

درمان تومور کارسینومای کولون موش Balb/c به روش الکترولیز: اثر دز الکتریکی و پلاریته

آمنه سازگارنیا^{۱*}، سیدمحمدحسین بحرینی طوسی^۲، مهدی شیرین شانديز^۳، شهرام بیانی رودی^۴، علیرضا خوبی^۵،
حبيب ا... اسماعیلی^۶، فاطمه همایی^۷

- ۱- استادیار فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۲- استادیار فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۳- مربی کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
- ۴- کارشناس ارشد مهندسی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۵- دانشیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۶- استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۷- استادیار گروه انکولوژی پرتوی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۷/۷/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۲۸

چکیده

مقدمه: یکی از روشهای فیزیکی موثر در درمان سرطانهای موضعی، الکتروشیمی درمانی است. در این روش از آثار جریانهای الکتریکی مستقیم به منظور ایجاد تغییرات شیمیایی و نابودی تومور بهره برداری می شود. مطالعه حاضر، به بررسی تاثیر دز الکتریکی و پلاریته جریان بر بازده الکترولیز روی یک مدل توموری کولون پرداخته است.

مواد و روشها: ابتدا با تزریق زیرجلدی 5×10^5 سلول CT26 در پهلوی راست موشهای Balb/c، در ۱۰۰ حیوان تومور کارسینومای کولون القا گردید. زمانی که حجم تومور به (50 ± 350) میلیمترمکعب می رسید، حیوانات به طور تصادفی در ۱۰ گروه تقسیم و با آرایش ۶ الکترودی در پایه و بالای تومور به جز در گروه شاهد اصلی، با دزهای (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، و ۴۰) کولن بر سانتیمترمکعب تحت درمان قرار گرفتند. علاوه بر بررسی های آسیب شناسی، اندازه گیری روزانه ابعاد تومورها و مرگ و میر حیوانات ثبت گردید.

نتایج: پس از الکترولیزدرمانی، در تمامی گروهها تاخیر و کنترل رشد تومور، گاهی نابودی کامل تومور و افزایش کسر بقا ثبت شده است. در گروه کنترل حیوانات بیش از ۵۰ روز زنده نماندند و تومورها تخریب نشد. در دز ۴۰ کولن بر سانتیمترمکعب با پلاریته آند در پایه تومور ۸۰ درصد تومورها به درمان پاسخ کامل داده و کسر بقای تجمعی تا ۱۲۰ روز پس از درمان ۸۰٪ تعیین شد. افزایش دز الکتریکی به طور معنی دار روی درصد پاسخ کامل و بقای تجمعی تاثیر گذاشت. هر چند در پلاریته آند در پایه تومور نتایج بهتری به دست آمد، اما معنی دار نبود.

بحث و نتیجه گیری: پاسخ کامل به میزان ۱۰ تا ۸۰ درصد در گروههای درمانی، نشانگر اثرات ضد توموری و پتانسیل بالای الکترولیز در نابودی تومورهای سرطانی می باشد. همچنین مشاهده تنها یک مورد مرگ و صحت و سلامت کامل حیوانات تا ۱۲۰ روز پس از درمان، بیانگر ایمنی این روش است. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۵، شماره ۲، پیاپی (۲۰۲۱)، پاییز و زمستان ۸۷: ۵۱-۳۹)

واژگان کلیدی: الکترولیز، دز الکتریکی، پلاریته، آرایش الکترودها، کارسینومای کولون موش Balb/c، رده سلولی CT26

* نویسنده مسؤول: آمنه سازگارنیا

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد،
sazgarnia@mums.ac.ir

تلفن: ۰۲۳۲۴ ۸۰ (۵۱۱) ۹۸+

۱- مقدمه

در حال حاضر روش های رایج درمان و کنترل سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی می باشند که به صورت جداگانه یا ترکیبی مورد استفاده قرار می گیرند. با این حال سرطان هایی وجود دارند که به روش های معمول قابل درمان نبوده و نیازمند بکارگیری درمانهای مکمل می باشند [۲۰]. کارسینومای سلولهای کبدی^۱ و متاستاز کبدی کولورکتال در زمره این بیماریها به شمار میروند. جراحی تنها روش درمانی موثر برای درمان این سرطانها به شمار می رود. اما متأسفانه عواملی از جمله تومورهای متعدد، نزدیکی و تهاجم سلولهای سرطانی به عروق اصلی، بزرگی تومور و ضعف مفرط بیمار، باعث می شود که تنها ۲۰ درصد بیماران برای جراحی مناسب باشند [۴،۳،۱]. یکی از روشهایی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته، الکتروشیمی درمانی^۲ یا الکترولیز درمانی می باشد که علاوه بر سادگی، ارزانی و عوارض جانبی ناچیز، ایمن و دارای حداقل پاسخ التهابی سیستمیک^۳ می باشد [۶،۵،۱]. همچنین جهت نابودی کامل سلولهای سرطانی اطراف عروق اصلی، بدون آسیب جدی به عروق، قابل استفاده است [۷،۱]. این روش در درمان تومورهای غیر قابل جراحی و همچنین تومورهای سطحی و احشایی اولیه و متاستاتیک به کار گرفته شده و نتایج امیدوارکننده ای از آن گزارش گردیده است [۸]. در ۱۹۸۹ الکترولیزدرمانی در چین تأیید شد و در مدت یک دهه، ۱۵،۰۰۰ بیمار که دارای انواع تومورهای بدخیم و خوش خیم سطحی و احشایی بودند، تحت درمان قرار گرفتند [۱۰،۹]. علیرغم نتایج دلگرم کننده موجود، این روش هنوز در غرب مجوز بالینی دریافت نکرده است، زیرا کماکان در ارتباط با مکانیزم نابودی تومور، و شرایط بهینه عوامل

مداخله گر نظیر پارامترهای الکتریکی (جریان، دز الکتریکی، چگالی جریان و...) و آرایش و پلاریته الکترودها ابهاماتی وجود دارد [۱۱،۱۲]. در این تکنیک در اثر پتانسیل و میدان الکتریکی اعمالی، تومور پلاریزه و به دنبال آن دستخوش تجزیه الکتروشیمیایی می گردد و تومور در اثر تغییرات شدید pH، میدان الکتریکی و مواد سمی تولیدی و عوامل محتمل دیگر از جمله تحریک سیستم ایمنی دچار نکروز و از هم پاشیدگی می شود [۱۱،۱۳-۱۵].

