

The Effect of Rectangular Electric Pulse Number in Electrochemotherapy by Low Voltage and High Frequency on Breast Tumors in Balb/c Mice

Zeinab Shankayi, M.Sc.¹, Seyed Mohammad Firoozabadi, Ph.D.^{1*}, Zahir Mohammad Hassan, Ph.D.²

1. Department of Medical Physics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14395-587, Department of Medical Physics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email: Pourmir@modares.ac.ir

Received: 3/Feb/2010, Accepted: 8/Aug/2010

Abstract

Objective: The treatment efficiency of electrochemotherapy (ECT) or the use of a chemotherapy agent with a high electric field and low frequency has been reported. Unfortunately this protocol induces an unpleasant sensation to the patient. Therefore, the aim of this study was to investigate the efficiency of combined low electric field and high repetition frequency for the treatment of an animal tumor model, invasive ductal carcinoma.

Materials and Methods: Female Balb/c mice were transplanted with invasive ductal carcinoma. ECT with bleomycin and two different electric pulse simulation protocols were used. In the first protocol, eight high pulses at an amplitude of 1000 V/cm with 100 μ s duration and repetition frequencies of both 5 kHz and 1 Hz were delivered. In the second protocol, low pulse amplitude of 100 V/cm with 5 kHz frequency and different numbers of pulses 500 (1 pulse with 50 milliseconds duration), 2000 (4 pulses with 50 milliseconds duration), 4000 (8 pulses with 50 milliseconds duration) and 5000 (10 pulses with 50 milliseconds duration) at 100 μ s were applied.

Results: ECT with a higher repetition frequency of electric pulses and low voltage inhibits tumor growth and has a comparable effect to the 5 kHz and 1 Hz pulse repetitions at high voltage. Based on the results, the best antitumor effect was obtained at 4000 pulses or higher, with high frequency and low voltage ($p < 0.05$). The rate of inhibition of tumor growth statistically increased with electric pulse numbers higher than 2000.

Conclusion: The finding indicated that ECT with the use of low pulse amplitude and high frequency, combined with the best number of pulses has a comparable effect to a clinical protocol.

Keywords: Electrochemotherapy, Low Electric Field, High Frequency

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 381-384

اثر تعداد پالس‌های الکتریکی مستطیلی با ولتاژ کم و فرکانس بالا، در درمان الکتروشیمیایی تومور پستان موش Balb/c

زینب شنکایی^۱، M.Sc.؛ محمد فیروزآبادی^{۲*}، Ph.D.؛ زهیر محمدحسن^۲، Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی، تهران، ایران

۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۵۸۷-۱۴۳۹۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی

پست الکترونیک: Email: pourmir@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۷

مکیده

* **هدف:** استفاده از شدت میدان‌های پایین و بسامدهای بالا جهت کاهش درد ناشی از الکتروکموترابی با روش‌های رایج کلینیکی

* **مواد و روش‌ها:** درمان به صورت تحریک الکتریکی بر موش ماده Balb/c حامل تومور Invasive Ductal Carcinoma، همراه با تزریق داخل توموری داروی بلومایسین صورت گرفته است. رشد تومور با اعمال دو پروتکل شدت‌های بالا و پایین با محاسبه حجم به‌هنگار شده مورد ارزیابی قرار گرفته است. گروه‌های شدت بالا عبارتند از: الکتروکموترابی با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز و ۱ هرتز با تعداد ۸ پالس و ۴ گروه شدت پایین ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد: ۱. ۵۰۰ پالس (معادل با ۱ پالس با پهنای باند ۵۰ میلی‌ثانیه)، ۲. ۲۰۰۰ پالس (معادل با ۴ پالس با پهنای باند ۵۰ میلی‌ثانیه)، ۳. ۴۰۰۰ پالس (معادل با ۸ پالس با پهنای باند ۵۰ میلی‌ثانیه)، ۴. ۵۰۰۰ پالس (معادل با ۱۰ پالس با پهنای باند ۵۰ میلی‌ثانیه).

* **یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهار رشد تومور در بسامدهای بالا مشابه با بسامد ۱ هرتز است. تعداد ۴۰۰۰ پالس که دارای مدت زمان تحریکی معادل با ۸ پالس ۵۰ میلی‌ثانیه‌ای است، موثرترین تعداد پالس در شدت میدان الکتریکی پایین است و کاهش حجم تومور در پروتکل پیشنهادی تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با دو پروتکل رایج کلینیکی ندارد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که الکتروکموترابی با شدت میدان الکتریکی پایین و بسامد بالا با انتخاب موثرترین تعداد پالس اثری قابل مقایسه با دو پروتکل رایج کلینیکی دارد.

