

درمان تومور کارسینومای کولون موش Balb/c با روش الکترولیز: اثر توزیع دوز

مهدی شیرین شانددیز^۱، آمنه سازگارنیا^۲

تاریخ دریافت مقاله:

تاریخ پذیرش مقاله:

۱. مربی فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان

۲. استادیار فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد

چکیده

زمینه و هدف: الکترولیز درمانی روش فیزیکی جدید و موثر برای درمان سرطان‌های موضعی می‌باشد که در آن از آثار جریان الکتریکی مستقیم از جمله تغییرات شدید pH، مواد سمی تولیدی و اثرات میدان الکتریکی، جهت نابودی تومور استفاده می‌شود. مطالعه حاضر به بررسی روش فوق و اثر توزیع دوز در بازه درمان در مدل توموری کارسینومای کولون موش Balb/c پرداخته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی ابتدا با تزریق زیر جلدی سلول‌های CT26 در پهلوئی راست موش‌های Balb/c، در ۶۰ حیوان تومور کارسینومای کولون القا گردید. زمانی که حجم تومور به $340 \pm 30 \text{ mm}^3$ رسید حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه تقسیم شدند. در گروه ۳ از یک منبع جریان و در گروه ۴ از ۳ منبع جریان، جهت اعمال دوز ۲۰ کولن بر سانتی‌متر مکعب از طریق شش الکتروود که در پایه و بالای تومور قرار می‌گرفتند، استفاده شد. علاوه بر بررسی آسیب‌شناسی جهت تایید تومور و اثرات درمان، اندازه‌گیری روزانه ابعاد تومور و مرگ و میر حیوانات نیز ثبت شد.

یافته‌ها: در حالی که در گروه‌های شاهد، تومورها به سرعت و بدون حتی یک مورد پسرقت، رشد کردند و کسر بقا در فاصله ۵۰ روز بعد از الکترولیز، صفر گردید. در گروه‌های ۳ و ۴، نابودی کامل به ترتیب ۴۰ (۸/۲۰) و ۶۰ (۱۲/۲۰) درصد ثبت شد که بیانگر افزایش معنی‌دار نابودی کامل در هر دو گروه آزمون ۳ ($p=0/029$) و ۴ ($p=0/002$) نسبت به گروه‌های شاهد بود. هم‌چنین کسر بقا در گروه‌های درمان افزایش یافت به طوری که افزایش بقا در گروه ۴ نسبت به گروه‌های شاهد کاملاً معنی‌دار بود ($p=0/02$).

نتیجه‌گیری: مشاهدات حکایت از اثرات ضد توموری و پتانسیل بالای الکترولیز درمانی در درمان و نابودی تومورهای سرطانی و کنترل رشد آن‌ها دارد. که می‌تواند بازده آن با راهکارهایی نظیر استفاده از منابع جریان بیشتر یا الکتروود بیشتر جهت توزیع یکنواخت‌تر دوز، بالا رود. [م ت ع پ ز، -:]

کلیدواژه‌ها: الکترولیز، دوز الکتریکی، کارسینومای کولون موش Balb/c، رده سلولی CT26

مقدمه

این روش قابلیت استفاده در مجاورت عروق اصلی و نابودی کامل سلول‌های سرطانی اطراف آن را بدون آسیب به عروق داراست در حالی که در روش‌های ذکر شده، این امکان فراهم نیست.^{۱۸} در این تکنیک تحت تاثیر پتانسیل و میدان الکتریکی اعمالی، تومور پلاریزه و به دنبال آن دستخوش تجزیه الکتروشیمیایی می‌گردد و تومور در اثر عواملی نظیر تغییرات شدید pH، میدان الکتریکی القایی و مواد سمی تولیدی و عوامل محتمل دیگر از جمله تحریک سیستم ایمنی دچار نکروز و از هم پاشیدگی می‌شود.^{۱۹-۴۹،۱۳}

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.^{۱۱} در ۱۹۸۹ الکترولیز درمانی در چین تائید شد و در مدت یک دهه، ۱۵۰۰۰ بیمار که دارای انواع تومورهای بدخیم و خوش خیم سطحی و احشایی بودند، تحت درمان قرار گرفتند.^{۱۱،۱۲} با وجود نتایج دلگرم‌کننده موجود، این روش هنوز در غرب مجوز بالینی دریافت نکرده است، زیرا کماکان در ارتباط با مکانیزم نابودی تومور و شرایط بهینه عوامل مداخله‌گر نظیر پارامترهای الکتریکی (جریان، دوز الکتریکی، چگالی جریان و ...) و آرایش و پلاریته الکتروودها ابهاماتی وجود دارد.^{۱۲،۱۳} بر همین اساس در تحقیق حاضر ضمن بررسی تأثیر الکترولیز، اثر توزیع دوز را که به نظر می‌رسد با افزایش تعداد منابع جریان بهتر می‌گردد، با استفاده از آرایش ۶

