

بررسی اثر پلاسمای اتمسفریک سرد بر فاکتورهای هماتولوژیک خون در افراد سالم و بیماران مبتلا

به لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)

منیره گلپور¹، علیرضا رفیعی^{2*}، احسان زابلی³، علیرضا محسنی⁴، فرشاد صحبت زاده⁵¹ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران،

178greenbio@gmail.com

² گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، rafiei1710@gmail.com³ گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، paya_1358@yahoo.com⁴ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، mohseni2404@gmail.com⁵ گروه فیزیک اتمی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، f.sohbat@umz.ac.ir

*آدرس رایانامه نویسنده مسئول: rafiei1710@gmail.com

کلید واژه: پلاسمای اتمسفریک سرد، لوسمی لنفوسیتی حاد، فاکتورهای هماتولوژیک

چکیده: هدف از این تحقیق بررسی تأثیر CAP بر روی پارامترهای خونی در بیماران مبتلا به CLL و افراد سالم است. در این مطالعه، خون بیماران مبتلا به CLL و همچنین خون افراد سالم به طور مستقیم و غیر مستقیم (CAM) در شرایط آزمایشگاهی تحت تأثیر قرار گرفتند. سپس شمارش کامل خون، مورفولوژی WBC و RBC، زمان PT و PTT، سمیت سلولی، مقدار NO و MDA، فعالیت همولیز و بیان برخی ژن های مهم مربوط به استرس ROS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درمان مستقیم و غیرمستقیم CAP باعث افزایش سطح NO و MDA در بیماران مبتلا به CLL و بیماران سالم می شود، اما این استرس ROS هیچ تأثیر سوء بر سلولهای تک هسته ای خون محیطی از لحاظ مورفولوژی ندارد و به در شمارش کامل سلولهای خون، WBC و RBC تغییر مشاهده نشد. یکی دیگر از یافته های مرتبط این است که CAP باعث همولیز RBC نمی شود. تفاوت معنی داری بین بیان Presenilin 1، Syntaxin 11 و PF4 بین CAP تحت درمان و گروه کنترل در هر دو گروه بیماران و افراد سالم وجود ندارد. در نتیجه میتوان گفت CAP تأثیر نامطلوبی بر عوامل خون در شرایط آزمایشگاهی ندارد و ممکن است بتواند در آینده به درمان بیماران مبتلا به لوسمی کمک کند.

Investigation of Cold Atmospheric Plasma (CAP) effect on hematological parameter in healthy person and CLL patientMonireh Golpour¹, Alireza Rafiei^{2*}, Ehsan Zaboli³, Alireza Mohseni⁴, Farshad Sohbatazadeh⁵

1. Molecular and Cellular Biology Research Center, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
4. department of the laboratory of Sciences, School of Allied Medical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Mazandaran, Iran.
5. Department of Atomic and Molecular Physics, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract: The purpose of this research is to investigate the effect of CAP on the hematological parameter in CLL Patients and Healthy Individuals Blood. In this study, CLL Patients and Healthy Individuals' blood were treated with direct and indirect CAP in in-vitro conditions. The complete blood count, WBC and RBC morphology, PT, and PTT time, cytotoxicity, NO and MDA value, hemolysis activity, and expression of some important genes related to ROS stress were investigated. Direct and indirect CAP treatment has been shown to increase the plasma NO and MDA levels in both CLL and healthy patients, but this ROS stress has no toxic impact on PBMCs and has not contributed to a change in complete blood count, WBC, and RBC morphology and PT, or PTT time. Another relevant finding is that the cap cant induced RBC hemolysis. There is no significant difference between the expression of Presenilin 1, Syntaxin 11, and PF4 between CAP treated and no

treated blood samples in both groups. As a result, our findings indicate that CAP may not have an adverse impact on blood factors in in-vitro conditions and might be able to assist in the future by directly affecting the blood of leukemia patients.

Keywords: Cold Atmospheric Plasma, Chronic Lymphocytic Leukemia, Hematologic Index