* **کلیدواژگان:** الکتروکموترابی، بسامد بالای تکرار پالس، شدت میدان الکتریکی پایین

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۸۶-۳۸۱

مقدمه

غیرقابل نفوذ مانند بلومایسین به راحتی وارد سلول شده و با هدف قرار دادن DNA سبب شود تا اثر دارویی آن ۱۰۰۰ مرتبه افزایش یابد (۵، ۶). در روش استاندارد الکتروکموترابی، اعمال ۸ پالس با شدت میدان ۱۰۰۰ الی ۱۳۰۰ ولت بر سانتی‌متر، بسامد ۱ هرتز و پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه پیش‌بینی شده است. اما با وجود نتایج خوب و مزایای این روش مانند کاهش دوز داروی مصرفی، محلی بودن این روش، کم کردن جلسات درمان و کاهش اثرات جانبی، الکتروکموترابی مشکلاتی را نیز به همراه دارد. اولین و مهم‌ترین مشکل الکتروکموترابی دردی است که همراه با اعمال پالس به بیمار تحمیل می‌شود. در این روش با اعمال هر پالس یک انقباض عضلانی در ناحیه درمان ایجاد می‌شود که این انقباضات سبب درد و ناراحتی بیماران است. دو عامل ایجاد این درد، بسامد پایین و ولتاژ بالای مورد استفاده در الکتروکموترابی می‌باشد (۶، ۷). جهت رفع این مشکل استفاده از بسامدهایی بالاتر از بسامد انقباض تانیک پیشنهاد شده است و با بررسی بر این بسامدها مشاهده شده است که در میان بسامدهای بالا، بسامد ۵ کیلوهرتز با ایجاد یک انقباض شدید نتایج درمانی مشابه با بسامد ۱ هرتز را نیز به همراه دارد (۸، ۹). در بررسی ولتاژهای پایین نیز مشاهده شده است که شدت میدان‌هایی بیش از ۵۰ ولت بر سانتی‌متر با پهنای باندی در محدوده میلی‌ثانیه اثرات داروی شیمی - درمانی را مانند الکتروکموترابی متداول بهبود می‌بخشد (۱۵-۱۰).

حدود ۲۰ سال است که الکتروپوریشن به عنوان روشی نوین جهت تسهیل انتقال مواد به داخل سلول معرفی شده است (۱). در پدیده الکتروپوریشن با القا پالس‌های الکتریکی پر شدت و پهنای باند کوتاه سعی در افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود. با القا این پالس‌ها تغییر ساختاری غشا، مانند ایجاد سایت‌های نفوذپذیر دراز مدت، کانال‌ها و حفره‌ها مشهود است، این تغییرات سبب افزایش نفوذپذیری شده و اجازه ورود به ماکرومولکول‌ها، داروها و یون‌ها را می‌دهند که جذب این مواد در سلول‌ها در یک بازه زمانی پس از القا میدان رخ می‌دهد. بنابراین می‌توان این گونه بیان کرد که الکتروپوریشن، سایت‌های نفوذپذیری را به صورت محلی القا می‌کند و با باز شدن این سایت‌ها شرایط جهت انتشار مواد فراهم شده و پتانسیل نفوذپذیری افزایش می‌یابد (۲). امروزه این روش در شرایط *in vivo* و کاربرد گسترده از جمله: الکتروکموترابی و الکتروژن درمانی دارد. با توجه به این نکته که در روش شیمی درمانی یکی از مشکلات، عدم ورود داروهای شیمی درمانی به داخل سلول‌های سرطانی می‌باشد این روش با افزایش نفوذپذیری غشا اثر دارو را به طور چشم‌گیری افزایش می‌دهد (۳، ۴). الکتروکموترابی با اعمال ۸ پالس با شدت میدان بالا ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و پهنای باند کوتاه ۱۰۰ میکروثانیه سبب می‌شود تا با ایجاد کانال‌های آبی در غشا سلول، داروهایی

