Radical species, Stark broadening .

Cited as: Vatani M, Hosseinzadeh S, Sari A, Rahimpour A, Ghomi Marzdashti H. Research of the effect of cold atmospheric plasma using helium gas on cervical cell lines. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(2): 154-165.

Correspondence to: Simzar Hosseinzadeh

Tel: +98 9903334586

E-mail: symzar.hosseinzadeh@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8749-2447

Received: 12 Aug 2025; **Accepted:** 19 Nov 2025

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی

دوره ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۵، صفحات ۱۵۴ تا ۱۶۵

بررسی اثر پلاسمای اتمسفر سرد با استفاده از گاز هلیوم روی رده سلولی دهانه رحم

مهسا وطنی^۱، سیم زر حسین زاده^{۲،۳}، امیرحسین ساری^۱، اعظم رحیم پور^{۲،۳}، حمیدرضا قمی مرودشتی^۴^۱ گروه فیزیک، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ مرکز تحقیقات مهندسی بافت و نانوبیو تکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران^۳ دانشکده تکنولوژی در پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران^۴ انیستیتو تحقیقاتی لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان دهانه رحم به عنوان دومین بدخیمی شایع در زنان پس از سرطان سینه شناخته شده است و میزان بروز آن رو به افزایش است. در اینجا، برای اولین بار، تأثیر نوع پلاسمای مربوطه بر روی رده سلولی انسان (HeLa) در حضور پلاسمای سرد He بررسی شد. **روش بررسی:** OES توسعه گونه‌های رادیکالی $N_2I_2^+$ ، N_2III^- ، He^+ و O^- را تأیید کرد. اثرات بیولوژیکی با استفاده از ۳- $4.5 \mu\text{M}$ دی-متیل تیازول-۲-یل-۲- $5.5 \mu\text{M}$ دی فنیل تترازولیم بروماید (MTT)، ۲- $2 \mu\text{M}$ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و PCR در زمان واقعی بررسی شد. **یافته‌ها:** چگالی الکترون و دما با استفاده از روش پهن‌شدگی اشتارک در فشار اتمسفر در دو خط انتشار اندازه‌گیری شدند. به طور کلی، این روش بر اساس پهن‌شدگی اشتارک تعریف می‌شود که وابسته به دما و چگالی الکترون است. در MTT، اثر آپتوزی پلاسما نشان داد که با کمترین فاصله از جت (۳ سانتی‌متر) و طولانی‌ترین زمان تیمار (۳ دقیقه) شکل سلول را به نوع گرد فروپاشیده تبدیل کرد و سلول‌ها چسبندگی خود را با گذشت زمان از دست دادند. هنگام اندازه‌گیری رادیکال باقی‌مانده تولید شده توسط DPPH، تشکیل رادیکال بیشتر زمانی رخ داد که زمان انکوباسیون از ۳۰ ثانیه به ۶۰ ثانیه افزایش یافت. در PCR زمان واقعی بالاترین سطح بیان Bax p53 و کاسپاز ۳/۸ را پس از ۶۰ ثانیه تأیید کرد. بیان Bcl2 به عنوان یک ژن ضد آپتوز مقدار قابل توجهی پایین‌تری را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** در مجموع، نتایج تأیید کردند که پارامترهای پلاسمای سرد عوامل ضروری هستند که باید برای دستیابی به نتایج درمانی در آزمایشات بالینی بهینه شوند.

واژگان کلیدی: سرطان دهانه رحم، پلاسمای اتمسفری سرد، رادیکال‌های آزاد، پهن‌شدگی اشتارک.

مقدمه

گاز یونیزه شده به عنوان پلاسما شناخته می‌شود. این محیط شامل ذرات خنثی و باردار است. زمانی که یک ماده جامد تا دمای کافی گرم شود ابتدا به مایع و سپس به گاز تبدیل می‌شود با ادامه گرمادهی به گاز تعداد بیشتری از ذرات یونیزه می‌شود که به آن حالت چهارم ماده می‌گویند. پلاسما بر اساس

تعادل ترمودینامیکی به دو دسته تقسیم می‌شود: پلاسما در حالت تعادل ترمودینامیکی و پلاسما در حالت عدم تعادل ترمودینامیکی. در پلاسماهایی که در تعادل ترمودینامیکی هستند دمای الکترون‌ها برابر گونه‌های دیگی مانند یون و اتم و مولکول‌ها هستند که دمای آن به میلیون‌ها درجه می‌رسد. اما پلاسماهایی که در تعادل ترمودینامیکی نیستند گازهای ضعیف یونیزه‌اند و دمای آنها کمتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هستند که به آن پلاسمای سرد می‌گویند. در این مطالعه هم از پلاسمای سرد استفاده شده است. این نوع پلاسما به دلیل توانایی تولید گونه‌های شیمیایی فعال و امکان نفوذ به فضاها

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت و نانوبیو تکنولوژی پزشکی، سیم زر حسین زاده (email: symzar.hosseinzadeh@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0001-8749-2447

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۵/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۸/۲۸

محدود دارای مزایای منحصر به فردی هستند. پلاسماهای دمای پایین، که به عنوان پلاسماهای اتمسفری سرد (CAPs) نیز شناخته می‌شوند، زمانی تولید می‌شوند که انرژی جنبشی الکترون‌های محصور شده توسط پلازما بیشتر از یون‌ها و مولکول‌های موجود در گاز خنثی باشد و منجر به تخلیه پلاسمای غیر تعادلی هنگام اعمال میدان الکتریکی شود. به دلیل توانایی این پلاسماهای دمای پایین (CAPs) در عملکرد در دمای اتاق یا نزدیک به آن، می‌توان آنها را با خیال راحت به زیرپایه‌های بیولوژیکی مختلف بدون ایجاد هیچ گونه آسیب حرارتی اعمال کرد. پلازما علاوه بر ایمن بودن از نظر بیولوژیکی، دارای چندین جزء فعال بیولوژیکی، مثل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS)، یون‌ها و الکترون‌ها هستند که از طریق عمل هم‌افزایی خود، می‌توانند انواع پاسخ‌های بیولوژیکی را در اشکال مختلف برای درمان از طریق پلازما ایجاد کنند. علاوه بر این، ابعاد کوچک منبع پلازما، استفاده از آن را در سرطان تسهیل می‌کند، در حالی که جت پلازما را می‌توان به راحتی روی سطح غیر یکنواخت اعمال کرد. علاوه بر این، یکی دیگر از مزایای CAP، هزینه تولید نسبتاً پایین منبع تولید پلازما است که می‌تواند به کاهش بار مالی تحمیل شده توسط درمان‌های مرسوم بر سیستم مراقبت‌های بهداشتی کمک کند. با این وجود، همان‌طور که قبلاً گفته شد، تولید CAP با یک میدان الکتریکی و انتشار فوتون همراه است. بنابراین، برای اینکه CAP به طور ایمن برای درمان تغییرات انواع مختلف سلول‌ها و بافت‌های بیولوژیکی استفاده شود، باید یک منبع مناسب و پارامترهای عملیاتی برای تولید پلازما با دقت انتخاب شوند تا از هرگونه آسیب حرارتی جلوگیری شود (۱). یک استراتژی جدید برای تکامل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) پلاسمای اتمسفر سرد (CAP) است. این ترکیبات شیمیایی فعال مربوط به تخریب میکروبی توسط ماکروفاژها (۲)، اتساع عروق (۳)، هم‌ایستایی هموستاز (۴)، پاسخ سیستم ایمنی (۵) و کنترل تکثیر سلولی (۶) و تمایز (۷) است. CAP می‌تواند به طور انتخابی سلول‌های سرطانی را در مقایسه با درمان‌های سنتی سرطان فقط با کشتن آنها تحت تأثیر قرار دهد (۸). سطح بالاتر ROS می‌تواند به سلول‌های سرطانی آسیب برساند، در حالی که سلول‌های طبیعی می‌توانند این میزان بالای رادیکالی را تحمل کنند. بنابراین، رادیکال‌ها می‌توانند به‌طور انتخابی سلول‌ها را بسته به شرایط فیزیولوژیکی سلول‌ها از بین ببرند (۹). به این ترتیب پلاسمای سرد به عنوان عاملی با خواص شیمی درمانی، به ویژه در