مقدمه

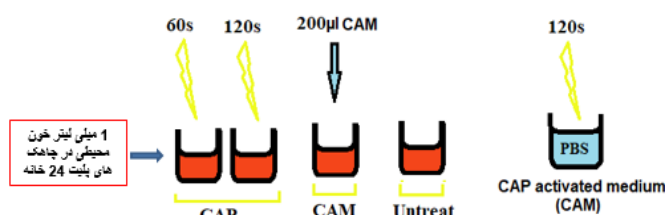
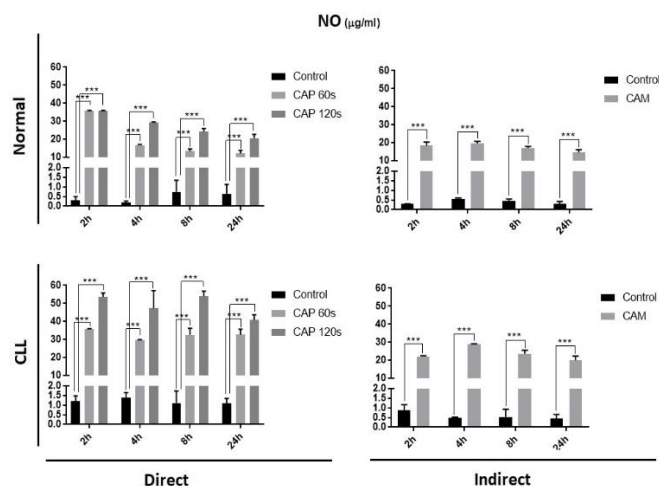
همانطور که از نام CLL مشخص است این بیماری یک لوسمی لنفوسیتی مزمن می باشد [1]. درمان های متداول شیمی درمانی، پرتودرمانی و استفاده از داروی Ibrutinib می باشد که دارای عوارض جانبی و تاثیر گذاری پایین می باشد [2]. با توجه به افزایش بیماران مبتلا به سرطانهای خونی از جمله CLL چنانچه بتوان راهکار جدید، کارآمد، کم هزینه با عوارض جانبی کمتر پیدا کرد که بتواند چندین هدف جزئی را در درمان اینگونه سرطان ها در برگیرد، می توان بعنوان اولویت تحقیقاتی در نظر داشت.

یکی از روشهای مطرح در زمینه درمان سرطان ها بطور خاص solid tumor پلاسمای اتمسفری سرد می باشد [3]. به طور کلی، پلاسمای سرد اتمسفری (CAP) با افزایش میزان ROS یا RNS ها منجر به القاء آپوپتوز، نکروز و پیری در سلول های سرطانی و افزایش حساسیت سلول های سرطانی مقاوم به شیمی درمانی به داروهای خاص شود [4-6]. از مزایای این روش درمانی می توان به تاثیرات مخربی آن بر سلولهای تومور، عوارض جانبی کمتر، تاثیر سریعتر و هزینه پایین تر اشاره کرد [7 و 8]. علیرغم تاثیرات حائز اهمیت این روش درمانی و انجام پژوهش های زیاد در این زمینه تا کنون تحقیقی بر روی تاثیر CAP بر سرطانهای خونی با هدف قرار دادن خون محیطی صورت نگرفته است. نظر به اهمیت و شیوع نسبتا بالا CLL، در این مطالعه برآن شدیم تا به بررسی تاثیر CAP بر روی پارامترهای هماتولوژیک و برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون محیطی در

افراد مبتلا به CLL و همچنین افراد سالم بپردازیم. امید است نتایج این پژوهش بتواند گام ابتدایی و مهمی در استفاده مستقیم از CAP بر روی خون محیطی بیماران مبتلا به سرطانهای خونی از جمله افراد مبتلا به CLL برداشته و راهکار های مناسبی را برای درمان این بیماری بعنوان یک مدل با استفاده از CAP ارائه نماید.

مواد و روش ها

آزمایشات بر روی نمونه خون محیطی گرفته شده از بیماران مبتلا به CLL که توسط پزشک متخصص خون و انکولوژی تشخیص داده شده، در مقابل گروه شاهد که هیچگونه اختلال خونی در آنها مشاهده نشده و از نظر جنس و سن با گروه بیماران یکسان می باشند، انجام شد. خون افراد وارد شده در مطالعه در معرض دوزهای 90، 120، 180 ثانیه تابش CAP مستقیم و همچنین بصورت غیر مستقیم (CAM) به نسبت 1:5 با بافر نمکی فسفات که به مدت 120 ثانیه تحت تابش CAP بوده قرار گرفت. پس از تابش بررسی سیتوتوکسوسیتی به روش MTT، شمارش کامل سلول های خونی (CBC) با استفاده از دستگاه سیسمکس، بررسی مورفولوژی با استفاده از لام گسترش خون محیطی و رنگ آمیزی گیمسا، بررسی PT و PTT، سنجش میزان RNS و NO، سنجش میزان MDA، بررسی لیز گلبولهای قرمز در زمان کوتاه و 24 ساعته و همچنین میزان بیان ژنهای Presenilin 1 و Integrin beta 3 و Syntaxin 11 و PF4 به روش Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.