در حال حاضر روش‌های رایج درمان و کنترل سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌باشند که به صورت جداگانه یا ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال سرطان‌هایی وجود دارند که به روش‌های معمول قابل درمان نبوده و نیازمند به کارگیری درمان‌های مکمل می‌باشند.^{۱۲} کارسینومای سلول‌های کبدی و متاستاز کبدی کولورکتال در زمره این بیماری‌ها به شمار می‌روند. جراحی تنها روش درمانی موثر برای درمان این سرطان‌ها به شمار می‌رود. اما متاسفانه عواملی از جمله تومورهای متعدد، نزدیکی و تهاجم سلول‌های سرطانی به عروق اصلی، بزرگی تومور و ضعف مفرد بیمار، باعث می‌شود که تنها ۲۰ درصد بیماران برای جراحی مناسب باشند.^{۱۳-۵} یکی از روش‌های نو جهت ریشه‌کنی تومورهای سرطانی که اخیراً مورد توجه و بررسی جدی قرار گرفته، الکتروشیمی درمانی (Electrochemical Therapy-ECHT) یا الکترولیز درمانی می‌باشد که علاوه بر سادگی، ارزانی و عوارض جانبی ناچیز، ایمن بوده و نسبت به تکنیک‌های فیزیکی جدید دیگر از جمله سرما درمانی (Cryotherapy)، لیزر درمانی (Laser interstitial thermotherapy)، رادیو فرکانسی درمانی (Radiofrequency ablation) و فرا صوت درمانی (High-intensity focussed ultrasound) دارای پاسخ التهابی سیستمیک (SIRS-systemic inflammatory response) کمتر می‌باشد.^{۱۶،۷} هم‌چنین

بعد از تریسینه کردن، سلول‌ها شمارش شده و درصد سلول‌های زنده به روش تریان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین و سوسپانسیون سلولی با غلظت 1.05×10^5 سلول زنده در هر میلی‌لیتر محلول هنکس آماده گردید.

ایجاد مدل توموری حیوانی: مدل توموری در موش‌های Balb/c (8-6 هفته‌ای با وزن 28-20 گرم) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد، القا گردید. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در قفس‌های مخصوص در یک اتاق جداگانه در دمای $22 \pm 23^\circ\text{C}$ و رطوبت 65 درصد، هم‌چنین سیکل روز-شب طبیعی و تحت تغذیه‌ی غذای استاندارد (غذای موش، شرکت جوانه خراسان) قرار داشتند. سپس به هر موش، تعداد 5×10^5 سلول زنده در حجم $100 \mu\text{l}$ محلول هنکس تزریق شد. تزریق به صورت زیر جلدی در پهلو راست حیوانات انجام گردید. از روزی که حجم تومور به حدود $20 \pm 100 \text{mm}^3$ رسید، روزانه ابعاد آن‌ها [قطر کوچک (a)، قطر بزرگ (b) و ضخامت تومورها (c)] با استفاده از کولیس ورنیه‌ی دیجیتالی اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه $V = \pi/6 (a.b.c)$ ، حجم تومورها (V) محاسبه گشت.⁹

بیهوشی حیوانات: قبل از قرار دادن الکترودها در تومور و اعمال جریان، حیوان با تزریق داخل صفاقی 10 mg/kg زایلازین (ساخت شرکت دارویی بهیار سامان؛ 2% Xylazine) و 50 mg/kg کتامین (Ketamine) هم‌چنین جهت جلوگیری از خشکی چشم حیوان در حین بیهوشی از قطره استریل چشمی استفاده گردید.¹¹

سامانه الکترولیز با جریان ثابت: برای اعمال دوز الکتریکی مورد نظر از یک سامانه الکترولیز با جریان ثابت که در مرکز تحقیقات فیزیکی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد طراحی و ساخته شده است، بهره‌برداری گردید. این منبع جریان قابلیت اعمال جریان الکتریکی ثابت با دقت 0.1 میلی‌آمپر را در مقاومت اهمی متغیر بافت حین درمان (مقاومت بافت در طول الکترولیز بیش از چند هزار اهم تغییر می‌کند) دارا می‌باشد. سیستم دارای چهار کانال خروجی مجزا با نمایشگر ولتاژ (V)، جریان (mA)، زمان (S) و بار الکتریکی (C) جداگانه می‌باشد. به منظور افزایش ضریب ایمنی و جلوگیری از خطرات احتمالی ناشی از افزایش شدت جریان الکتریکی، این سامانه از محدودکننده 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.