میکروثانیه با تعداد ۵۰۰ (معادل با یک پالس ۵۰ میلی ثانیه)، ۲۰۰۰ (معادل با ۴ پالس ۵۰ میلی ثانیه‌ای)، ۴۰۰۰ (معادل با ۸ پالس ۵۰ میلی ثانیه‌ای) و ۵۰۰۰ پالس (معادل با ۱۰ پالس ۵۰ میلی ثانیه‌ای) با بسامد تکرار ۵ کیلوهرتز، دو دقیقه پس از تزریق بلومایسین به تومور اعمال شده است. در گروه پروتکل استاندارد نیز تحریک الکتریکی به صورت ۸ پالس با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت برسانتی متر و پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه و دو بسامد ۱ هرتز و ۵ کیلوهرتز پس از تزریق داروی بلومایسین به تومور اعمال شده است.

اندازه‌گیری حجم تومور

حجم تومور با اندازه‌گیری دو قطر بزرگ تومور در دو راستای عمود بر هم در طول بازه ۱۵ روز پس از درمان مورد محاسبه قرار گرفته است. اقطار هر سه روز یک بار به وسیله کولیس دیجیتالی با دقت دو صدم میلی‌متر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از رابطه $V = \pi ab^2/6$ (a قطر کوچک و b قطر بزرگ) حجم تومور محاسبه شده است. نتایج به صورت حجم به حجم روز تابش دهی (روز صفر) $(V_n/V_0 \times 100)$ در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ به‌هتجار شده و در ضمن اثر مهار رشد تومور برحسب درصد نسبت به گروه شم در این روزها با استفاده از رابطه $1 - V_x, \text{ day, } x / V_s, \text{ day, } x$ حساب شده است.

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از SPSS16 تحت ویندوز انجام گرفته است. با آزمون کولموگراف-اسمیرنوف دارای توزیع گوسی بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته و نشان داده شد که داده‌ها در گروه‌های آزمایش با دقت $p < 0.05$ همگی نرمال هستند. بنابراین در بررسی آماری بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس ANOVA استفاده کرده‌ایم.

یافته‌ها

در ابتدای این تحقیق در بین چهار گروه شدت میدان پایین الکتریکی ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر مطالعه اثر تعداد پالس، بر کاهش حجم تومور و زمان بازگشت به رشد را بررسی کردیم. داده‌ها در گروه درمانی ۵۰۰ پالس ۵ کیلوهرتز با پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه (معادل با یک پالس ۵۰ میلی ثانیه‌ای) در شدت میدان ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر نشان دادند که این تعداد پالس در روز سوم سبب کاهش حجم تومور می‌شود ولی در روز ششم این تومورها رشد خود را از سر می‌گیرند ولی این رشد در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری دارد و سبب می‌شود تا تومور با سرعت کمتری نسبت به گروه شم، رشد کنند. در سه گروه بعدی که عبارتند از گروه ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ پالس ۵ کیلوهرتز با پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه (معادل با ۴، ۸ و ۱۰ پالس ۵۰ میلی ثانیه‌ای) و شدت میدان ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر تومورها تا روز ۱۲ با کاهش رشد مواجه می‌شوند و از روز ۱۲ رشد خود را سر می‌گیرند (نمودار ۱).

با توجه به نتایج به دست آمده کاهش رشد تومور در ۳ گروه ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ پالس با دقت $p < 0.05$ تفاوت معنی‌داری تا روز دوازدهم ندارند، ولی این تفاوت خود را در روزهای ۱۲ و ۱۵ نشان می‌دهد که در طی این دوره ۶ روزه رشد تومور به طور معنی‌داری در گروه درمانی ۲۰۰۰ پالس بیشتر از دو گروه درمانی ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ پالس است. این در حالی است که دو گروه ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ پالس تفاوت معنی‌داری در روزهای آغاز به رشد و سرعت رشد ندارند.

با توجه به نتایج به دست آمده در بسامدهای بالا و شدت میدان‌های پایین به طور جداگانه، در تحقیق حاضر جهت رفع مشکل بسامد انقباض و شدت میدان‌های بالا با انتخاب شدت میدان ۱۰۰ ولت برسانتی (به عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها در شدت میدان‌های پایین) و بسامد ۵ کیلوهرتز توانایی کاهش حجم تومور را در ترکیب پارامترهای جدید تخمین زده و در ضمن با توجه به عدم انجام مطالعات تعداد پالس مورد نیاز جهت ایجاد موثرترین اثر را نیز برآورد کردیم.