شکل 1. گروههای تیمار شده با CAP و CAM

بحث

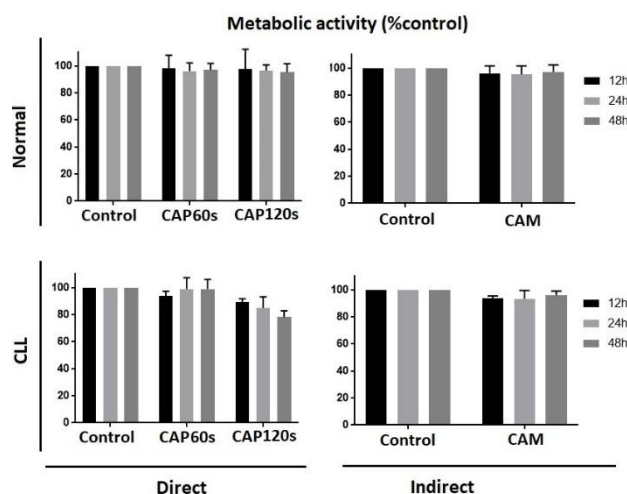
با توجه به اهمیت استفاده از روشهای نوین در درمان سرطانها از جمله لوسمی ها با تاثیر گذاری بالا و همچنین عوارض جانبی کم، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر مستقیم و غیر مستقیم CAP بر روی خون محیطی افراد مبتلا به CLL و افراد سالم انجام شد. با توجه به عدم مشاهده تاثیر سوء تیمار مستقیم و غیر مستقیم CAP بر روی فاکتورهای اساسی هماتولوژیک ممکن است بتوان از CAP بطور مستقیم بر خون بیماران افراد مبتلا به CLL که دارای درصد بالایی از سلولهای سزطانی هستند استفاده نمود و به درمان بیماران مبتلا به لوسمی در آینده کمک نمود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که علاوه بر افزایش میزان ROS یا RNS (شکل 2) در خون محیطی پس از تیمار با CAP، فاکتورهای هماتولوژیک مهم مانند شمارش کامل سلول های خونی (CBC)، مورفولوژی گلوبولهای سفید و قرمز، میزان PT و PTT دچار تغییر نمی گردد.

شکل 2. میزان RNS تولید شده در سرم گروههای تیمار شده با CAP و CAM

نتایج تست MTT نیز نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در فعالیت متابولیکی بین گروههای تیمار شده با CAP و CAM با گروه کنترل است (شکل 3).



شکل 2. درصد فعالیت متابولیک سلولهای خونی تیمار شده با CAP و CAM

همچنین بیان ژنهای در ارتباط با فعالیت سلولهای خونی شامل PF4 و Syntaxin 11 و Integrin beta 3 و Presenilin 1 در هر دو گروه مورد آزمایش دچار تغییر نشده و میزان بیان ژنها

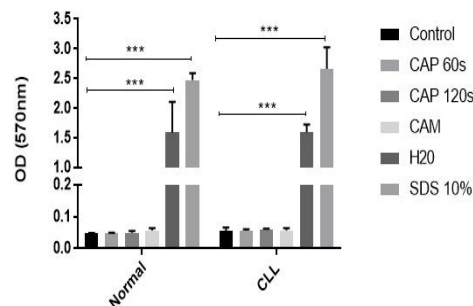
improve chemotherapy in melanoma in vitro and in vivo. *Biomolecules*, 10(7), 1011.

[6] Lee, C. M., Jeong, Y. I., Kook, M. S., & Kim, B. H. (2020). Combinatorial Effect of Cold Atmosphere Plasma (CAP) and the Anticancer Drug Cisplatin on Oral Squamous Cell Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7646.

[7] Semmler, M. L., Bekeschus, S., Schäfer, M., Bernhardt, T., Fischer, T., Witzke, K., ... & Boeckmann, L. (2020). Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (cap) in cancer treatment. *Cancers*, 12(2), 269.

[8] Li, Y., Tang, T., Lee, H. J., & Song, K. (2021). Selective Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium and Its High Efficacy with Cisplatin on Hepatocellular Carcinoma with Cancer Stem Cell Characteristics. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3956.

بدر گروههای تیمار شده و گروه کنترل تفاوت معنادار ندارد. در ضمن تیمار خون کامل با CAP و CAM منجر به لیز گلبولهای قرمز در خون محیطی افراد مبتلا به CLL و افراد سالم نمیگردد (شکل 4).



شکل 4. عدم لیز گلبولهای قرمز در گروههای تیمار شده با CAP و CAM

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران که هزینه های مربوط به انجام طرح را تامین کردند.

مرجع ها

- [1] Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: recent progress and enduring challenges. *Blood reviews*, 36, 70-87.
- [2] Burger, J. A., & O'Brien, S. (2018). Evolution of CLL treatment—from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(8), 510-527.
- [3] Reiaz, R., Akbari, M. E., Norozi, A., & Etedadialiabadi, M. (2017). Application of cold atmospheric plasma (CAP) in cancer therapy: a review. *International Journal of Cancer Management*, 10.
- [4] Bauer, G., & Bekeschus, S. (2020). Biochemistry of Plasma in Cancer Therapy. In *Plasma Cancer Therapy* (pp. 91-142): Springer.
- [5] Alimohammadi, M., Golpur, M., Sohbatazadeh, F., Hadavi, S., Bekeschus, S., Niaki, H. A., ... Rafiei, A. (2020). Cold atmospheric plasma is a potent tool to