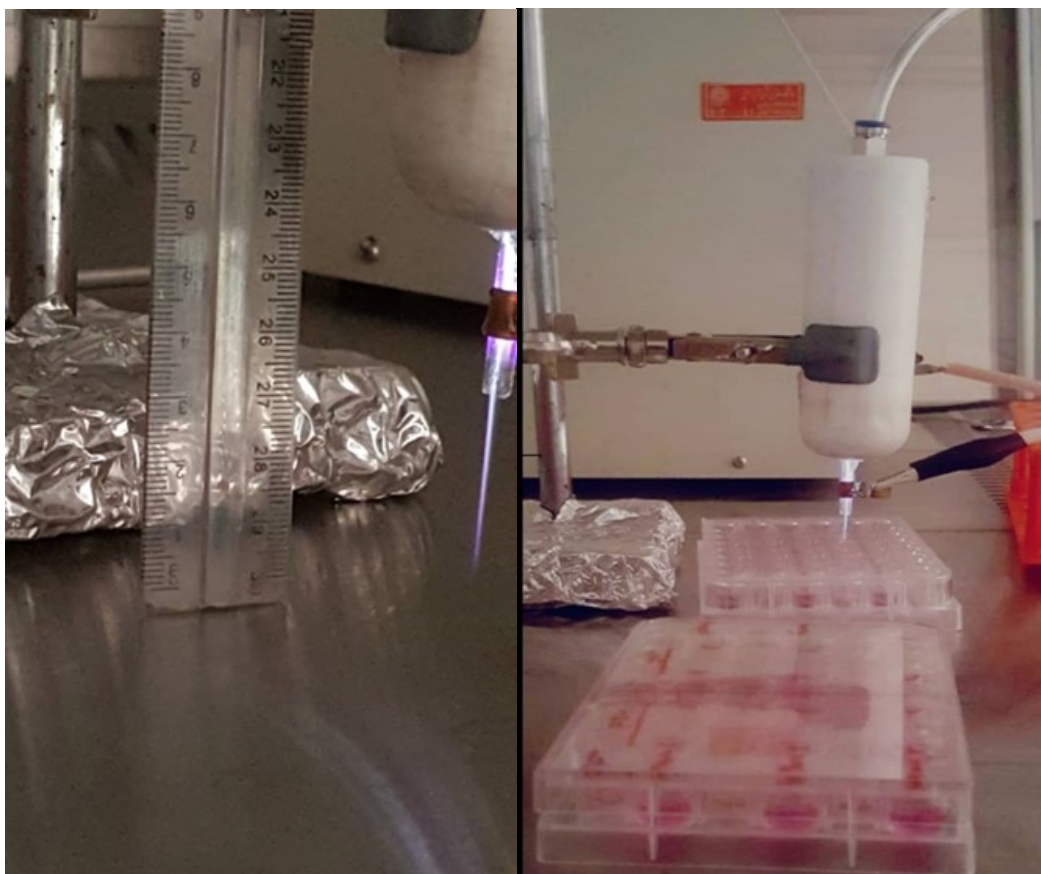
سرطان‌هایی با مقاومت بالا به داروهای ضد سرطان مانند سرطان کندروسارکوم یا سرطان استخوان اثر بخش باشد (۱۰). از این نظر، مطالعات قبلی تایید کردند که CAP باعث القای آپوپتوز در بدن می‌شود و برای ۴۶ درصد از سلول‌های بدخیم مقاوم به چند دارو اثر بخش است (۱۱). مسیر مرگ سلولی توسط CAP مرتبط به فشار اکسیداتیو حاصل از استرس اکسیداتیو است که باعث اختلال در عملکرد میتوکندری و سیستم اندوپلاسمی و در نهایت مرگ سلولی است. از سوی دیگر روش‌های سنتی درمان سرطان از جمله شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی، عوارض جانبی دارد و می‌تواند به بافت‌های اطراف آسیب برساند (۱۲). علاوه بر این، داروهای سرطان‌گران هستند و بیماران به سختی قادر به پرداخت هستند، و این داروها همراه با درد و عوارض جانبی است که در مقابل، CAP یک گزینه غیر تهاجمی است و باعث می‌شود کمترین میزان آسیب به بافت‌های سالم وارد شود و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است (۱۳). این یونی‌زاسیون در دمای اتاق ممکن است در مقایسه با داروهای UV و سرطان از امکانات بیشتری برخوردار باشد، زیرا این روش‌ها بر ساختار DNA تأثیر می‌گذارد که می‌تواند ژن‌های خاصی را تحریک یا مهار کند. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که معمولاً در طول تابش تولید می‌شوند، در پراکسیداسیون لیپید و آسیب DNA نقش دارند، که هر دو فرآیند با مکانیسم‌های بدخیم، از جمله سرطان دهانه رحم مرتبط هستند. در این زمینه، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند نقش مهمی در تعدیل تحولات نئوپلاستیک و عفونت‌های پایدار همانند HPV داشته باشد. همچنین، کمبود مواد مغذی مرتبط با رژیم غذایی، مانند کمبود ویتامین‌ها و کمبود ریزمغذی‌ها، به عنوان عوامل اصلی آسیب به سیستم ایمنی و DNA پیشنهاد شده‌اند. علاوه بر این، ارتباط بین سیستم ایمنی و التهاب بسیار قبل از ارتباط بین سیستم ایمنی و فرآیندهای بدخیم شناخته شده بود. سهم عوامل ایمنی، از جمله سیتوکین‌ها و سلول‌های نفوذی، در توسعه سرطان شناسایی شده است. علاوه بر این، همبستگی‌های قوی بین آسیب DNA یا اختلال ماتریکس خارج سلولی مرتبط با ROS و تحریک فعالیت سیتوکین‌های پیش‌التهابی در فرآیندهای رشد تومور نشان داده شده است (۱۴). در مطالعه‌ای نشان داده شد که فوتون‌های UV هیچ تاثیری بر سلول‌های سرطانی ملانوما (B16/F10) ندارند (۱۵). فریدمن و همکارانش برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ در مورد خواص آپوپتوتیک پلازما در برابر سلول‌های سرطانی

منجر به مرگ سلولی ایمنوژنیک و همچنین افزایش حساسیت به سایر عوامل استرس‌زای خارجی، مانند درمان‌های سرطان می‌شود. CAP به عنوان یک روش جدید امیدوارکننده در درمان سرطان ظهور کرده است که باعث مرگ انتخابی سلول‌های تومور در سرطان‌های ریه، سینه، تخمدان، سر و گردن و دستگاه گوارش و سایر سرطان‌ها می‌شود و حداقل تأثیر را بر بافت‌های سالم اطراف دارد (۱۷). در این مطالعه، جت پلاسما ساخته شد و رده سلولی HeLa کشت داده شد و پارامترهای CAP شامل زمان و فاصله در نظر گرفته شد. برای زنده ماندن سلول، کشت سلولی انجام شد. بیان ژن و همچنین رادیکال تولید شده توسط CAP مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