مواد و روش‌ها

این طرح مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد.

موش

در این آزمایش از موش‌های اصیل خریداری شده از انستیتو پاستور استفاده کرده‌ایم. این حیوانات همگی ماده با میانگین سن ۶ الی ۸ هفته‌ای بوده و پس از خرید موش‌ها در محیطی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و با نور کافی به مدت ۷ روز قبل از القا تومور جهت کاهش استرس و تطبیق با محیط نگهداری شدند.

تومور و گروه‌های آزمایش

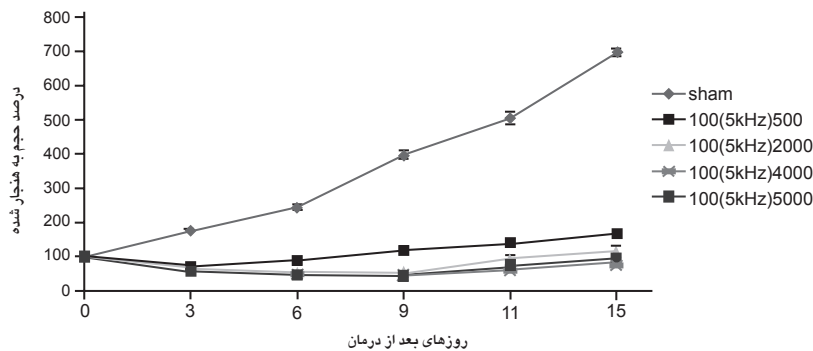
تومور مورد استفاده تومور Invasive Ductal Carcinoma است که این تومور از انستیتو پاستور تهران تهیه و سپس با استفاده از جراحی در پهلوی حیوان پیوند زده شد. حدود ۲ هفته پس از القا تومور، ابعاد تومور در موش‌های جراحی شده به ۱ سانتی‌متر رسید سپس این موش‌ها به طور تصادفی در بین گروه‌ها تقسیم شدند که در تمام گروه‌ها ابعاد تومور ۱۰ موش تا روز ۱۵ پس از درمان اندازه‌گیری شد. گروه‌های آزمایش عبارت از ۶ گروه درمان بودند: ۱. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۵۰۰ پالس و بسامد ۵، ۲ کیلوهرتز. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۲۰۰۰ پالس و بسامد ۵، ۳ کیلوهرتز. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۴۰۰۰ پالس و بسامد ۵، ۴ کیلوهرتز. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۵۰۰۰ پالس و بسامد ۵، ۵ کیلوهرتز. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۸ پالس و بسامد ۵، ۶ کیلوهرتز. گروه الکتروکموترایی با شدت پایین ۱۰۰۰ ولت برسانتی‌متر با تعداد ۸ پالس و بسامد ۱ هرتز و یک گروه کاذب تجربی (شم).

داروی شیمی‌درمانی

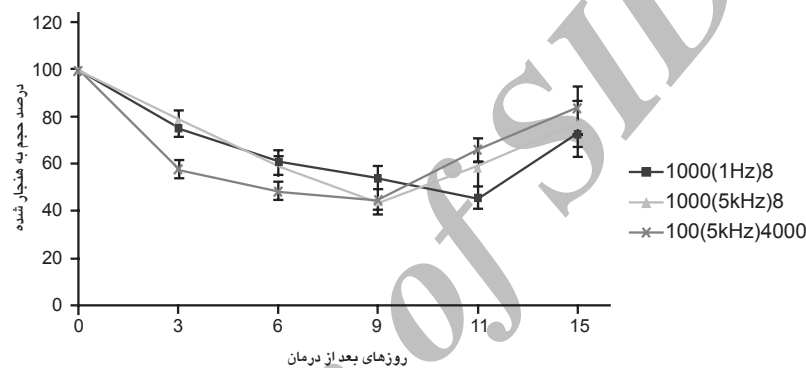
داروی شیمی‌درمانی مورد استفاده، داروی بلومایسین (Nippon Kayaku Co.Ltd., Tokyo, Japan) می‌باشد که از داروخانه ۱۳ آبان تهران تهیه و پس از حل داروی بلومایسین با سالین (۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مقدار ۰/۰۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دارو به صورت داخل توموری به حیوان تحت درمان تزریق شد. دو دقیقه پس از تزریق دارو پالس‌های الکتریکی در محدوده تومور اعمال شد.