الکترودها: الکترودها از سیم‌های پلاتینی (MERK) با درجه خلوص بسیار بالا (99.9%) به قطر 0.7 و طول 20 میلی‌متر ساخته شد. جهت ورود راحت‌تر الکترودها به تومور نوک آن‌ها تیز و قبل از هر جلسه درمان استریل می‌گردید.¹¹

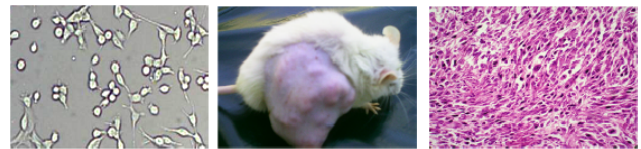
روش‌ها و گروه‌های درمانی: درمان تومورها زمانی که حجم آن‌ها به $30 \pm 34 \text{mm}^3$ می‌رسید، پس از آماده‌سازی حیوان انجام می‌پذیرفت. این مرحله شامل کنترل وزن حیوان، حذف موهای تومور و اطراف آن، اندازه‌گیری ابعاد تومور و محاسبه زمان و مقدار دوز اعمالی با توجه به حجم تومور

الکترودی به صورت افقی در پایه و بالای تومور با جریان الکتریکی مستقیم 5 میلی‌آمپر روی مدل توموری کارسینوما کولون موش Balb/c مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه درمان‌های فیزیکی سرطان مرکز تحقیقات فیزیکی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. جهت بررسی اثر الکترولیز و توزیع دوز، پس از مشاوره با متخصص آمار و بررسی متون 60 موش انتخاب شدند^{9,11} که این حیوانات در 4 گروه (گروه‌های شاهد 1 و 2 هر کدام 10 حیوان، گروه‌های آزمون 3 و 4 هر کدام 20 حیوان) به طور تصادفی قرار گرفتند. گروه 1 (بدون قرارگیری الکترودها در تومور) و گروه 2 (قرارگیری 6 الکترودها در دو ردیف در تومور اما بدون اعمال جریان و دوز به مدت زمان 45 دقیقه) به ترتیب به عنوان شاهد و شاهد اصلی در نظر گرفته شدند. گروه 3 جهت حذف آثار تداخلی و غیر قابل پیش‌بینی الکترودها پلاتینی در بروز نکروز در نظر گرفته شد و بدین دلیل گروه شاهد اصلی نام گرفت. در گروه 3 ، جریان 5 میلی‌آمپر از طریق یک منبع جریان به 6 الکترودها اعمال می‌گردید در حالی که در گروه 4 از سه منبع جریان که هر یک جداگانه به یک جفت الکترودها آند و کاتد وصل می‌شد جهت اعمال دوز استفاده گردید. شایان ذکر است در گروه‌های آزمون، الکترودهای واقع در پایه تومور به قطب منفی دستگاه متصل بوده و نقش کاتد ایفا کرده و الکترودهای واقع در بالای تومور به قطب مثبت متصل گردیدند و نقش آند را ایفا می‌کردند.

کشت و تکثیر سلول‌ها: رده سلولی CT26 مشتق شده از تومور کارسینوما کولون موش Balb/c از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. شایان ذکر است در زمان انجام طرح این رده تنها رده سلولی موجود در کشور بود که قابلیت ایجاد تومور با رشد سریع و نامحدود در موش Balb/c را داشت (شکل 1). سپس سلول توموری درون فلاسک‌های استریل در محیط کشت RPMI-1640 حاوی 10% درصد FCS و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین ($100 \mu\text{g/ml}$) و پنی‌سیلین (100 U/ml)، به صورت سوسپانسیون در انکوباتور 37°C دارای 5% درصد دی‌اکسید کربن مورد کشت و تکثیر قرار گرفت.



شکل 1: الف) رده سلولی CT26 مشتق شده از کارسینوما کولون موش Balb/c (ب) مدل زیر جلدی تومور کارسینوما کولون موش Balb/c؛ گروه 1، 70 روز بعد از تزریق سلول توموری؛ وزن موش 20 gr و وزن تومور 30 gr (ج) نمای سلول‌های غیره نکره‌ه تومور کارسینوما کولون موش Balb/c؛ (رنگ آمیزی H/E؛ بزرگ نمایی 400 برابر)

بعد از دو تا سه روز رشد و تکثیر، سلول‌ها به صورت تک لایه کف فلاسک را می‌پوشانند (شکل 1-الف). جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک توسط تریسین-EDTA و در شرایط استریل در زیر هود، صورت گرفت.