در این مطالعه ضمن بررسی الکترولیز تومور، اثر دز الکتریکی و پلاریته جریان در بروز نکروز در آرایش ۶ الکترودها افقی در پایه و بالای تومور مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روشها

ایجاد مدل توموری: مدل توموری در موش های Balb/c (۸-۶ هفته ای با وزن ۲۰-۲۸ گرم) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد، القاء گردید شکل (۱). موش ها تحت تغذیه استاندارد و شرایط دما، رطوبت و نور یکنواخت با تناوب ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی قرارداشتند. رده سلولی CT26 مشتق شده از تومور کارسینومای کولون موش Balb/c نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه و درون فلاسک های استریل در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS و آنتی بیوتیک های استروپتومایسین و پنی سیلین، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد دارای ۵٪ دی اکسید کربن مورد کشت و تکثیر قرار گرفت. بعد از دو تا سه روز سلول ها به صورت تک لایه کف فلاسک را می پوشانند. بعد از جدا کردن سلول ها از کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA، سلول ها شمارش شده و درصد سلول های زنده به روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین گردید. سپس به صورت زیر جلدی در پهلوی راست هر موش، تعداد 5×10^5 سلول زنده در حجم $100 \mu l$ محلول هنکس تزریق شد. از روزی که حجم تومور به حدود

۱- هپاتوسلولار

۲ ECHT

۳ SIRS

روشها و گروههای درمانی: درمان تومورها زمانی که حجم آنها به $3 \text{ mm}^3 (350 \pm 50)$ می رسد، پس از آماده سازی حیوان انجام می پذیرفت. این مرحله شامل کنترل وزن حیوان، حذف موهای تومور و اطراف آن، اندازه گیری ابعاد تومور و محاسبه زمان و دز اعمالی با توجه به حجم تومور و دز مینا، تزریق داخل صفاقی داروی بیهوشی و قراردادن الکترودها در تومور بود. زمان درمان با استفاده از قانون آمپر محاسبه می گردید

بر اساس یک مطالعه اولیه روی ۳۰ حیوان مشاهده شد در بین دو آرایه قرارگیری الکترودها به طور عمود بر بدن و قرارگیری الکترودها به طور افقی و موازات سطح بدن، آرایش دوم و جریان ۵ میلی آمپر ایمن تر پیش بینی شد. در حرایتهای بالاتر، احساس ناراحتی و درد، جریانات نشتی قابل توجه (از جمله لمس جریان در لاله گوش حیوان در جریان ۱۵ میلی آمپر)، فلج موقتی و گاهی مرگ که احتمالاً ناشی از نفوذ جریانات نشتی به قلب حیوان بوده، مشاهده گردید. دز الکتریکی ایمن و بی خطر، به وزن حیوان و شرایط قرارگیری الکترودها بستگی دارد و عملاً در حیوانات بیش از ۲۵ گرم حداکثر دز قابل تحمل در حدود ۰/۵۵ کولن بر گرم بود که با کاهش وزن حیوان، خصوصاً در حیوانات کمتر از ۲۰ گرم به کمتر از ۰/۵ کولن بر گرم می رسد. در صورت اعمال دزهای بالاتر، علائم سندرمی شبیه تومورلیز با شواهد ظاهری کاهش شدید دمای بدن، ضعف، بی تحرکی به دلیل عدم تعادل الکترولیتهای خون [۱۸] و معمولاً مرگ حیوان، مشاهده می گردید.

بدین ترتیب آرایه الکترودها در تومور به صورت افقی و موازی با سطح بدن موش انتخاب و در دو ردیف ۶ الکترودی در پایه و بالای تومور تعبیه گردید. الکترودهای موجود در پایه و بالای تومور به طور جداگانه به یک کانال خروجی منبع جریان متصل شد. جهت بررسی اثر دز و پلارینه جریان، ۸۰ حیوان در ۸ گروه (هر گروه ۱۰ موش) مطابق جدول (۱) تحت درمان قرار گرفتند. ۲۰ حیوان نیز در گروههای ۱ (بدون

$20 \pm 10 \text{ mm}^3$ رسید، روزانه ابعاد آنها (قطر کوچک (a)، قطر بزرگ (b) و ضخامت تومورها (c)) با استفاده از کولیس ورنیه دیجیتال اندازه گیری و با استفاده از رابطه $V = \pi/6 (a.b.c)$ ، حجم تومورها (V) محاسبه گشت [۱۱]. قبل از قرار دادن الکترودها در تومور و اعمال جریان، حیوان با تزریق داخل صفاقی 10 mg/kg زایلازین (ساخت شرکت دارویی بهیار سامان؛ Xylazine 2%) و 50 mg/kg کتامین (Ketamine 150mg/ml; Rotex medica GmbH) بیهوش می شد [۱۶]. جهت جلوگیری از خشکی چشم حیوان در حین بیهوشی از قطره استریل چشمی استفاده گردید [۱۷].