پالس الکتریکی

ژنراتور تولید پالس‌های الکتریکی سیستم EC-SBDC ساخت ایران بوده و با استفاده الکترودهای صفحه‌ای از جنس استیل زنگ‌نزن پالس‌هایی با شدت میدان ۱۰۰ ولت برسانتی‌متر و پهنای باند ۱۰۰

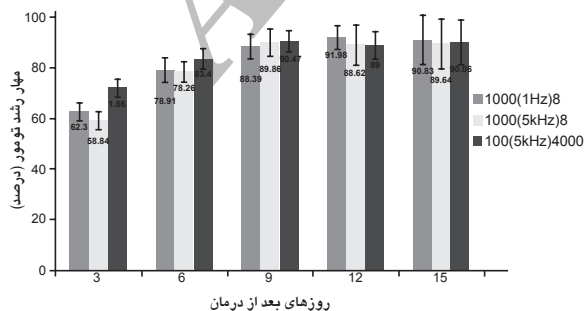


نمودار ۱: حجم به‌هنگار شده برحسب درصد نسبت به روز درمان در چهار گروه: شام، شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۵۰۰ و ۴۰۰۰ پالس. داده به صورت $Mean \pm SE$ نمایش داده شده است.



نمودار ۲: حجم به‌هنگار شده برحسب درصد نسبت به روز درمان در سه گروه: شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد ۴۰۰۰ پالس، شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد ۸ پالس، شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۱ هرتز با تعداد ۸ پالس. داده به صورت $Mean \pm SE$ نمایش داده شده است.

این اختلاف نشان دهنده کاهش سریع تر حجم تومور در روز سوم پس از درمان در گروه پروتکل جدید (۴۰۰۰ پالس با شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز) نسبت به دو گروه دیگر است. اثر مهار رشد تومور در بین سه گروه الکتروکموترابی برحسب درصد نسبت به گروه شام نیز در روز سوم رشد بیشتری را در گروه الکتروکموترابی با شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر نسبت به دو گروه دیگر از خود نشان داده است (نمودار ۳).



نمودار ۳: مهار رشد تومور برحسب درصد نسبت گروه شام در سه گروه: شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد ۴۰۰۰ پالس، شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با تعداد ۸ پالس، شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۱ هرتز با تعداد ۸ پالس. داده به صورت $Mean \pm SE$ نمایش داده شده است.

در مرحله بعد تحقیق با انتخاب تعداد ۴۰۰۰ پالس به عنوان موثرترین تعداد پالس بر کاهش حجم تومور در شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز، این پروتکل جدید را با دو پروتکل رایج الکتروکموترابی (۸ پالس با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر، پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه و بسامد ۱ هرتز و ۵ کیلوهرتز) مورد مقایسه قرار دادیم. نتایج در نمودار ۲ نمایش داده شده است. داده‌های به دست آمده در این بخش از تحقیق نشان دادند که شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر همانند شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز سبب می‌شود تا تومورها در روزهای ۹ الی ۱۲ شروع به رشد بکنند ولی در گروه الکتروکموترابی با بسامد ۱ هرتز و شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر تومورها در روزهای ۱۲ الی ۱۵ شروع به رشد کرده‌اند. با دقت $p < 0.05$ در میان دو گروه الکتروکموترابی با شدت ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر در تمام ۱۵ روز پس از درمان تفاوت معنی داری وجود ندارد. اما رشد تومور در گروه الکتروکموترابی با تعداد ۴۰۰۰ پالس، ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز در روزهای ۳ و ۱۲ تفاوت معنی داری با گروه پروتکل رایج کلنیک (پالس‌هایی با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۱ هرتز) دارد. این اختلاف معنی دار در روز سوم پس از درمان در گروه الکتروکموترابی با شدت ۱۰۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز با گروه درمان با شدت ۱۰۰ ولت بر سانتی‌متر و بسامد ۵ کیلوهرتز هم وجود دارد.

بحث

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر الکتروکموترابی با شدت میدان پایین ۱۰۰ ولت بر سانتی متر و بسامد ۵ کیلوهرتز بر کاهش حجم تومور است که این پارامترها بر مبنای مطالعات صورت گرفته است و می تواند مشکلات اساسی الکتروکموترابی با شدت ۱۰۰۰ ولت بر سانتی متر و بسامد ۱ هرتز را بهبود بخشد (۸-۱۵).