یافته‌ها

در پایلوت‌های اولیه مشاهده شد که با یک منبع جریان، توزیع دوز در تومور به دلیل جریان الکتریکی غیر یکسان در الکترودها که ناشی از مقاومت الکتریکی متفاوت موجود در مسیر آن‌هاست، یکنواخت نیست و حتی چندین مورد عود مجدد که احتمالاً ناشی از این پدیده بود، دیده شد. جهت رفع این مشکل از سه منبع جریان جهت تغذیه هر جفت الکترودها (آند و کاتد) استفاده شد و با این مکانیسم جریان در الکترودها با وجود مقاومت بافتی متفاوت موجود در مسیر هر یک از آن‌ها، یکسان گردید. بررسی‌های ظاهری و آسیب شناسی نیز بیانگر توزیع یکنواخت‌تر دوز با سه منبع جریان بود، که هدف از در نظر گرفتن گروه ۴ نیز، همین نتایج بود.

مشاهدات کیفی بعد از الکترولیز: بلافاصله بعد از شروع درمان برهم کنش‌های الکتروشیمیایی در تومور و خصوصاً در اطراف الکترودها آغاز گردید و شاهد تشکیل و آزاد شدن حباب‌های گازی در اطراف الکترودها که گفته می‌شود در آند، کلر و اکسیژن و در کاتد، هیدروژن می‌باشد، بودیم.^{۸،۱۱،۲۳،۲۴} در ادامه در اثر تغییرات الکتروشیمیایی و فرایندهایی نظیر الکترواسمز تغییرات شدید ظاهری (تغییر رنگ تومور و ایجاد چروکیدگی و ادم) در تومور صورت می‌گرفت که این مسئله خصوصاً با افزایش زمان نمایان‌تر می‌گردید. بعد از اتمام الکترولیز، روند کاهش حجم و افزایش نکروز با شدت زیادی آغاز گردید به طوری که در فاصله ۵ روز بعد از درمان، در تمام تومورهای دو گروه آزمون کاهش بیش از ۸۰ درصد حجم تومور و وجود تنها ضایعه زخم مانند در ناحیه درمان دیده شد. معمولاً عود مجدد حداکثر تا ۳ هفته بعد از درمان نمایان می‌شد و عدم عود مجدد بعد از این مدت نشانگر پاسخ کامل بود که در این حیوانات در فاصله یک ماه بعد از الکترولیز، ناحیه درمان کاملاً خوب شده و تنها اسکار فیبروزی کوچکی در ناحیه به جای می‌ماند و مو آنجا را می‌پوشاند. شکل ۲ روند تغییرات تومور در اثر الکترولیز را در یک مدل توموری تحت درمان با دوز $20\text{C}/\text{cm}^2$ در پلاریته کاتد در پایه و با استفاده از سه منبع جریان را نشان می‌دهد.



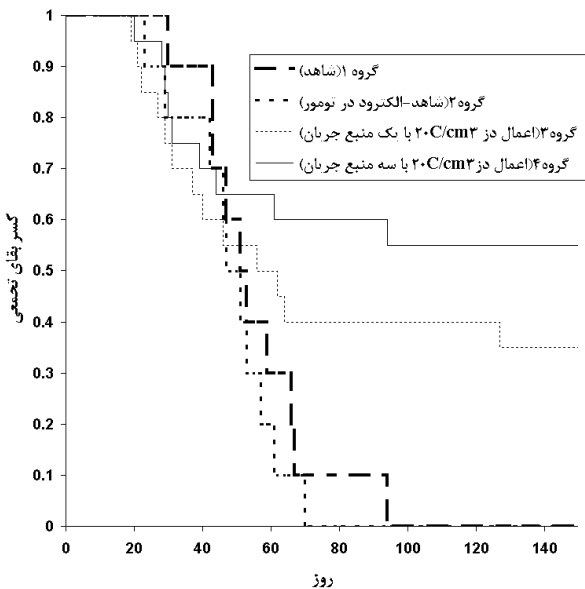
شکل ۲: روند تغییرات ظاهری تومور در اثر درمان با دز مبنا ۲۰ کولن بر سانتی مترمکعب از حجم تومور - الکتروده به صورت عرضی در پایه و بالای تومور با پلاریته پایه کاتد (درمان با سه منبع جریان) - حجم تومور (۳۳۷ میلی متر مکعب، زمان درمان ۲۲ دقیقه)