از پلاسما جت (ساخت شرکت High Tech Company, 0045, Tehran, Iran) که از گاز هلیوم پر شده است برای این مطالعه استفاده شد (شکل ۱). این دستگاه مجهز به ۲ الکتروده مسی استوانه‌ای موازی بود. این الکترودها شامل یک الکتروده مسی

گزارش دادند (۱۶). CAP نه تنها گونه‌های شیمیایی فعال تولید می‌کند، بلکه با ایجاد میدان الکتریکی بزرگ مانند روش‌های الکتروپوراسیون، نفوذ سلول را افزایش می‌دهد و اجازه می‌دهد تا مولکول‌های بزرگ به راحتی به غشای سلولی منتقل شوند. پلاسما امسفری سرد (CAP) از طریق تحریک میدان الکتریکی ولتاژ بالای گازهای تغذیه‌ای هلیوم یا آرگون تولید می‌شود که منجر به تولید گونه‌های واکنش‌پذیر می‌شود. CAP به طور انتخابی سلول‌های در حال تقسیم سریع را از طریق عوامل شیمیایی (استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های واکنش‌پذیر که عمل آپوپتوز را فعال می‌کند) و همچنین عوامل فیزیکی (نیروهای الکترومغناطیسی که منجر به اختلال در غشای سلولی و در نهایت نکروز می‌شوند) از بین می‌برد. گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS) که در اثر قرار گرفتن در معرض CAP ایجاد می‌شوند، منجر به تغییرات التهابی و سمیت سلولی در سلول‌هایی می‌شوند که در معرض دوزهای به اندازه کافی بالا قرار گرفته‌اند. علاوه بر مرگ سلولی آپوپتوزی ناشی از RONS، نشان داده شده است که CAP



شکل ۱. نمایشگر پلاسما جت هلیوم استفاده شده در این آزمایش و همچنین با خط کش فاصله جت از نوک نازل تا پلیت را نشان میدهد

کشت سلول و اندازه گیری زنده ماندن سلولی با روش

MTT

رده سلولی انسانی سرطان دهانه رحم (HeLa) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و با گلوکز بالا (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, FBS) و ۲ میلی مولار ۱-گلوتامین (Gibco) کشت داده شد. برای رویکردهای کشت سلولی، سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور ۵٪ CO₂ و ۲۰٪ O₂ ذخیره شده و با تریپسین (Gibco) پاساژ داده شدند. زمانی که جمعیت آنها به ۸۰ درصد افزایش یافت. برای این بخش، ۳-۴،۵- [dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dimethylthiazol-2-yl] بروماید (MTT) استفاده شد و پلی استایرن بافت سلول (TCPS) به عنوان گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

به طور خلاصه، سلول‌های HeLa در یک پلیت ۹۶ خانه در ابعاد ۵×۳×۱۰ کاشته شدند. سلول‌ها در هر چاهک به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای محاسبه درصد زنده ماندن سلول طبق فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد زنده ماندن سلول} = \frac{\text{OD سلول های تیمار شده}}{\text{OD TCPS} \times 100}$$

در اینجا OD مخفف چگالی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر است و TCPS مربوط به سلول‌های درمان نشده است. OD مقادیر مربوط به مقادیر جذب بلورهای فورمازان در طول موج ۵۷۰ نانومتر پس از تیمارهای سلولی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT است. برای این آزمایش، محلول MTT در غلظت ۰/۱ درصد به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۳/۵ ساعت، کریستال‌های فورمازان احیا شده با استفاده از آن جمع آوری شد. دی متیل سولفوکسید (Merck, DMSO) به عنوان حلال و مقادیر جذب آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با یک میکروپلیت خوان (BioTek Instruments, ایالات متحده آمریکا) خوانده شد. این غلظت با زنده ماندن سلول بیش از ۹۰٪ به عنوان ارزش زیست سازگار گزارش شد و برای تحقیقات در حضور پلاسمای سرد استفاده شد. سلول‌ها و درصد زنده ماندن سلولی آنها پس از قرار گرفتن در معرض پلاسمای با استفاده از MTT اندازه گیری شد. شرایط و فاصله نازل از پلیت به ترتیب زیر بود. فاصله ۵ و ۳ سانتی متری و زمان ۳۰ ثانیه و یک دقیقه در گروه‌های مختلف اندازه گیری شد.

کمی سازی رادیکال با ارزیابی 1-2-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH) picrylhydrazyl

اندازه‌گیری رادیکال‌های تشکیل شده پس از درمان توسط پلاسمای با استفاده از روش DPPH انجام شد. در اینجا، پلاسمای

مخروطی شکل (کاتد) و دیگری الکتروود بیرونی استوانه‌ای (آنود) با ۸ میله‌های مسی بود که در آن ارتفاع و قطر الکترودهای به ترتیب ۴۵ و ۰/۱۲ میلی متر بود. یک جت پلاسمای پایدار تحت یک منبع تغذیه AC بالا با ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و فرکانس ۵۰ کیلو هرتز بود که برای بدست آوردن این مقادیر ولتاژ و فرکانس، از ترانسفورماتور (Phenix Technologies, MD, USA) استفاده شد. در نتیجه تیمارهای پلاسمادر محدوده طول موج ۳۰۰-۹۰۰ نانومتر با استفاده از لوله‌های آشکارساز (Dräger Safety) CO & AG. آلمان) اندازه گیری شد. برای این نمونه‌ای با حجم ۲۰ میلی لیتر در یک لوله جمع آوری شد و سپس گونه‌های رادیکال حاصل از پلاسمای شناسایی شد.

روش طیف سنجی گسیل نوری (optical emission spectroscopy)

این نوع طیف بخشی از طیف الکترومغناطیسی را در بر می‌گیرد که شامل ناحیه‌های مادون قرمز و مرئی و فرابنفش است. این روش ساده گونه‌های تحریک شده‌ای را که از خود تابش می‌کند شناسایی می‌کند (۱۸).

با این روش می‌توان چگالی الکترون و دمای گاز و شدت میدان الکتریکی را محاسبه کرد.

با استفاده از نسبت شدت دو خط می‌توان دمای الکترون که با دمای تحرک الکترون برابر است محاسبه کرد. فرمول زیر برای محاسبه دمای الکترون به کار می‌رود: معادله (۱) (۱۹)

$$T_e = -\frac{(E_k - E_i)}{k} / \ln\left(\frac{A_k \cdot g_k \cdot I_i \cdot \lambda_i}{A_i \cdot g_i \cdot I_k \cdot \lambda_k}\right)$$

که در آن:

E: تراز انرژی

k: سطوح انرژی بالا و پایین تر

A: احتمال گذار

g: وزن اماری

λ : طول موج

خطوط طیفی در پهن شدن اشتراک برای دو طول موج مشخص چگالی الکترون را نیز به دست می‌آید:

رابطه زیر برای محاسبه چگالی الکترون استفاده می‌شود: معادله (۲) (۱۹)

$$ne = -\exp(44.2476 + 1.20 \cdot \ln(\Delta\lambda_{\frac{1}{2}}) - 0.6 \cdot \ln(T_e))$$

که در آن:

ne: چگالی الکترون (واحد cm^{-3})

$\Delta\lambda_{\frac{1}{2}}$: پهنای کامل در نیمه بیشینه (FWHM)

T_e : دمای الکترون (کلوین)

یافته‌ها و بحث

مولد پلاسمای سرد

برای محاسبه دمای الکترون با استفاده از نسبت شدت دو طیفی از گاز هلیوم در شرایط ذکر شده در ولتاژهای مختلف (۶ و ۸ و ۱۰ کیلوولت) و زمان‌های ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ ثانیه محاسبه شد.