الکتروکموترابی، به دلیل تمرکز موضعی زیاد داروی شیمی درمانی در تومور باعث اثر بیشتر دارو می شود و در ضمن این روشی ساده و ارزان است و امکان درمان را تنها با داشتن سیستم مولد و الکترودها امکان پذیر می کند. از آنجایی که تزریق دوز کم داروی شیمی درمانی تنها در ناحیه مورد درمان انجام می شود، عوارض جانبی را نیز کاهش می دهد. اهمیت دیگر و مزیت برتر الکتروکموترابی نسبت روش های متداول درمان، کاهش متاستاز در تومورهای بدخیمی است که پس از درمان، سبب عود تومور در نواحی دیگر می شود. این مزیت الکتروکموترابی دارای پشتوانه علمی مطالعه شده ای نمی باشد ولی در مطالعات حیوانی و انسانی این عدم تحرک و کاهش متاستاز به طور کامل قابل مشاهده بوده و در روش ترکیبی الکتروکموترابی و ایمنوترابی، کامل خود را نشان داده است (۱۶).

الکتروپوریشن همراه با مزایا معایبی را نیز به همراه دارد. این تکنیک، یک درمان موضعی است که تنها برای تومورهای جامد و سطحی مورد استفاده قرار می گیرد. عیب دیگر این روش، عدم درمان تومورهای عمقی و بزرگ، به چند جلسه درمان نیاز دارند تا تمام سطح تومور پوشانده شود و لایه های عمیق آن از بین برود. اعمال پالس به صورت موضعی ایجاد درد می کند. این حس ناخوشایند مربوط به انقباضات عضلانی ایجاد شده توسط پالس های الکتریکی است که شدت آن از مریضی به مریض دیگر تغییر می کند و به مکان محل مورد درمان بستگی دارد. در ضمن در تمام حالات، این احساس ناخوشایند به محض قطع میدان الکتریکی متوقف می شود. واکنش های دیگر در محل مورد درمان، شامل ورم جزئی و سرخی غیر عادی پوست می شود (۱۰).

عامل اصلی تولید انقباضات و در پی آن درد در ناحیه درمان، استفاده از شدت میدان بیش از ۱۰۰۰ ولت بر سانتی متر به همراه بسامد پایین ۱ هرتز است. به همین منظور در مطالعات جدید سعی شده تا با استفاده از شدت میدان های پایین و بسامدهای بالا بتوانند این مشکل را برطرف کنند. مزیت دیگر استفاده از شدت میدان های پایین، کاهش تورم و سوختگی در نزدیکی الکترودهاست. در مطالعات انجام شده بر شدت میدان های پایین نشان داده شده است که شدت میدان هایی در بازه ۵۰ الی ۱۵۰ ولت بر سانتی متر به ازای افزایش پهنای باند از ۱۰۰ میکروثانیه به بازه ۵۰ الی ۱۰۰ میلی ثانیه، توانایی درمان تومورهای سطحی را دارا می باشند. در میان این شدت میدان ها، شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی متر بیشترین اثر را بر کاهش حجم تومورها داشته است (۱۵-۱۰). در گروه دیگری از تحقیقات به بررسی اثر بسامد بر الکتروکموترابی پرداخته شده است. در پروتکل کلینیکی رایج، از بسامد ۱ هرتز به عنوان بسامد تکرار پالس استفاده می شود. اعمال ۸ پالس ۱ هرتری سبب می شود تا ۸ مرتبه عضلات ناحیه درمان دچار انقباض شوند. این انقباضات سبب می شود تا بیماران به طور نامطلوبی احساس درد داشته باشند. به همین منظور در تحقیقات سال های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ فرض بر این شد که در ازای ایجاد یک انقباض شدید به جای ۸ انقباض، تحمل درد برای بیماران نیز راحت تر خواهد شد. در سال