و دوز مبنا، تریقی داخل صفاقی داروی بیهوشی و قراردادن الکترودها در تومور بود. زمان درمان طبق قانون آمپر ($q=It$) و با توجه به دوز (q) و جریان الکتریکی (I) اعمالی محاسبه می‌گردید. بر اساس بررسی‌های قبلی انجام شده حداکثر جریان قابل تحمل (با توجه به سایز و وزن حیوان) ۵ میلی آمپر بود که در این مطالعه انتخاب شد.^{۲۱} هم‌چنین آرایه الکترودها در تومور به صورت افقی و موازی با سطح بدن موش با آرایش دو ردیف ۳ تایی، در پایه و بالای تومور انتخاب گردید. با توجه به بازده مناسب الکترولیز و از طرفی کوچکی و وزن کم حیوان و بنابراین حساسیت بالا، درمان تنها در یک جلسه انجام گردید.^{۹،۲۱} به منظور جلوگیری از ایجاد شوک در موش، در آغاز و خاتمه درمان، جریان به صورت تدریجی و در مدت یک دقیقه به ۵ میلی آمپر یا بالعکس به صفر رسانده شد.^{۱۲} حیوان پس از درمان، قرنطینه و جهت جلوگیری از تومور خواری توسط دیگر حیوانات، به مدت سه هفته مجزا نگهداری می‌شد.^{۲۱} حیوانات تا ۱۵۰ روز بعد از درمان، تحت نظر بودند و در این مدت اندازه گیری روزانه حجم در تومورهای عود کرده، انجام می‌گرفت. به منظور ارزیابی اثرات الکترولیز تعداد نمونه توموری با شرایط گروه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ (هر گروه ۴ حیوان) در فاصله ۵ روز بعد از درمان اتوپسی شده و مورد بررسی آسیب شناسی نیز قرار گرفتند. هم‌چنین در تعدادی از حیوانات موجود در گروه‌های آزمون (نمونه‌های خوب شده و عود کرده) و شاهد در زمان مرگ، بررسی آسیب شناسی در ناحیه درمان و برخی از اندام‌های درونی از جمله کبد، ریه، کلیه، روده و لوله گوارش انجام پذیرفت. شایان ذکر است در بررسی‌های ظاهری و میکروسکوپی، عدم عود مجدد به عنوان پاسخ کامل (Complete Response)، نابودی ۵۰ تا ۹۹ درصد حجم تومور به عنوان پاسخ جزئی (Partial Response) و نابودی کمتر از ۵۰ درصد به عنوان بدون تغییر (No Change) در نظر گرفته شد.^{۲۱}

نمونه برداری بافتی: پس از کشتن حیوان، تومور با حاشیه ۰/۵ سانتیمتر برداشت و در محلول بافره فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. نمونه‌ها ۴۸ ساعت در محلول فیکساتور باقیمانده پس از برش و تهیه بلوک‌های پارافینی از برش‌های سطحی و عمقی مورد رنگ آمیزی هماتو کسلین و اتوزین قرار گرفتند. در مجموع از هر نمونه بافتی چندین اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از نمونه‌ها توسط متخصص آسیب شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور تخمین میزان نکروز در نمونه‌ها، برش‌های مختلف بافتی در اسلایدهای هر نمونه با میکروسکوپ الیمپوس BX40 مورد بررسی قرار گرفته و با برآورد میزان نکروز در هر برش، میانگین نکروز در هر نمونه مشخص گردید.

بررسی آماری: با توجه به غیر نرمال بودن تغییرات حجم تومورها و بقای حیوانات از آزمون "من-ویتنی یو" 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 χ^2 جهت مقایسه پاسخ کامل بین گروه‌ها به کار گرفته شد. مقایسه آماری مشاهدات آسیب شناسی نکروز نیز با استفاده از آزمون "من-ویتنی یو" انجام پذیرفت.