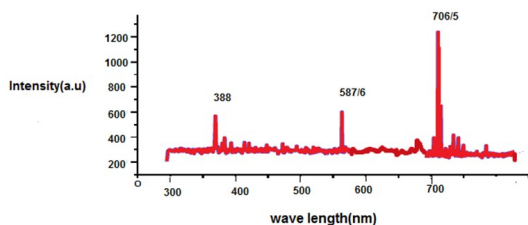
با افزایش ولتاژ، دمای الکترون بطور پیوسته افزایش می‌یابد، به طوری که با افزایش ولتاژ اعمالی میدان الکتریکی قوی‌تر شده و برخوردهای الکترون-ذره پرنرژی‌تر می‌شوند. نتیجه این است که درجه یونش و انرژی الکترون‌ها افزایش یافته و دمای الکترون بالا می‌رود، شدت خطوط طیفی نیز نمایانگر همین مسئله است. افزایش ولتاژ منجر به افزایش شدت خطوط طیفی و در نتیجه افزایش دمای الکترون می‌شود. علت این پدیده یونیزاسیون در اثر میدان الکتریکی بیشتر و تولید انرژی بالا برای تحریک اتم‌هاست.

برای محاسبه چگالی الکترون از روش پهنای کامل در نیمه بیشینه و تحت شرایط فرکانس ۵۰ کیلو هرتز در ولتاژهای (۶ و ۸ و ۱۰) و در زمان‌های مختلف (۱۰ و ۲۰ و ۳۰ ثانیه) محاسبه شد.

با استفاده از نرم افزار مطلب و به کارگیری تناسب گوسی مورد بررسی قرار گرفت. پهنای نیمه بیشینه برای این خط طیفی حدود ۲/۹۹ نانومتر به دست آمد.

افزایش ولتاژ منجر به افزایش چگالی الکترون شد. این امر به دلیل افزایش میدان الکتریکی است که باعث افزایش انرژی الکترون‌ها و شتاب بیشتر آنها می‌شود، در نتیجه برخوردهای بیشتر بین الکترون‌های فعال با اتم‌ها و مولکول‌های محیط رخ می‌دهد.

در نمودار ۱ شدت تابشی دو خط مشخص هلیوم را در طول موج‌های ۵۸۷/۶ و ۷۰۶/۵ نانومتر نشان می‌دهد که برای تعیین دمای الکترون به کار رفته‌اند. در اینجا از رابطه بولتزمن برای محاسبه دمای الکترون استفاده شد (معادله ۱).



نمودار ۱. نتایج طیف سنجی نشری بیان‌گر وجود پیک‌های قوی هلیوم در پلاسما جت است.

مدت ۳۰ و ۶۰ ثانیه و فاصله ۳ سانتی متر در تمام گروه‌ها اعمال شد و محلول DPPH (سیگما، ۰/۱ میلی مولار) به اندازه ۰/۵ میلی لیتر در هر خانه در یک پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. از پلیت و متانول (Merck) به عنوان حلال استفاده شد. برای فعالیت تخریبی سلول‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق باقی ماندند و مقادیر جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر گزارش شد. برای محاسبه درصد آزاد شدن رادیکال از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد رادیکال آزاد ششده} = \frac{\text{OD}(\text{sample}) - \text{OD}(\text{blank})}{\text{OD}(\text{sample})} \times 100$$

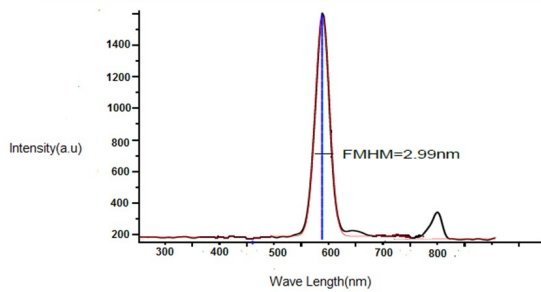
در اینجا مقادیر OD میزان جذب محلول DPPH و گروه‌های تیمار شده را در طول موج نانومتر ۵۲۰ نشان می‌دهد.

آنالیز ژن با Real-Time (PCR)

برای تحلیل ژنتیکی، سلول‌های HeLa با تراکم 2×10^4 سلول/خانه از یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. سلول‌ها در گروه‌های TCPS و گروه‌های تیمار شده با پلاسمای سرد فهرست شدند. همه گروه‌ها در معرض پلاسما به مدت ۳۰ و ۶۰ ثانیه در فاصله ۳ سانتی متری قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت، RNA سلول‌ها پردازش شدند. در اینجا، TCPS به عنوان گروه کنترل برای عادی سازی مقادیر بیان ژن استفاده شد. اول، TRIZol معرف (Gibco) برای استخراج RNA کل انتخاب شد. برای اندازه گیری RNA ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز (Gibco، ۱/۵ درصد) و فرآیند الکتروفورز به منظور اطمینان از خلوص RNA، جذب آن در ۲۶۰/۲۸۰ پس از رقیق سازی با استفاده از (RNase-DNase (Gibco) مورد بررسی قرار گرفت. سپس یک کیت سنتز cDNA (کیت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) انتخاب شد و برای این مرحله پرایمر تصادفی هگزامر انتخاب شد (SinaClon، ایران، ۱ میکرولیتر) و با ۱ میکروگرم RNA در ۹ میکرولیتر RNase-DNase بدون آب مخلوط شد. ۰/۵ میکرولیتر از نمونه‌های cDNA توسط Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q، آلمان) آنالیز شد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع برای عادی سازی بیان ژن‌های نشانگر استفاده شد. ترکیب اصلی PCR از SYBR Green و پرایمرها که توسط Cinagen ایران ساخته شده است، خریداری شد.

آزمون آماری

برای تمامی آزمایش‌ها از نرم‌افزار سیگما پلات و آزمون Student t و ANOVA استفاده شد. آزمون‌های آماری برای مقایسه ۲ و بیش از ۲ گروه به ترتیب انجام شد. ارزش‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۲. تحلیل یک خط طیفی خاص از عنصر هلیوم با طول موج حدود ۶۰۰ نانومتر. FWHM برابر ۲/۹۹ نانومتر بود.

برای محاسبه چگالی از فرمول زیر استفاده می‌شود و فرض می‌کنیم دمای الکترون ۱/۲۸۸ الکترون ولت برای ولتاژ ۱۰ کیلو ولت در زمان ۱۰ ثانیه با جاگذاری در فرمول مقدار نهایی برای چگالی الکترون به دست می‌آید.

$$n_e \cong 3 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$$

مورفولوژی و کاشت سلول

مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با پلاسما پس از ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و به ترتیب در شکل ۲ خلاصه شده است. در تابش پلاسما که در فاصله ۵ سانتی متری به مدت ۱ دقیقه تیمار شده بودند، تعداد سلول نسبت به گروه در فاصله ۳ سانتی متری بیشتر نشان دادند. به این ترتیب گروه با ۳ دقیقه و ۳ سانتی متر، در مقایسه با دو گروه دیگر با کلنی‌های سلولی،

پارامترهای اتمی مورد نیاز (A, E, g) از دیتابیس NIST استخراج شده و در معادله مربوطه جاگذاری می‌شود (۲۰). خطوط انتخاب شده با دو طول موج مربوط به انتقال‌های برانگیختگی سطح انرژی متفاوتی است.