۲۰۰۲ پوکیهار و همکاران نشان دادند، در بازه بسامدی بین ۱ تا ۳/۸ کیلوهرتز مقدار نفوذپذیری سلول ها به ازای اعمال پالس الکتریکی، مشابه است (۹) و این در حالی است که در بسامدهای بالاتر از ۵۰ هرتز تعداد انقباضات ناشی از اعمال پالس های الکتریکی به یک انقباض تتانیک کاهش می یابد (۸). در ادامه این تحقیقات در بین بسامدهای مختلف این بسامد ۵ کیلوهرتز بود که نتایج درمانی مشابه با بسامد ۱ هرتز را در تومور موش ها به همراه داشت (۸). به همین دلیل این بسامد با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی متر بر روی تومور یک بیمار نیز مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه حاکی از یکسان بودن قابلیت درمان در این دو بسامد و قابل تحمل تر بودن درد ناشی از درمان بود (۱۷). بنابراین در این تحقیق دو پارامتر شدت میدان پایین ۱۰۰ ولت بر سانتی متر و بسامد ۵ کیلوهرتز را به طور هم زمان مورد استفاده قرار دادیم. با توجه به عدم استفاده این پروتکل در ابتدا موثرترین تعداد پالس مورد نیاز جهت افزایش معنی دار درمان را تخمین زدیم و در ادامه به مقایسه این پروتکل با پروتکل رایج کلینیکی پرداختیم.

در سال ۱۹۹۱ طی مطالعات نشان داده شده است که الکتروکموترابی به ازای ۴ الی ۸ پالس نتایج بهتری را نسبت به پالس تنها به همراه دارد و افزایش پالس به بیش از ۸ پالس تاثیر معنی داری بر روی درمان ندارد (۱۸). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز نشان دادند که ۵۰۰ پالس ۱۰۰ میکروثانیه ای که در مجموع تولید ۵۰ میلی ثانیه تحریک الکتریکی می کند سبب کاهش رشد تومور می شود و رشد مجدد تومور نیز به سرعت در روز ششم آغاز می شود. اما ۲۰۰۰ پالس (در مجموع معادل با اعمال ۴ پالس ۵۰ میلی ثانیه ای) و ۴۰۰۰ پالس (در مجموع معادل با ۸ پالس ۵۰ میلی ثانیه ای) نتایج بسیار بهتری نسبت به ۵۰۰ پالس به همراه داشتند. این در حالی بود که افزایش پالس به ۵۰۰۰ (در مجموع معادل با ۱۰ پالس ۵۰ میلی ثانیه ای) تفاوت معنی داری نسبت به ۴۰۰۰ پالس را به همراه نداشت.

در سال ۲۰۰۲ در شرایط *in vitro* اثر زمان خاموشی بر الکتروپوریشن مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). در این مطالعه - که زمان های خاموشی متفاوت بررسی شده بود - نشان داده شد در روش الکتروکموترابی معمول که از پالس هایی با پهنای باند ۱۰۰ میکروثانیه استفاده می شود، در اثر اعمال هر پالس به دلیل وقفه طولانی بین دو تحریک الکتریکی، پالس دوم زمانی اعمال می شود که اثر پالس اول از بین رفته باشد تاثیر بر هدایت سلول در پالس دوم مانند اثر پالس اول است. اما در صورتی که این فاصله بین دو پهنای باند را به کمتر از ۱ میلی ثانیه برسانیم، پالس دوم زمانی اعمال می شود که اثر پالس اول همچنان باقی است و یک افزایش بسیار سریع در هدایت سلولی رخ می دهد؛ یعنی اثر دو پالس بر هم هم پوشانی دارند. بنابراین در این تحقیق لبار و همکارانش نشان دادند که برای اعمال الکتروپوریشن حتی از نوع برگشت ناپذیر به شدت میدان های پایین تری نیاز است (۱۹). نکته دیگر در الکتروپوریشن رساندن ولتاژ غشا سلولی به حد آستانه می باشد که علاوه بر مشخصه های سلولی انتخاب دقیق در شدت میدان الکتریکی را می طلبد تا در ضمن توانایی در ایجاد شکست سبب مرگ و الکتروپوریشن بازگشت ناپذیر نگردد (۲۰). نتایج این تحقیق در شرایط *in vivo* نشان داد که پالس هایی با شدت میدان الکتریکی پایین تر این توانایی را دارند که کانال ایجاد کرده و اثر شیمی درمانی را ارتقا دهند. در این محدوده، پالس ها نتایج مشابه به شدت میدان های بالا را به همراه داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مبنی بر توانایی کاهش حجم تومور در شدت میدان ۱۰۰ ولت بر سانتی متر

تحقیق نشان داده شد که شدت میدان پایین ۱۰۰ ولت بر سانتی متر با تعداد ۴۰۰۰ پالس و بسامد ۵ کیلوهرتز توانایی کاهش حجم تومور قابل مقایسه با شدت میدان ۱۰۰۰ ولت در بسامدهای ۱ هرتز و ۵ کیلوهرتز، دارد.