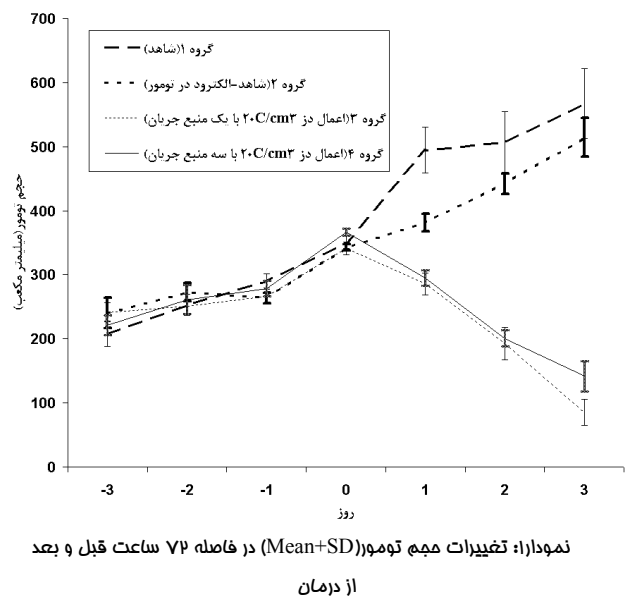
میزان پاسخ به یک جلسه درمان با الکترولیز: در دو گروه شاهد، تومورها به سرعت و بدون پسرفت یا حتی توقف در رشد، مطابق نمودار ۲ بزرگ شدند و حتی در معدودی از موش‌ها، تومورها به وزن بیش از ۳۰ گرم که در مقایسه با وزن حیوان (۲۰ گرم) قابل توجه بود، رسیدند و در نتیجه تمام موش‌ها در اثر عوارض ناشی از سرطان مردند (شکل ۱-ج). این در حالی بود که در گروه سه، ۴۰ (۸/۲۰) درصد و در گروه چهار، ۶۰ (۱۲/۲۰) درصد پاسخ کامل (Complete Response) پس از یک جلسه درمان دیده شد. شایان ذکر است در بقیه تومورهای این دو گروه، پاسخ کامل مشاهده نشد اما نابودی بیش از ۸۰ درصد که در واقع پاسخ نسبی (Partial Response) است، دیده شد. در مقایسه بین گروه‌های آزمون و شاهد، میزان پاسخ کامل در گروه ۴ ($p=0/002$) و گروه ۳ ($p=0/029$) نسبت به گروه‌های شاهد معنی دار بود. هم‌چنین هرچند پاسخ کامل در گروه ۴ نسبت به گروه ۳ بیشتر شده بود (۲۰ درصد بیشتر) اما با وجود اختلاف فاحش معنی دار نبود.



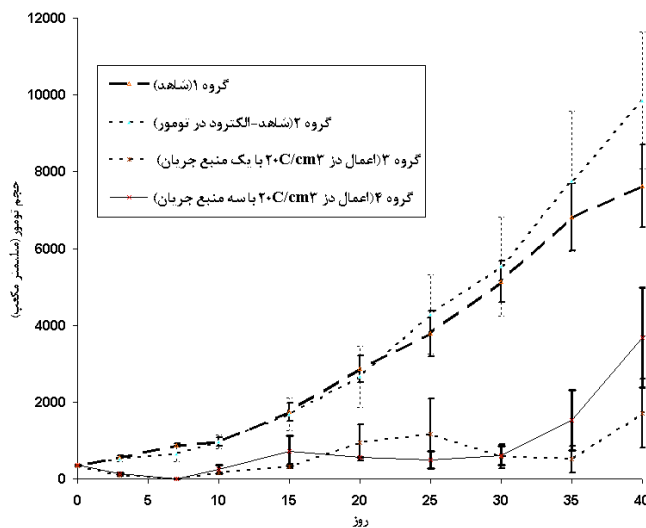
نمودار ۳: تغییرات کسر بقا در گروه‌های مختلف در فاصله ۱۵۰ روز بعد از درمان

میانگین بقاء حیوانات در گروه‌های شاهد ۱ و ۲ به ترتیب 55 ± 17 و 49 ± 14 روز ثبت شد. در حالی که در گروه‌های آزمون ۳ و ۴ با فرض بدترین حالت ممکن (مردن تمام حیوانات خوب شده بعد از ۱۵۰ روز) به ترتیب 81 ± 56 و 101 ± 57 روز گردید و قطعاً با افزایش دوره زمانی پیگیری، بسیار بیشتر نیز می‌گردید. زیرا حیوانات باقی‌مانده در پایان مطالعه کاملاً سالم و سرحال و با وزن طبیعی بودند. در نمودار ۴ تغییرات بقا تجمعی در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. دیده می‌شود در حالی که درصد بقا تجمعی در فاصله ۱۰۰ روز بعد از درمان در گروه‌های شاهد ۱ و ۲ به صفر درصد رسیده است در گروه‌های ۳ و ۴ در پایان ۱۵۰ روز به ترتیب ۳۵ و ۵۵ درصد می‌باشد. آنالیز داده‌ها با آزمون لوگ رنگ نشان از افزایش معنی‌دار بقا در گروه ۴ نسبت به گروه‌های شاهد دارد ($p=0/02$). در تجزیه و تحلیل نتایج بقا نیز شاهد بهتر بودن نتایج در گروه ۴ نسبت به گروه ۳ هستیم هر چند نتایج معنی‌دار نیست. یک مورد مرگ در گروه ۳ (۱۲۷ روز بعد از درمان) و یک مورد