نمودار ۲ اساس روش طیف سنجی نشر نوری را نشان می‌دهد که در آن تابش خطوط با افزایش ولتاژ اعمالی میدان الکتریکی قوی‌تر شده و برخوردهای الکترون-ذره پراثری-تر می‌شوند. نتیجه این است که درجه یونش و انرژی الکترون‌ها افزایش یافته و دمای الکترون بالا می‌رود و شدت خطوط طیفی نیز نمایانگر همین مسئله است.

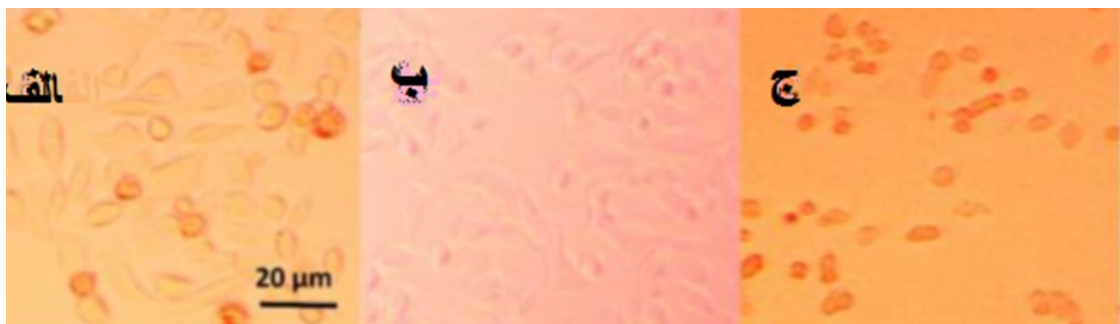
نمودار ۲ مربوط به تحلیل یک خط طیفی خاص از عنصر هلیوم با طول موج حدود ۶۰۰ نانومتر است که برای تعیین چگالی الکترون مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این نمودار پروفایل طیفی خط نشر مشاهده می‌شود و بر روی تابع گوسی پردازش شده است.

در این نمودار محور افقی طول موج بر حسب نانومتر و محور عمودی شدت تابشی بر حسب شدت تابش و نوع برازش گوسین برای تعیین دقیق عرض در نیمه بیشینه و خط انتخابی حدودی ۶۰۰ نانومتر به کار رفته است.

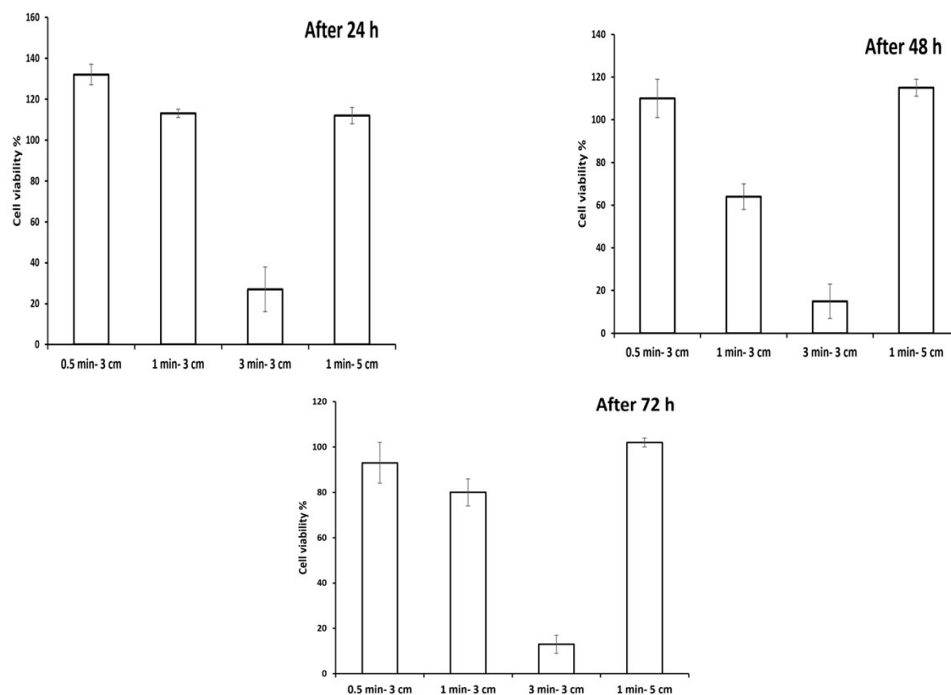
مقدار fwhm برابر ۲/۹۹ نانومتر به دست آمد و پارامترهای برازش نیز آورده شده است که دقت برازش را نشان می‌دهد، مثل عرض گوسی و محله قله ضریب A.

علت پهن شدگی طیف این است که خط طیفی تحت تاثیر اثر اشتراک دچار پهن شدگی می‌شود که مستقیماً به چگالی الکترون وابسته است.

هرچه چگالی الکترونی بیشتر باشد، پهنای طیف بیشتر است (۲۱).



شکل ۲. این شکل نشانگر سلول سل لاین هلا. الف: تابش پلاسما به مدت ۱ دقیقه از فاصله ۵ سانتی متری بعد از ۲۴ ساعت تیمار شدن سلول‌ها، ب: تابش پلاسما به مدت ۱ دقیقه از فاصله ۳ سانتی متری بعد از ۴۸ ساعت تیمار شدگی، ج: تابش پلاسما به مدت ۱ دقیقه از فاصله ۳ سانتی متری بعد از ۷۲ ساعت تیمار شدگی



نمودار ۳. نتایج MMT در هر سه بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعته

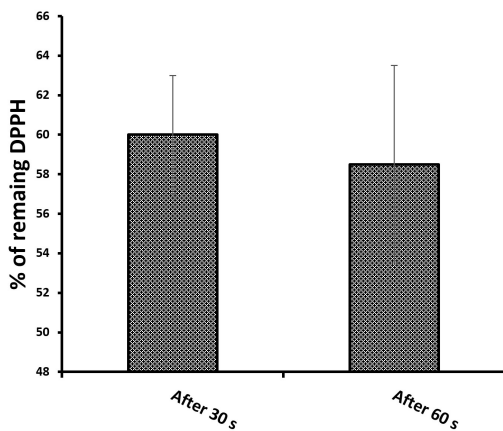
زنده ماندن سلولی کاهش یافت و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به ۷۵، ۴۷ و ۵۱ درصد رسید. این نتایج بحث‌انگیز می‌تواند به کیفیت متغیر ماشین‌های پلاسما مورد استفاده در ارتباط باشد. در این مطالعات هنگامی که فاصله نازل پلاسما از ۳ به ۵ سانتی متر افزایش یافت، در بین گروه‌ها قابلیت زنده ماندن سلولی در مدت زمان تابش ۳۰ ثانیه را به تصویر کشید. در نتیجه، کیفیت درمان‌های پلاسما مرگ سلولی ممکن است به دلیل فاصله بیشتر پلاسما از سلول‌ها محدود شود. نتیجه این است که فاصله بین نوک پلاسما و سلول‌ها پارامتر حیاتی برای قابلیت باکتری‌کشی را نشان می‌دهد. به این ترتیب، قدرت استریل CAP با افزایش شکاف بین نازل و سلول‌ها ضعیف می‌شود (۲۳). در کل، نه تنها زمان درمان برای فعالیت نوری بلکه موقعیت آن مهم است که باید در پلاسماجت تنظیم شود. با توجه به این موضوع، گروه با پلاسمای ۳ سانتی‌متری و ۱ دقیقه‌ای به عنوان نقطه بهینه برای از بین بردن سلول‌ها در حدود ۵۰ درصد برای سنجش‌های مورد نظر گرفته می‌شود. این نوسانات متناظر بین مقادیر در طول زمان پس از مرگ سلولی پس از تابش پلاسما (۲۴ ساعت) و تکثیر سلولی پس از ۴۸ ساعت، به دنبال آن در نقطه زمانی سوم (۷۲ ساعت) با القای بیان ژن آپوپتوزیدست آمده است. به این