سامانه الکترولیز با جریان ثابت: برای اعمال دز الکتریکی مورد نظر از یک سامانه الکترولیز با جریان ثابت که در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد طراحی و ساخته شده است، بهره برداری گردید. این منبع جریان قابلیت اعمال جریان الکتریکی ثابت با دقت ۰/۱ میلی آمپر را در مقاومت اهمی متغیر بافت حین درمان دارامی باشد شکل (۲). سیستم دارای چهار کانال خروجی مجزا با نمایشگر ولتاژ (V)، جریان (mA)، زمان (S) و بار الکتریکی (C) جداگانه می باشد. به منظور افزایش ضریب ایمنی و جلوگیری از خطرات احتمالی ناشی از افزایش شدت جریان الکتریکی، این سامانه از محدود کننده جریان و ولتاژ قابل تنظیم برخوردار بوده و در آن یک هشدار دهنده مربوط به اتمام درمان، و خروج ولتاژ و جریان از محدوده تنظیم شده برای بیمار و نیز اتصال کوتاه شدن مدار حین درمان تعبیه شده است. جریان خروجی سامانه در محدوده ۱/۵ تا ۱۵ میلی آمپر بسته به شرایط درمان قابل تنظیم است.

الکترودها: الکترودها از سیم های پلاتینی (MERK) با درجه خلوص بسیار بالا (۹۹/۹٪) به قطر ۰/۷ و طول ۲۰ میلیمتر ساخته شد. جهت ورود راحت تر الکترودها به تومور نوک آنها تیز و قبل از هر جلسه درمان استریل می گردید [۱۷].

حیوان پس از درمان، قرنطینه و جهت جلوگیری از تومور خواری توسط دیگر حیوانات موش به مدت سه هفته مجزا نگهداری می شد [۱۷]. حیوانات تا ۱۲۰ روز بعد از درمان، تحت نظر بودند و در این مدت اندازه گیری روزانه حجم در تومورهای عود کرده انجام می گرفت.

قرارگیری الکتروود در تومور (و ۲ (قرارگیری الکتروودها در تومور به مدت ۴۵ دقیقه در جریان صفر میلی آمپر) به ترتیب به عنوان شاهد و شاهد اصلی در نظر گرفته شد. جریان اعمالی ۵ میلی آمپر بود و به منظور جلوگیری از ایجاد شوک در موش، در آغاز و خاتمه درمان به صورت تدریجی در مدت یک دقیقه به ۵ میلی آمپر یا صفر رسانده می شد [۱۱].

جدول ۱- شرایط درمان در گروههای درمان و شاهد؛ تعداد حیوان در هر گروه ۱۰ سر؛ جریان: ۵ میلی آمپر؛ آرایه الکتروودی: ۶ الکتروود در پایه و بالای تومور؛ A: قرارگیری آند در پایه تومور، C: قرارگیری کاتد در پایه تومور.

گروه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
وضعیت پلاریته	-	-	C	A	C	A	C	A	C	A
دز مینا (C/cm ³)	۰	۰	۱۰	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۴۰	۴۰

بررسی آماری: با توجه به غیر نرمال بودن تغییرات حجم تومورها و بقای حیوانات از آزمون "من-وینتی" برای مقایسه تغییرات حجم و روش محاسباتی کاپلان مایر و آنالیز لوگ رنک جهت ارزیابی و مقایسه کسر بقا در گروههای مختلف استفاده گردید. همچنین تست کاسکوئر جهت مقایسه پاسخ کامل بین گروهها بکار گرفته شد. مقایسه آماری مشاهدات آسیب شناسی نکروز نیز با استفاده از آزمون "من-وینتی" انجام پذیرفت.

۳- نتایج

تغییرات ظاهری تومورها بعد از درمان: بلافاصله بعد از شروع درمان برهم کنشهای الکتروشیمیایی در تومور و اطراف الکتروودها منجر به تغییرات شدید ظاهری (تغییر رنگ تومور و ایجاد چروکیدگی و ادم) در تومور گردید که در دزهای بالا نمایان تر بود. در اثر درمان، روند کاهش حجم و افزایش نکروز با شدت زیادی آغاز می گردید به طوری که تا ۵ روز بعد از درمان در تمامی گروههای آزمون کاهش بیش از ۸۰ درصد

به منظور ارزیابی اثرات الکتروولیز تعداد نمونه توموری در گروههای ۱، ۲، ۳، ۴، ۱۰ (هر گروه ۴ حیوان) در فاصله ۵ روز بعد از درمان اتوپسی شده و مورد بررسی آسیب شناسی نیز قرار گرفتند. شایان ذکر است در بررسی های ظاهری و میکروسکوپی، عدم عود مجدد به عنوان پاسخ کامل^۱، نابودی ۵۰ تا ۹۹ درصد حجم تومور به عنوان پاسخ جزئی^۲ و نابودی کمتر از ۵۰ درصد به عنوان بدون تغییر^۳ در نظر گرفته شد.

نمونه برداری بافتی: پس از کشتن حیوان، تومور با حاشیه ۰/۵ سانتیمتر برداشت و در محلول بافره فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. نمونه ها ۴۸ ساعت در محلول فیکساتور باقیمانده پس از برش و تهیه بلوک های پارافینی از برشهای سطحی و عمقی مورد رنگ آمیزی هماتوکسیلین و آئوزین قرار گرفتند. در مجموع از هر نمونه بافتی چندین اسلاید میکروسکوپی تهیه و به منظور تخمین میزان نکروز در نمونه ها با میکروسکوپ المپوس BX 40 مورد بررسی قرار گرفته و با برآورد میزان نکروز در هر برش، میانگین نکروز در هر نمونه مشخص گردید.