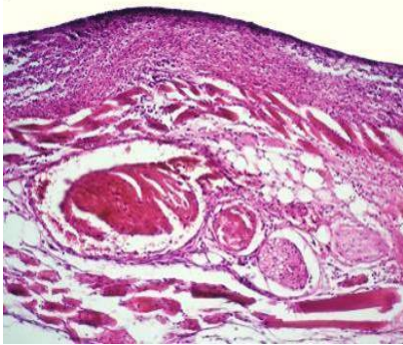
تغییرات حجم تومور: در نمودار ۱ تغییرات حجم تومور در ۷۲ ساعت اول قبل و بعد از الکترولیز در گروه‌ها دیده می‌شود. از نکات قابل توجه نمودارهای فوق کاهش شدید و معنی‌دار حجم تومور در گروه‌های آزمون نسبت به گروه‌های شاهد است ($p < 0/001$). اما در عین حال میزان کاهش در بین دو گروه آزمون ۳ و ۴ معنی‌دار نیست ($p > 0/05$). در نمودار ۲ تغییرات حجم تومور تا فاصله ۴۰ روز بعد از درمان (با توجه به شروع گسترده مرگ بعد از ۴۰ روز خصوصاً در گروه‌های شاهد و اثر آن روی تغییرات حجم تومور نمودار تا این زمان نشان داده شده است) دیده می‌شود. در حالی که تومورها در گروه‌های ۱ و ۲ به ترتیب با زمان دو برابر شدن (DT: Doubling Time) $6/1 \pm 3/9$ و $5/9 \pm 2/9$ روز رشد سریع داشته‌اند، الکترولیز به طور کاملاً معنی‌داری توانست، رشد آن‌ها را در گروه‌های آزمون کنترل کند و به تاخیر بیندازد ($p=0/000$).



نمودار ۲: تغییرات حجم تومور (Mean±SD) در فاصله ۷۲ ساعت قبل و بعد از درمان

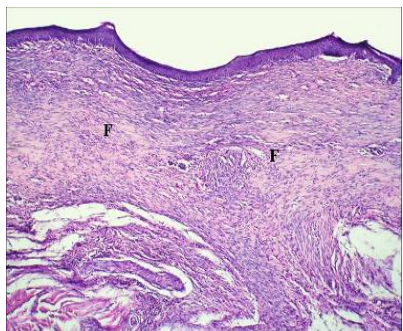


نمودار ۳: تغییرات حجم تومور (mean±SE) در فاصله ۱۴۰ روز بعد از درمان

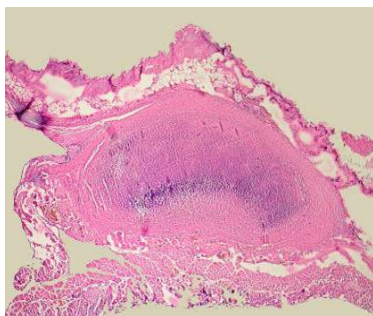


شکل ۴: یک رگ ترومبوزه ، در مجاور یک تومور از بین رفته ؛ رنگ آمیزی H/E؛ بزرگ نمایی ۲۰۰ برابر .

حیوانات خوب شده بعد از ۱۵۰ روز، در حالی که سالم و سرحال و دارای وزن طبیعی 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 بود (شکل ۵).



شکل ۵ : جایگزینی بافت همبند فیبروز ترمیمی (F) به جای یک تومور کاملاً از بین رفته ، در ضفامت درم و هیپودرم ؛ (رنگ آمیزی H/E ، بزرگ نمایی ۲۰۰ برابر در جدول ۱ میانگین درصد نکروز در نکروز در فاصله ۵ روز بعد از درمان در گروه- های مختلف نشان داده شده است. بررسی نتایج نشان می‌دهد که میانگین نکروز در فاصله ۵ روز بعد از درمان در گروه ۳ و ۴ به طور معنی داری نسبت به گروه‌های شاهد بیشتر بوده است ($p=0/029$). در مقایسه بین دو گروه آزمون دیده شد هر چند میانگین نکروز در گروه ۴ بیشتر بود و پاسخ کامل بیشتری نیز در این گروه ثبت شد، اما تفاوت معنی دار نبود. در بررسی آسیب- شناسی تعدادی از مدل‌های توموری درمان شده در فاصله ۵ روز بعد از درمان در تمام آنها درصد نکروز بالا و حتی بعضاً نابودی کامل مشاهده شد (شکل ۶) و (نمودار ۱). هم‌چنین در بررسی دیگر ارگان‌های حیاتی (کبد، کلیه، ریه، لوله گوارش) شواهد متاستاز مشاهده نگردید.

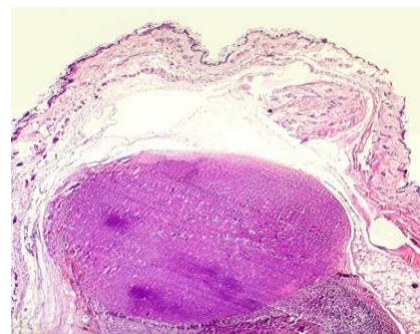


شکل ۶: یک ندول توموری کاملاً نکروزه ؛ (رنگ آمیزی H/E ، بزرگ نمایی ۴۰ برابر

مرگ در گروه ۴ (۹۴ روز بعد از درمان) در حیوانات درمان شده، دیده شد که با بررسی آسیب‌شناسی علت آن مشخص نشد. این حیوانات دچار کاهش وزن محسوس شده بودند.