تنها چند سلول منفرد داشت. با در نظر گرفتن سایر مطالعات، فاصله از نازل پلاسما و سطح تیمار شده دارای یک تاثیر قابل توجهی در شکل‌گیری گونه‌های رادیکال و مقدار بالاتر رادیکال‌های آزاد شده می‌تواند داشته باشد (۲۲). علاوه بر این، زمانی که فاصله جت پلاسما به ۳ سانتی متر و در زمان درمان ۳ دقیقه تغییر یافت و تعداد سلول‌های متصل افزایش یافت، به وضوح تایید کرد فاصله سلول‌ها از نوک پلاسما می‌تواند تأثیر قوی‌تری بر سلول‌ها نسبت به زمان قرار گرفتن در معرض تابش داشته باشد. بعد از ۷۲ ساعت گروه با فاصله ۵ سانتی متر هیچ شواهد مرتبط با آپوپتوز سلول نشان نداد. این واقعیت تأیید می‌کند که شرایط پلاسما ممکن است تا حدی تأثیرگذار باشد.

اندازه‌گیری با روش MTT

با توجه به درصد زنده ماندن سلول در نمودار ۳، با افزایش زمان درمان پلاسما، مقادیر به دست آمده به شدت کاهش یافت ($p\text{-value} < 0.05$)، به این ترتیب، مقدار به کمتر از ۴۰٪ کاهش می‌یابد. در حالی که گروه‌هایی با زمان درمان ۰/۵ و ۱ دقیقه، بهترین نتیجه را داشت. همان طور که انتظار می‌رفت، گروه ۰/۵ دقیقه مقادیر بالای ۵۰٪ را نشان داد که تأیید می‌کند که شرایط اعمال شده برای رسیدن به نقطه IC_{50} کافی نیست. با توجه به این امر،

عنوان یک پدیده اولیه در طول آپوپتوز سلولی رخ می‌دهد و به دنبال آن آزادسازی سیتوکروم C، فعال شدن کاسپاز و اختلال در عملکرد میتوکندری است.



نمودار ۴. مقدار رادیکال‌های تولید شده با استفاده از تیمار سلول‌ها توسط پلاسما با روش DPPH

با این حال، تفاوت بین تیمار سلولی در بازه زمانی ۳۰ و ۶۰ ثانیه به دلیل نقش مدت زمان پلاسما در سنتز رادیکال ($p\text{-value} < 0.05$) در نتایج ما قابل توجه است. با این حال، تفاوت بین تیمار سلول توسط پلاسما در مدت زمان زمانی ۳۰ و ۶۰ ثانیه به عنوان یک نقش قابل توجه است. توجه به تأثیر مدت زمان پلاسما در تولید رادیکال-های آزاد (مقدار p برابر با ۰/۰۵)، طبق دانش ما، بارز است. منحنی درصد باقیمانده با اندازه گیری مقادیر جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر پس از تیمار سلول‌های هلا با پلاسما به مدت ۳۰ و ۶۰ ثانیه هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت.

Real-Time PCR

درواقع بیان ژن‌های آپوپتوز می‌تواند تأثیر فرآیند فتوتراپی بر سرنوشت سلول را توضیح دهد. ژن‌های آپوپتوز در این مطالعه شامل *bax*، *bcl2*، [27] *p53*، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ هستند (۲۸) که برای ارزیابی الگوی مولکولی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در نمودار ۵ نشان داده شده است. در این کار، مقادیر بیان ژن‌ها پس از نرمال‌سازی در برابر گروه TCPS که هیچ درمانی دریافت نکردند، به دست آمد. علاوه بر این، بیان ژن *GAPDH* به عنوان یک ژن مرجع به عنوان ژن کالیبراسیون برای ژن‌های نشانگر استفاده شد. پس از ۷۲ ساعت، کل RNAها استخراج و برای تشخیص پروفایل بیان ژن استفاده شدند. ژن‌های خاص آپوپتوز به دقت بررسی شدند، از طرفی *bcl2* یک ژن

ترتیب، مقادیر زنده ماندن سلولی به تدریج پس از ۷۲ ساعت به ۶۷ درصد در گروه با شرایط پلاسما زمان ۱ دقیقه و فاصله ۳ سانتی‌متر است. زمانی که شرایط به ۳ دقیقه و ۳ سانتی متر تغییر یافت ۵۱ درصد شد، و به سطح معنی‌داری از مقادیر با تفاوت‌های غیر معنی‌داری رسید ($p\text{-value} > 0.05$) که این خود نشان دهنده تأثیر شدید انرژی تابش پلاسما برای ۳ دقیقه است. از طرفی درصد مرگ سلولی حدود ۳۴ درصد پس از تابش پلاسما به مدت ۱۸۰ ثانیه در فاصله ۳ سانتی متری مشاهده شد (۲۴). این نتایج بحث برانگیز می‌تواند به کیفیت متغیر ماشین‌های پلاسما مورد استفاده در مطالعات مختلف مرتبط باشد. هنگامی که فاصله نازل پلاسما از ۳ به ۵ سانتی متر افزایش یافت، گروه‌ها قابلیت زنده ماندن سلولی مشابهی مانند گروه با زمان تابش ۳۰ ثانیه را به تصویر کشیدند. بنابراین، کیفیت درمان‌های پلاسما در مرگ سلولی ممکن است به دلیل فاصله بیشتر پلاسما از سلول‌ها مربوط شود. نتیجه با ارزیابی مطابقت دارد که نشان می‌دهد پارامتر مهم برای قابلیت باکتری‌کشی پلاسما فاصله بین نوک پلاسما و باکتری است. به این ترتیب، قدرت استریل‌کنندگی CAP با افزایش فاصله بین نازل و سلول‌ها تضعیف می‌شود (۲۵). به طور کلی، نه تنها زمان تابش مهم است، بلکه موقعیت جت پلاسما نیز باید تنظیم شود. با توجه به این موضوع، گروهی با پلاسما ۱ سانتی متر و ۱ دقیقه، به عنوان نقطه بهینه برای از بین بردن سلول‌ها در حدود ۵۰ درصد برای سنجش‌های زیر در نظر گرفته می‌شود. انکوبه در گروه بندی تابش پلاسما جت در مدت ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه و ۳ دقیقه هر سه به فاصله ۳ سانتی متری تابش از نوک نازل تا سطح پلیت سلولی و یک گروه زمانی یک دقیقه در فاصله ۵ سانتی متری همه گروه‌ها با مقایسه همدیگر معنی‌دار بودند.