- 1- Complete response (CR)
2- Partial response (PR)
3- No Change (NC)



شکل ۳- ب : ۲ روز بعد از درمان



شکل ۳- ج : ۱۰ روز بعد از درمان



شکل ۳- د : ۲۰ روز بعد از درمان



شکل ۳- ه : ۳۱ روز بعد از درمان

حجم تومور و بروز اسکار در ناحیه درمان مشاهده شد
اشکال (۱ و ۲).



شکل ۱- مدل حیوانی تومور زیرجلدی کارسینومای کولون موش Balb/c.
۷۰ روز بعد از تزریق سلول



شکل ۲- سامانه الکترولیز تومور

عدم عود تومور حداکثر تا ۳ هفته بعد از درمان نشانگر پاسخ
کامل (CR) بود. در این حیوانات یک ماه بعد از درمان، تومور
کاملاً بهبودی یافته، ناحیه درمان از موهای جدید پوشیده و تنها
اسکار فیبروزی کوچکی به جای می ماند (اشکال ۳ و ۴).



شکل ۳- الف : قبل از درمان



شکل ۴-ج : ۱۰ روز بعد از درمان



شکل ۴-د : ۱۹ روز بعد از درمان



شکل ۴-ه : ۲۷ روز بعد از درمان



شکل ۴-و : ۱۲۰ روز بعد از درمان



شکل ۳-و : ۱۲۰ روز بعد از درمان

شکل ۳- روند تغییرات ظاهری تومور در حیوان شماره ۱ (دز مبنا : ۳۰ کولن بر سانتی متر مکعب از حجم تومور - ۶ الکتروود به صورت عرضی در پایه و با لای تومور با پلاریته کاند در پایه - حجم تومور ۲۹۰ میلی متر مکعب، زمان درمان ۳۹ دقیقه)



شکل ۴-الف : قبل از درمان



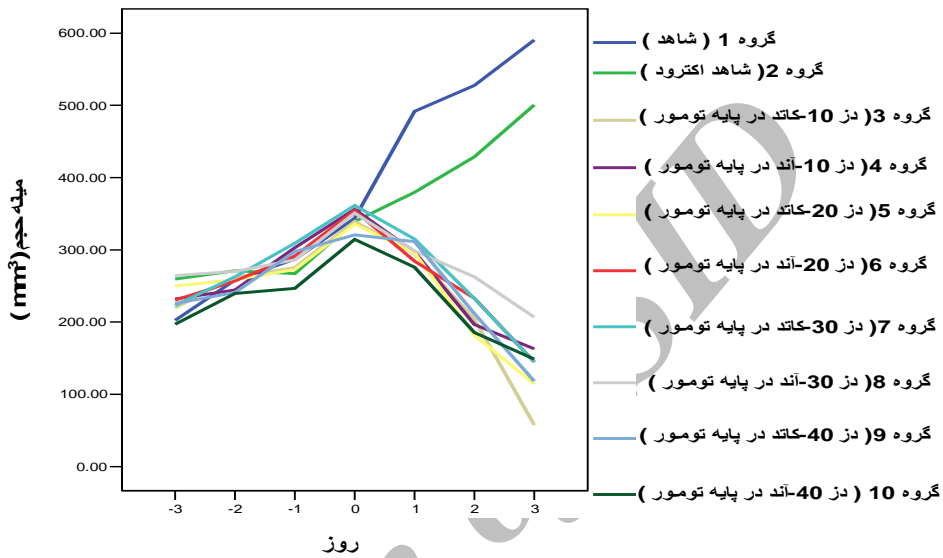
شکل ۴-ب : ۲ روز بعد از درمان

شکل ۴- روند تغییرات ظاهری تومور در اثر درمان موفقیت آمیز در حیوان شماره ۳ (دز مبنا : ۳۰ کولن بر سانتی متر مکعب از حجم تومور - ۶ الکتروود به صورت عرضی در پایه و بالای تومور با پلاریته آند در پایه - حجم تومور ۳۸۵ میلی متر مکعب، زمان درمان ۳۸/۵ دقیقه)

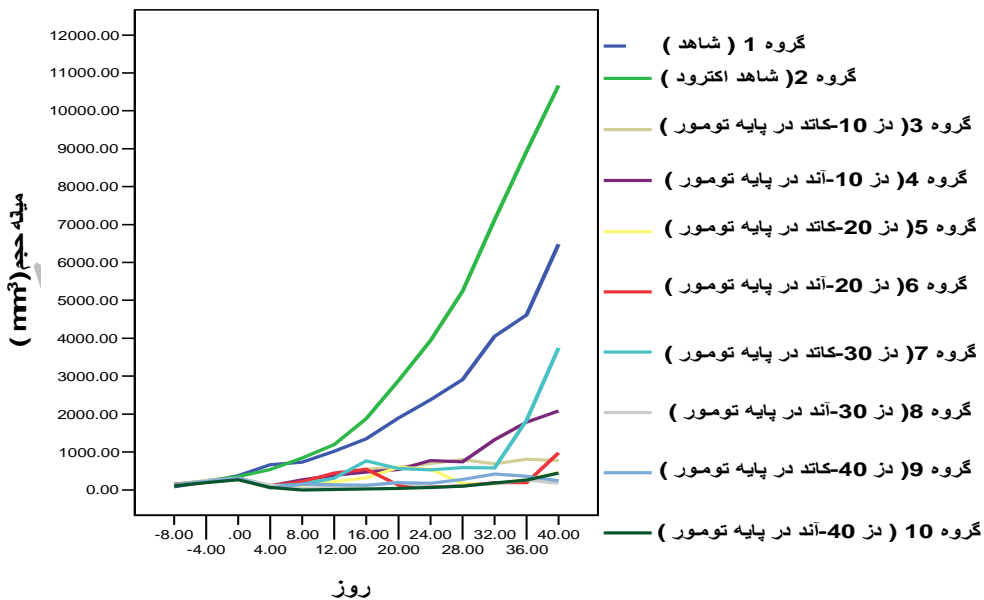
اثر دز الکتریکی و پلارینه در درمان تومور موش

تغییرات حجم تومور: در نمودار ۱ تغییرات میانه حجم تومور در ۷۲ ساعت اول بعد از درمان در گروههای مختلف دیده می شود. از نکات قابل توجه نمودارهای فوق کاهش شدید و معنی دار حجم تومور در تمام گروههای آزمون نسبت به

گروههای کنترل است ($P < 0.001$) اما در عین حال میزان کاهش حجم در بین گروههای آزمون معنی دار نیست. در نمودار ۲ تغییرات میانه حجم تومور تا ۴۰ روز بعد از درمان ثبت شده است.