تقدیر و تشکر

با توجه به اجرای تحقیق فوق در دانشگاه تربیت مدرس لازم می‌دانیم از این دانشگاه به دلیل حمایت‌های مالی اش تشکر و قدردانی نماییم.

نیاز به مطالعه دیگر پارامترها از جمله شدت میدان الکتریکی جهت بهینه‌سازی این روش ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

تغییر بسامد الکتروکموترایی از ۱ هرتز به ۵ کیلوهرتز در شدت میدان ۱۰۰۰ ولت بر سانتی متر با کاهش انقباضات عضلانی به ۱ انقباض تتانیک اثر مشابه درمان با پروتکل رایج کلینیکی دارد. در ضمن در این

References

- Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29: 371-387.
- Neumann E, Kakorin S, Toensing K. Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules. *Method in molecular medicine.* 2000; 37:1-35.
- Davalos R, Huang Y, Rubinsky B. Electroporation: Bio-electrochemical mass transfer at the nano scale. *Microscale Thermophysical Engineering.* 2000; 4: 147-159.
- Heller R, Gilbert R, Jaroszeski MJ. Clinical trail for solid tumors using electrochemotherapy. *Methods in molecular medicine.* 2000; 137-156.
- Mir LM, Orlowski S. The basis of electrochemotherapy. *Methods in molecular medicine.* 2000; 37: 99-117.
- Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2008; 34 :232-240.
- Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer.* 2006; S4:14 -25.
- Miklavcic D, Pucihar G, Pavlovic M, Ribaric S, Mali M, Macek-Lebar A, et al. The effect of high frequency electric pulses on muscle contraction and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry.* 2005; 65(2): 121-128.
- Pucihar G, Mir LM, Miklavcic D. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry.* 2002; 57(2): 167-172.
- Horiuchi A, Nikaido T, Mitsushita J, Toki T, Konishi I, Fujii S. Enhancement of antitumor effect of bleomycin by low voltage in vivo electroporation: a study of human uterine leiomyosarcomas in nude mice. *Int J Cancer* 2000; 88: 640-644.
- Miyazaki S, Gunji Y, Matsubara H, Shimada H, Uesato M, Suzuki T, et al. Possible involvement of anti-tumor immunity in the eradication of Colon 26 induced by low-voltage electrochemotherapy with bleomycin. *Surg Today.* 2003; 33: 39-44.
- Kitamura A. Bleomycin-mediated electrochemotherapy in mouse NR-S1 carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003; 51: 359-362.
- Plotnikov A, Fishman D, Tichler T, Korenstein R, Keisari Y. Low electric field enhanced chemotherapy can cure mice with CT-26 colon carcinoma and induce anti-tumour immunity. *Clin Exp Immunol* 2004;138:410-416.
- Matsuki N, Ishikawa T, Imai Y, Yamaguchi T. Low voltage pulses can induce apoptosis. *Cancer Lett.* 2008; 269: 93-100.
- Entin I, Plotnikov A, Korenstein R, Keisari Y. Tumor growth retardation, cure, and induction of antitumor immunity in B16 melanoma-bearing mice by low electric field-enhanced chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2003;9: 3190-3197.
- Sersa G. Electrochemotherapy (animal model work review). *Method in molecular medicine.* 2000; 37: 119-136.
- Snoj M, Cemazar M, Slekovec Kolar B, Sersa G. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy. *Croat Med J.* 2007; 48: 391-395.
- Mir LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999; 35: 107-118.
- Lebar AM, Troiano GC, Tung L, Miklavcic D. Inter-pulse interval between rectangular voltage pulses affects electroporation threshold of artificial lipid bilayers. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2002; 1(3): 116-120.
- Towhidi L, Poormir Firoozabadi SM, Mozdarani H, Kotnik T, Pucihar G, Miklovic D. Effect of cell size and shape on electric field threshold and critical transmembrane voltage for electroporation. *Iranian Journal of Medical Physics.* 2008-2009; 5(2): 1-14.