تحلیل مهار رادیکال‌ها با روش DPPH

خاصیت ضد سرطانی CAP به ظرفیت آن برای توسعه گونه‌های رادیکال بستگی دارد (۲۶). مقدار رادیکال‌های تولید شده با استفاده از تیمار سلول‌ها توسط پلاسما با روش DPPH در نمودار ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، مقادیر گروه‌های TCPS تقریباً یکسان است ($p\text{-value} > 0.05$) و به ویژه، جذب بیشتری نسبت به مقادیر مربوط به سایر گروه‌ها دارد. این نتایج اثرات قدرتمند پلاسما را برای تولید گروه‌های رادیکال تایید می‌کنند. مطالعات قبلی تأیید کردند که تولید رادیکال به

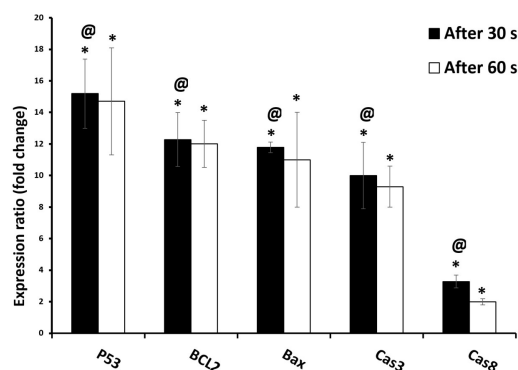
با رابطه غیر قابل توجه در مقایسه با سایر گروه‌ها تأیید کرد (۳۱). در نتیجه، تفاوت بین بیان *bcl2* گروه پلاسما برای ۶۰ ثانیه قابل توجه بود، در مقایسه با *bax 1* که رابطه ناچیزی با دیگر گروه‌ها با شرایط دارد. ژن دیگری که باید مورد بحث قرار گیرد *p53* است که به عنوان یک ژن ضد بقا شناخته می‌شود (۳۲) و بیان بالای آن مهار موفقیت‌آمیز سرطان را تأیید می‌کند. تغییر آن در برابر گروه با زمان درمان ۶۰ ثانیه، $20/13 \pm 1/1$ است. با این حال، مقدار مرتبط با این گروه با زمان پلاسما ۳۰ ثانیه، $19 \pm 2/5$ است و وقتی هر دو گروه با دیگران مقایسه می‌شوند، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p\text{-value} > 0/05$). اگرچه، بیان این گروه‌ها به طور قابل توجهی بالاتر از گروه‌های باقی مانده است ($p\text{-value} < 0/05$) که نقش خاص فتوتراپی را بر بیان این ژن تأیید می‌کند. این نتیجه با مطالعه‌ای که افزایش وابسته به زمان در *p53* را در CAP نشان می‌دهد، در تضاد است (۳۳). در حالی که، در حال حاضر بیان *p53* تغییر نکرده است.

در مورد دیگر زمان پلاسما از ۳۰ ثانیه به ۶۰ ثانیه افزایش یافت. دو ژن کاسپاز دیگر، شامل کاسپاز ۳ و ۸ به عنوان ژن‌های آپوپتوز، می‌توانند اثر ضد سرطانی درمان CAP را بهتر تضمین کنند. در اینجا، بیان این ژن‌ها در گروه ترکیبی که به مدت ۶۰ ثانیه با پلاسما درمان شدند، بالاتر است. بیان کاسپاز ۳ به دلیل فعال شدن آن توسط کاسپاز ۸ بیشتر بود (۳۴). این بیان اضافی کاسپاز ۳، تجزیه آن توسط کاسپاز ۸ را که پس از درمان پلاسما رخ داد، تأیید کرد. نتیجه با مطالعه‌ای که به بررسی درمان فوتوترمال CAP می‌پردازد، مطابقت دارد (۳۵). مشابه مقاله دیگری، کاسپاز و بیان آن پس از درمان پلاسما (۳۶) در بررسی حاضر دست نخورده باقی ماندند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه، قدرت درمانی پلاسما سرد را در سرطان دهانه رحم ارزیابی کرد. مشاهدات مرتبط، اثر درمانی برای سلول‌های HeLa تیمار شده تأیید کرد، که به ویژه هنگامی که تیمار پلاسما در فضای نزدیک‌تر و برای مدت زمان طولانی‌تر اعمال شد، افزایش یافت. مقدار زیست سازگار برای بهینه‌سازی CAP در نظر گرفته شد. در پلاسما با شرایط شامل ۱ سانتی‌متر به مدت ۱ دقیقه، مقادیر بیان بالاتر نشانگرهای *p53*، *bax* و کاسپاز ۳ و ۸ و مقدار بیان

مهارکننده تکثیر سلولی است و بنابراین باعث کاهش نگهداری سلول می‌شود (۲۹). طبق نتایج، کمترین مقدار بیان ژن متعلق به گروهی است که در مدت ۶۰ ثانیه تابش پلاسما تیمار شدند. روابط بین این گروه‌ها و سایرین از نظر آماری متمایز هست. از سوی دیگر، گروه‌هایی که در مدت زمان ۳۰ ثانیه تیمار شدند، بیان ژن آنها، مقدار بالاتری داشتند ($p\text{-value} < 0/05$).



نمودار ۵. آنالیز Real-Time PCR سلول‌های هلا پس از ۷۲ ساعت تیمار پس از تیمارهای پلاسما به مدت ۳۰ و ۶۰ ثانیه. نمادهای * و @ به ترتیب روابط معنی‌داری بین گروه‌ها و TCPS پس از ۳۰ و ۶۰ ثانیه را نشان می‌دهند.

در مجموع، با توجه به بیان *bcl2* بین گروه‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که نقش درمانی پلاسما زمانی آشکار می‌شود که مدت زمان تابش پلاسما طولانی‌تر باشد. همان طور که در بالا ذکر شد، سلول‌هایی که اصلاً تیمار نشده بودند، برای کالبراسیون سایر ژن‌ها استفاده شدند. در این راستا، سطح بالاتر بیان *bcl2* در مقایسه با گروه کالبراسیون، می‌تواند با گروهی مرتبط باشد که تکثیر سلولی غیرقابل کنترلی داشتند. این تکثیر سلولی بیشتر با این واقعیت توضیح داده می‌شود که پس از مدتی، به دلیل رشد زیاد، جمعیت سلولی شروع به خود تخریبی کرد. ژن خاص دیگر *bax* است که از خانواده‌ای از ژن‌های مرتبط با آپوپتوز سلولی تشکیل شده است (۳۰). گروهی که با فاصله ۳ سانتی متری و مدت ۱ دقیقه ای پلاسما تیمار شده بودند، بالاترین مقدار را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان دادند ($p < 0/05$). در مقابل، گروهی که با پلاسما به مدت ۳۰ ثانیه تیمار شده بودند، بالاترین مقدار را تأیید کردند که نشان می‌دهد نانوذرات خالی می‌توانند آپوپتوز سلولی را ایجاد کنند. در اینجا، بیان *bax* در گروه تحت درمان بالاتر بود ($p\text{-value} < 0/05$) و نتایج، بیان پایین‌تر *bcl2* را در مقایسه

پایین تر bcl2 را نشان داد. به طور کلی، پلاسما باید از نظر فاصله و همچنین زمان درمان تنظیم شود. برای رسیدن به این نتیجه، به نظر می‌رسد نیاز مبرمی به توسعه ابزارهای

جدید برای متمرکز کردن انرژی پلاسما در محل بافت سرطانی وجود دارد.