نمودار ۱- تغییرات حجم تومورها در گروههای مختلف ۷۲ ساعت قبل و بعد از درمان



نمودار ۲- تغییرات حجم تومورها در گروههای مختلف درفاصله ۴۰ روز بعد از درمان

در حالی که زمان مورد نیاز برای دوبرابر شدن حجم تومور در گروههای ۱ و ۲ به ترتیب ۶/۱ و ۵/۸ روز بوده و عملا از رشد سریعی برخوردار بوده اند، الکترولیز به طور معنی داری توانسته رشد آنها را در گروههای آزمون کنترل کند و به تاخیر بیاندازد. به عنوان مثال در گروه ۳ (دز: $10\text{C}/\text{cm}^3$)، پلاریته: کاتد در پایه تومور) که پایینترین بازده دیده شد میانه حجم تومورها در فاصله ۴۰ روز بعد از درمان حدود ۵۰۰ میلیمتر مکعب می باشد، در حالیکه این زمان در گروه ۲ (شاهد اصلی) بیش از ۲۰ برابر گردیده و به حدود ۱۰۰۰۰ میلیمتر مکعب رسیده است.

میزان پاسخ به درمان: در حالیکه در گروههای شاهد، هیچ مورد نابودی خود به خود تومور اتفاق نیفتاد، تمامی حیوانات

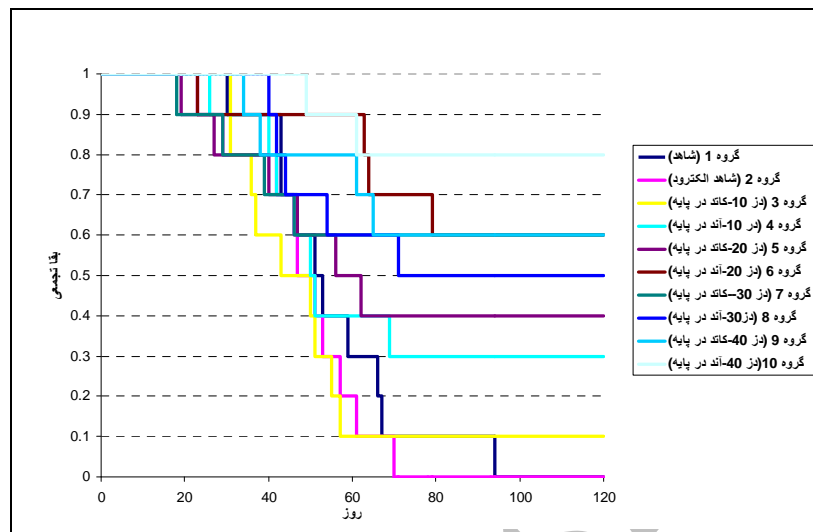
در گروههای درمانی پاسخ کامل و جزئی دیده نشد. همانطور که در جدول (۲) دیده می شود میزان پاسخ کامل در گروههای آزمون متفاوت است و از ۱۰ درصد (۱ مورد) در گروه ۳ به ۸۰ درصد در گروه ۱۰ می رسد که در مقایسه آماری میزان پاسخ در گروههای ۶ تا ۱۰ در مقایسه با گروههای کنترل معنی دار است ($P < 0/001$). همچنین مقایسه پاسخ در گروههای هم پلاریته نشان میدهد که با افزایش دز میزان پاسخ بهبود یافته و افزایش معنی دار CR در گروه ۹ در مقایسه با ۳ ($P = 0/02$) و گروه ۱۰ در مقایسه با ۴ ($P = 0/07$) این فرضیه را مطرح می کند.

جدول ۲- کیفیت پاسخ به درمان تومورها در گروههای مختلف

گروه	درصد پاسخ به درمان		
	بدون پاسخ	پاسخ جزئی	پاسخ کامل
۱	۱۰۰	صفر	صفر
۲	۱۰۰	صفر	صفر
۳	صفر	۹۰	۱۰
۴	صفر	۷۰	۳۰
۵	صفر	۶۰	۴۰
۶	صفر	۴۰	۶۰
۷	صفر	۴۰	۶۰
۸	صفر	۴۰	۶۰
۹	صفر	۳۰	۷۰
۱۰	صفر	۲۰	۸۰

بقای حیوانات: در نمودار ۳ کسر بقای تجمعی در گروههای مختلف نشان داده شده است. دیده میشود در حالی که کسر بقای تجمعی در ۱۲۰ روز بعد از درمان در گروههای کنترل صفر درصد است، در گروههای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ به ترتیب ۱۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۶۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ درصد می باشد.

با مقایسه میزان پاسخ به درمان در گروههای هم دز ولی در پلاریته مخالف دیده می شود که خصوصا در دزهای پایین میزان پاسخ در پلاریته آند در پایه تومور بهتر بوده (CR در گروه ۳، ۱۰ درصد و در گروه ۴، ۳۰ درصد) هر چند نتایج معنی دار نیست.



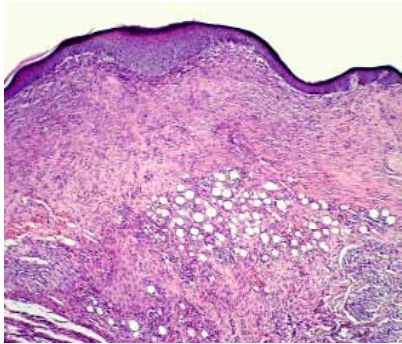
نمودار ۳- تغییرات کسری بقای جمعی در گروههای مختلف تا ۱۲۰ روز بعد از درمان

آنالیز داده ها با آزمون لوک رنگ نشان از افزایش معنی دار بقا در گروههای ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ نسبت به گروههای کنترل دارد. با افزایش دز اعمالی میزان بقا افزایش می یابد. خصوصاً در مقایسه گروه ۹ با ۳ ($P=0/007$) و ۱۰ با ۴ ($P=0/001$) که شرایط یکسانی دارند، این مسئله تایید می شود. در بررسی بقا در گروههای هم دز نیز کسر بقای جمعی در گروههای با پلاریته آند در پایه تومور بیشتر بوده، اما معنی دار نیست. در سراسر این مطالعه تنها یک مورد مرگ که احتمالاً ناشی از اثرات درمان بود، دیده شد. این حیوان در گروه ۹ قرار داشت (بیشترین دز الکتریکی) و ۶۵ روز بعد از درمان به علت نارسایی کلیوی مرد.

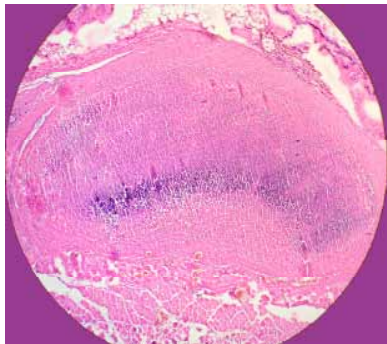
یافته های آسیب شناسی: در بررسی میکروسکوپی اسلایدهای بافتی، تومورها متشکل از سلولهای با هسته های کروی، بیضوی، یا دوکی شکل با سیتوپلاسم کم تا متوسط به رنگ صورتی تا ارغوانی (اسیدوفیل) و هسته های پروکروماتین و بازوفیل و برخی دارای هستک مشخص بودند (شکل ۵).

یافته های آسیب شناسی نمونه های درمان شده حاکی از آنست که نکروز ایجاد شده در تومورها از نوع نکروز انعقادی

بوده که مراحل مختلفی از این نکروز از مراحل ابتدایی تا مرحله انتهایی ترمیم محل نکروز مشاهده گردید (شکل ۶). اگر چه در بسیاری موارد نکروز در مرکز تومورها با گسترش به اطراف مشاهده می گردید اما در بعضی موارد در زیر یا بالای تومور در محلی که یکی از الکترودها قرار داده شده بودند، نکروز به ویژه مراحل اولیه آن آشکارتر بوده، نکروز انعقادی به صورت کاملاً مشخص با انباشتگی کروماتین هسته ای بروز یافته بود (شکل ۷). گاهی نیز در اطراف محل نکروز هجوم یاخته های سفید مشاهده می شد که در برخی موارد همراه با ایجاد نکروز میعانی در تومور ناشی از عمل آنزیمی، یاخته های سفید بود. در برخی از تومورها آپوپتوز مشخص مشاهده شد، اما از آنجا که معیار ارزیابی در این مطالعه نکروز بافتی بود، فرآیند مرگ سلولی در اثر آپوپتوز مورد توجه قرار نگرفت. در برخی از تومورها در مجاور تومور گره های لنفی که ناشی از برانگیختگی دستگاه ایمنی و پاسخ آن در برابر پادتن های تومور بود مشاهده گردید. همچنین با توجه به مشاهده نوتروفیل ها در نواحی اطراف تومور شواهدی از تحریک سیستم ایمنی توسط الکترولیز وجود دارد. در بعضی از

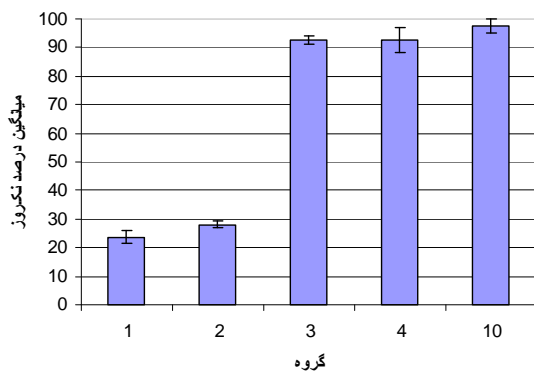


شکل ۷- جایگزینی بافت همبند فیبرو ترمیمی به جای یک تومور کاملاً از بین رفته، در ضخامت درم و هیپودرم - رنگ آمیزی H/E - بزرگ نمایی ۲۰۰ برابر



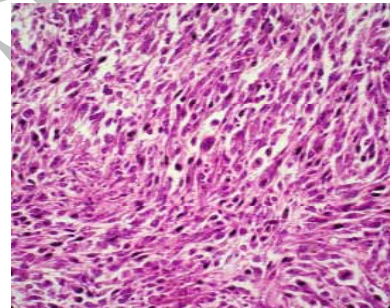
شکل ۸- یک ندول توموری کاملاً نکروزه؛ رنگ آمیزی H/E، بزرگ نمایی ۱۰۰ برابر

در نمودار ۴ میانگین درصد نکروز در فاصله ۵ روز بعد از درمان در گروههای ۱، ۲، ۳ و ۴ و ۱۰ نشان داده شده است.