REFERENCES

1. Negrescu AM, Zampieri L, Martinez E, Cimpean A. The Potential of a Novel Cold Atmospheric Plasma Jet as a Feasible Therapeutic Strategy for Gingivitis-A Cell-Based Study. *Cells* 2024;13:1970.
2. Filipić A, Gutierrez-Aguirre I, Primc G, Mozetič M, Dobnik D. Cold plasma, a new hope in the field of virus inactivation. *Trends Biotechnol* 2020; 38: 1278-91.
3. Dong F, Zhang J, Wang K, Liu Z, Guo J, Zhang J. Cold plasma gas loaded microbubbles as a novel ultrasound contrast agent. *Nanoscale* 2019; 11: 1123-30.
4. Bettencourt JA, ed. *Fundamentals of Plasma Physics*. 3rd ed. Berlin: Springer; 2004.
5. Aleinik A, Baikov A, Dambaev G, Semichev E, Bushlanov P. Liver hemostasis by using cold plasma. *Surg Innov* 2017; 24: 253-58.
6. Bekeschus S, Schmidt A, Bethge L, Masur K, von Woedtke T, Hasse S, et al. Redox stimulation of human THP-1 monocytes in response to cold physical plasma. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5910695.
7. Masur K, von Behr M, Bekeschus S, Weltmann KD, Hackbarth C, Heidecke CD, et al. Synergistic inhibition of tumor cell proliferation by cold plasma and gemcitabine. *Plasma Process Polym* 2015; 12: 1377-82.
8. Wang M, Cheng X, Zhu W, Holmes B, Keidar M, Zhang LG. Design of biomimetic and bioactive cold plasma-modified nanostructured scaffolds for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2014; 20: 1060-71.
9. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8: 15977.
10. Kim SJ, Chung T. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep* 2016; 6: 1-14.
11. Nitsch A, Strakeljahn S, Jacoby JM, Sieb KF, Mustea A, Bekeschus S, et al. New Approach against Chondrosoma Cells—Cold Plasma Treatment Inhibits Cell Motility and Metabolism, and Leads to Apoptosis. *Biomedicines* 2022; 10: 688.
12. Dubey SK, Dabholkar N, Pal UN, Singhvi G, Sharma NK, Puri A, et al. Emerging innovations in cold plasma therapy against cancer: a paradigm shift. *Drug Discov Today* 2022;27:2425-39.
13. Baniya HB, Khadka P, Panday S, Nepal A, Guragain RP, Lamichhane TR, et al. Characterization of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology and Its Anticancer Properties. *Plasma Medicine* 2021; 11: 53-62.
14. Ecaterina Tomaziu-Todosia Anton, Gabriel-Ioan Anton, Ioana-Sadiye Scripcariu, Irina Dumitrașcu, Dragos Viorel Scripcariu, Ioana-Miruna Balmus ,et al, Oxidative Stress, Inflammation, and Antioxidant Strategies in Cervical Cancer—A Narrative Review. *Int J Mol Sci* 2025;26:4961.
15. Mashayekh S, Rajaee H, Akhlaghi M, Shokri B, Hassan ZM. Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). *Physics of Plasmas* 2015; 22: 093508.
16. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2007; 27: 163-76.
17. Sophie Peeters, Peter B Wu, Blake Haist, Amber Armellini, Wi Jin Kim, et al. Cold atmospheric plasma effectively kills chordoma cells through induction of intracellular reactive oxygen species, *SCi Rep* 2025;15:20838.
18. Moghanloo M, Iranbakhsh A, Ebadi M, Nejad Satari T, Oraghi Ardebili Z. Seed priming with cold plasma and supplementation of culture medium with silicon nanoparticle modified growth, physiology, and anatomy in *Astragalus fridae* as an endangered species. *Acta Physiologiae Plantarum* 2019; 41: 1-13.
19. Zhang N, Sun F, Zhu L, Planche MP, Liao H, Dong C, et al. Electron Temperature and Density of the Plasma Measured by Optical Emission Spectroscopy in VLPPS Conditions. *J Therm Spray Tech* 2011;20:1321-27.
20. National Institute of Standards and Technology. NIST: Atomic Spectra Database Lines Form. Available from: https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html.

21. Choi BBR, Choi JH, Hong JW, Song KW, Lee HJ, Kim UK, et al. Selective killing of melanoma cells with non-thermal atmospheric pressure plasma and p-FAK antibody conjugated gold nanoparticles. *Int J Med Sci* 2017; 14: 1101-109.
22. Qin J, Zhang J, Fan G, Wang X, Zhang Y, Wang L, et al. Cold Atmospheric Plasma Activates Selective Photothermal Therapy of Cancer. *Molecules* 2022; 27: 5941.
23. Labay C, Roldán M, Tampieri F, Stancampiano A, Bocanegra PE, Ginebra M-P, et al. Enhanced generation of reactive species by cold plasma in gelatin solutions for selective cancer cell death. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020; 12: 47256-69.
24. Kaushik NK, Kaushik N, Yoo KC, Uddin N, Kim JS, Lee SJ, et al. Low doses of PEG-coated gold nanoparticles sensitize solid tumors to cold plasma by blocking the PI3K/AKT-driven signaling axis to suppress cellular transformation by inhibiting growth and EMT. *Biomaterials* 2016; 87: 118-30.
25. Park N-S, Yun S-E, Lee H-Y, Lee HJ, Choi J-H, Kim G-C. No-ozone cold plasma can kill oral pathogenic microbes in H₂O₂-dependent and independent manner. *Sci Rep* 2022; 12: 1-15.
26. Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T. Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Arch Biochem Biophys* 2016; 605: 19-25.
27. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax: Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 1996; 56: 1834-41.
28. Tan BL, Norhaizan ME, Huynh K, Heshu SR, Yeap SK, Hazilawati H, et al. Water extract of brewers' rice induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activation of caspase-3 and caspase-8 and downregulates the Wnt/ β -catenin downstream signaling pathway in brewers' rice-treated rats with azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 1-14.
29. Bélanger S, Côté M, Lane D, L'Espérance S, Rancourt C, Piché A. Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 796-806.
30. Sitarek P, Skala E, Toma M, Wielanek M, Szemraj J, Nieborowska-Skorska M, et al. A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of *Leonurus sibiricus* L. *Tumor Biol* 2016; 37: 8753-64.
31. Jalili A, Irani S, Mirfakhraie R. Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study. *Onco Targets Ther* 2016; 5911-17.
32. Shrestha M, Park P-H. p53 signaling is involved in leptin-induced growth of hepatic and breast cancer cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2016; 20: 487-98.
33. Schmidt A, Bekeschus S, Jarick K, Hasse S, von Woedtke T, Wende K. Cold physical plasma modulates p53 and mitogen-activated protein kinase signaling in keratinocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 7017363.
34. Sajedi N, Homayoun M, Mohammadi F, Soleimani M. Myricetin exerts its apoptotic effects on MCF-7 breast cancer cells through evoking the BRCA1-GADD45 pathway. *Asian Pac J Cancer Pre* 2020; 21: 3461-68.
35. Kaushik NK, Kaushik N, Yoo KC, Uddin N, Kim JS, Lee SJ, et al. Data on combination effect of PEG-coated gold nanoparticles and non-thermal plasma inhibit growth of solid tumors. *Data Brief* 2016; 9: 318-23.
36. Xu D, Xu Y, Cui Q, Liu D, Liu Z, Wang X, et al. Cold atmospheric plasma as a potential tool for multiple myeloma treatment. *Oncotarget* 2018; 9: 18002-17.