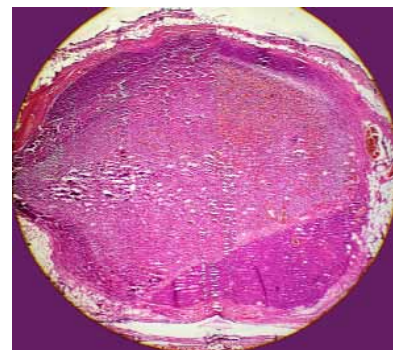


نمودار ۴- میانگین نکروز ثبت شده در گروههای مختلف ۵- روز بعد از درمان. داده ها بیانگر میانگین نکروز چهار تومور در هر گروه \pm خطای استاندارد روی میانگین می باشد.

جانوران بافت های مجاور تومور یعنی بافت چربی و عضلانی نیز دچار نکروز شده بود که می تواند ناشی از تأثیر سوء جریان بر بافت های طبیعی باشد. به ندرت در برخی جانوران در اطراف تومور نکروزه، مقاطع عروقی که با ترومبوز مسدود گردیده بود نیز مشاهده شد که این پدیده انسداد عروقی می تواند در ایجاد نکروز در تومور مؤثر بوده باشد. حیوانات درمان شده بعد از ۱۲۰ روز، در حالیکه سالم و سرحال بودند کشته و بررسی پاتولوژی روی تعدادی از آنها انجام پذیرفت. نتایج بیانگر عدم وجود تومور در ناحیه درمان بود که در جای آن نسج جوشگاهی بدون نکروز فعال جا گرفته بودند شکل (۸).



شکل ۵- نمای میکروسکوپی سلول های توموری، سالم - رنگ آمیزی H/E - بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر



شکل ۶- نمای میکروسکوپی یک تومور ایجاد شده با کانونی از مراحل اولیه یک نکروز در مجاور الکتروود - رنگ آمیزی H/E - بزرگ نمایی ۴۰ برابر

از درمان در تمام گروه‌های درمانی، مشاهده پاسخ کامل حتی در کمترین دز، و تحریک سیستم ایمنی (حضور نوتروفیلها در اطراف تومور)، بیانگر این است که در روش الکترولیز در کنار عوامل تثبیت شده از جمله pH و میدان الکتریکی عوامل دیگری از جمله تحریک سیستم ایمنی در نابودی تومور موثر هستند. چراکه در دزهای ۱۰ تا ۴۰ کولن بر سانتی متر مکعب علی رغم تفاوت فاحش این عوامل تثبیت شده اما تفاوت نکروز ثبت شده، چندان متفاوت نیست. محققان زیادی مشارکت سیستم ایمنی، در نابودی تومور را مورد تأیید قرار داده اند [۱۴، ۱۷، ۱۹]. کریا و همکارانش معتقدند در اثر نکروز ایجاد شده بوسیله الکترولیز، سیستم ایمنی تحریک شده و لکوسیت ها با ایجاد التهاب حاد موضعی، به روند نابودی تومور کمک می کنند [۱۷]. صحت و سلامت کامل تمام حیوانات درمان شده و مرگ و میر بسیار محدود آنها نشان از ایمنی کامل روش الکترولیز و پتانسیل بالای آن در افزایش بقا طولانی مدت قابل تکرار دارد.

۵- نتیجه گیری

به نظر می رسد الکترولیز بسیاری از شرایط و ویژگیهایی را که یک شیوه درمان یا کنترل سرطان باید داشته باشد، داراست. بزرگترین معضل این روش زمان نسبتاً طولانی درمان است که با کنترل و بهینه سازی پارامترهایی از جمله آرایش الکترودی، توزیع یکنواخت دز، پلاریته و تعداد مناسب الکترود و همیاری تکنیکهای دیگر از جمله هایپرترمیا قابل تعدیل خواهد بود [۲۲، ۱۱]. هزینه های کم درمان، ایمنی، عوارض جانبی محدود و بازده بالا در کنار ویژگیهایی از جمله سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته باعث خواهد شد این روش در آینده، نقش بسزایی در درمان سرطان ایفا کند و به صورت مکمل در کنار جراحی و رادیوتراپی موجب افزایش بازده درمان و بقای بیماران گردد.

بر اساس این نتایج میزان نکروز در گروه‌های درمان ۳، ۴، ۱۰ به طور معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل بیشتر بوده است ($P < 0.02$). در مقایسه گروه ۱۰ با گروه‌های ۳ و ۴ علیرغم افزایش دز، تفاوت میزان نکروز معنی دار نبود.

۴- بحث

از آنجا که الکترولیز در مقایسه با سایر شیوه‌های انعقادی و کندگی گرمایی نظیر امواج رادیوفرکانسی، لیزر و مایکروویو یک روش ارزان ایمن و بدون عارضه معرفی شده و در مواردی مثل درمان متاستازهای کبدی کولورکتال و تومورهای مجاور عروق اصلی بخصوص توام با جراحی از ارزش خاصی برخوردار است [۲۰ و ۲۱]، به منظور تعیین پارامترهای درمانی بهینه انجام مطالعات حیوانی ضروری بنظر می‌رسد. با توجه به روند متفاوت تغییرات حجم تومور بین دو گروه شاهد و همچنین آهنگ رشد تومور در گروه ۲ گمان می رود قرارگیری الکترودها و دستکاری تومور علت اصلی آهنگ رشد سریع تر تومور در گروه ۲ باشد. کاهش معنی دار حجم تومور و نابودی حداقل ۸۰ درصد آن در تمام گروه های آزمون نسبت به کنترل نشان می دهد که الکترولیز دارای اثرات ضد توموری است و پتانسیل بالایی برای نابودی و کنترل تومورهای سرطانی دارد. بررسی اثر دز بر میزان پاسخ کامل و بقا بیانگر افزایش آنها با بالا رفتن دز دارد. البته با توجه به عوارض دزهای بالا باید به منظور دستیابی به بهترین پاسخ درمانی و کمترین عوارض از عوامل دیگری از قبیل آرایش الکترودی، پلاریته و تعداد الکترود به نحو موثری استفاده نمود. در پلاریته آند در پایه تومور نتایج بهتر، اما بدون تفاوت معنی دار بدست آمد. پیش بینی می شود که با افزایش تعداد حیوانات، اثر پلاریته بارزتر شود. بعضی از محققان همچون کریا، دلایل بازده بهتر را سمیت بیشتر در اطراف آند و تولید رادیکالهای ROS دانسته اند [۱۴]. شواهدی از جمله درصد بالای نکروز (در فاصله ۵ روز بعد از درمان)، عدم کاهش معنی دار حجم تومورها تا ۷۲ ساعت بعد

۶- تشکر و قدردانی

آقایان دکتر امیر علی آریان جهت راهنماییهای ایشان در زمینه کار با حیوانات و علی بخشی کاخکی که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت مالی تحقیق، آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان امام رضا(ع) جهت همکاری در انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی،

منابع

1. Garcea G, Lloyd TD, Aylott C, Maddern G, Berry DP. The emergent role of focal liver ablation techniques in the treatment of primary and secondary liver tumours. *Eur J Cancer*. 2003 Oct; 39(15):2150-64.
2. Royal Australasian college of surgeons. NET-S Procedure Brief Summary Electrolytic Ablation of Tumours. Procedure Brief. 2002 Sep.
3. Berry DP, Dennison AR, Ward R, Maddern GJ. Electrolytic ablation of colorectal liver metastases: 1-year histological patient follow-up. *Dig Surg* 2000; 17(5):518-9.
4. Wemyss-Holden SA, Robertson GS, Dennison AR, Vanderzon PS, Hall PM, Maddern GJ. A new treatment for unresectable liver tumours: long-term studies of electrolytic lesions in the pig liver. *Clin Sci (Lond)* 2000 May; 98(5):561-7.
5. Berry D, Garcea G, Chong C, Silman E, Finch G, Dennison A, Maddern GJ. Systematic reaction to electrolytic treatment of pig livers in vivo. *ANZ J Surg*. 2004 Jul; 74(7):586-90.
6. Morrison CP, Teague BD, Court FG, Wemyss-Holden SA, Metcalfe MS, Dennison AR, Maddern GJ. Experimental studies of serum cytokine concentration following pancreatic electrolytic ablation. *Med Sci Monit* 2003 Jan; 9(1):BR43-6.
7. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Finch GJ, Hall Pd Pde L, Maddern GJ. Electrolytic ablation as an adjunct to liver resection: experimental studies of predictability and safety. *Br J Surg*. 2002 May; 89(5):579-85.
8. Von Euler H, Nilsson E, Olsson JM, Lagerstedt AS. Electrochemical treatment (EChT) effects in rat mammary and liver tissue. In vivo optimizing of a dose-planning model for EChT of tumours. *Bioelectrochemistry*. 2001 Nov; 54(2):117-24.
9. Nilsson E, von Euler H, Berendson J, Thörne A, Wersäll P, Näslund I, et al. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry*. 2000 Feb; 51(1):1-11.
10. Von Euler H, Strähle K, Thörne A, Yongqing G. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). *Bioelectrochemistry*. 2004 Apr; 62(1):57-65.
11. Ciria HC, Quevedo MS, Cabrales LB, Bruzón RP, Salas MF, Pena OG, González TR et al. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer*. 2004 Nov 26;4:87.

12. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Berry DP, Maddern GJ. Local ablation for unresectable liver tumors: is thermal best? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11(2):97-106.
13. Finch JG, Fosh B, Anthony A, Slimani E, Texler M, Berry DP, et al. Liver electrolysis: pH can reliably monitor the extent of hepatic ablation in pigs. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Apr; 102(4):389-95.
14. Cabrales LB, Ciria HC, Bruzón RP, Quevedo MS, Aldana RH, De Oca LM, et al. Electrochemical treatment of mouse Ehrlich tumor with direct electric current. *Bioelectromagnetics* 2001 Jul; 22(5):316-22.
15. Nilsson E, von Euler H, Berendson J, Thörne A, Wersäll P, Näslund I, Lagerstedt AS, Narfström K, Olsson JM. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry* 2000 Feb; 51(1):1-11.
16. Blank M, Lavie G, Mandel M, Keisari A. Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncol Res* 2001; 12(9-10): 409-18.
17. Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics*. 1997; 18(1):14-24.
18. Griffin DT, Dodd NJ, Moore JV, Pullan BR, Taylor TV. The effects of low-level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumour regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer* 1994 May; 69(5):875-8.
19. Sersa G, Kotnik V, Cemazar M, Miklavcic D, Kotnik A. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor-bearing mice--natural resistance and immune responsiveness. *Anticancer Drugs*. 1996 Sep; 7(7):785-91.
20. Teague BD, Wemyss-Holden SA, Fosh BG, Dennison AR, Maddern GJ. Electrolysis and other local ablative treatments for non-resectable colorectal liver metastases. *ANZ J Surg*. 2002 Feb; 72(2):137-41.
21. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Berry DP, Maddern GJ. Local ablation for unresectable liver tumors: is thermal best? *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2004; 11(2):97-106.
22. Xie L, Sun CJ, Zhao SF. A new local ablation for unresectable primary liver tumor: effect of electrothermal and electrochemical therapy on rat liver. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Aug; 7(8):654-9.