نتایج بررسی‌های آسیب‌شناسی

بررسی میکروسکوپی: در بررسی میکروسکوپی اسلایدهای بافتی تهیه شده، تومورها متشکل از سلول‌های با هسته‌های کروی، بیضوی، یا دوکی شکل با سیتوپلاسم کم تا متوسط به رنگ صورتی تا ارغوانی (اسیدوفیل) و هسته‌های پروکروماتین و بازوفیل و برخی دارای هستک مشخص بودند. سلول‌ها فاقد آرایش بافتی مشخص بوده گاه نمای نواری متقاطع کوتاه و نامنظم داشته، هیچ‌گونه تمایز مشخص سلولی و بافتی در آنها مشاهده نگردید (شکل ۱-ب). شکل ۳ نمای یک ندول تومور ایجاد شده در ناحیه هیپودرم، با حدود مشخص بدون نکروز را نشان می‌دهد.



شکل ۳: یک ندول تومورال ایجاد شده در ناحیه هیپودرم ، با حدود مشخص بدون نکروز ؛ رنگ آمیزی H/E ، بزرگ نمایی ۴۰ برابر

یافته‌های آسیب‌شناسی نمونه‌های درمان شده: نکروز ایجاد شده در تومورها از نوع نکروز انعقادی بود که مراحل مختلفی از این نکروز از مراحل ابتدایی تا مرحله انتهایی ترمیم محل نکروز مشاهده گردید. اگر چه در بسیاری موارد نکروز در مرکز تومورها با گسترش به اطراف مشاهده می‌گردید 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 هسته‌ای بروز یافته بود. گاهی نیز در اطراف محل نکروز هجوم یاخته‌های سفید مشاهده می‌شد که در برخی موارد همراه با ایجاد نکروز میعانی در تومور ناشی از عمل آنزیمی، یاخته‌های 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 پادگن- های تومور بود مشاهده گردید. هم‌چنین با توجه به مشاهده نوتروفیل‌ها در نواحی اطراف تومور شواهدی از تحریک سیستم ایمنی توسط الکترولیز وجود دارد.

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 می‌تواند در ایجاد نکروز در تومور مؤثر بوده باشد (شکل ۴).

کردند.^{۶،۱۰،۲۴،۲۵} Berry و همکارانش با بررسی الکترولیز روی کبد خوک اعلام کردند بین نکروز ایجاد شده و دوز اعمالی رابطه خطی وجود دارد.^{۲۶} Chou اثر افزایش دوز بر افزایش معنی دار پاسخ کامل و بقا را در موش Balb/c تأیید کرد.^{۲۱} در این مطالعه حضور نوتروفیل‌ها در ناحیه درمان، مشاهده شد که فرضیه تحریک سیستم ایمنی توسط الکترولیز را تأیید می‌کند. تعدادی از محققان نظیر Nordenstron و Xin مشارکت سیستم ایمنی در نابودی تومور را مورد تأیید قرار داده‌اند.^{۹،۲۷} Ciria معتقد است در اثر نکروز ایجاد شده به وسیله الکترولیز، سیستم ایمنی تحریک شده و لکوسیت‌ها (از جمله نوتروفیل) را به ناحیه درمان گسیل می‌کند و این ذرات با ایجاد التهاب حاد موضعی به روند نابودی تومور کمک می‌کنند.^۹

در بررسی آسیب‌شناسی ترومبوز مویرگ‌های تومور و حاشیه از آن، در فاصله ۵ روز از درمان دیده شد (شکل ۴). این عامل می‌تواند از سندرم SIRS جلوگیری کند و یکی از دلایل صحت و سلامت کامل حیوانات درمان شده و مرگ و میر بسیار محدود آن‌ها در طول ۱۵۰ روز بعد از درمان باشد. Wemyss و همکاران معتقدند در هنگام ایجاد حجم زیادی از نکروز، انتشار ذرات حاصل از نکروز در خون می‌تواند باعث افزایش زیاد سایتوکاین‌ها و سندرم SIRS شود. حین الکترولیز، ترومبوز مویرگ‌های تومور و حاشیه باریکی از اطراف آن، از انتشار ذرات حاصل از نکروز در گردش خون و متعاقب آن، پاسخ التهابی سیستمیک جلوگیری می‌کند.^{۲۸}

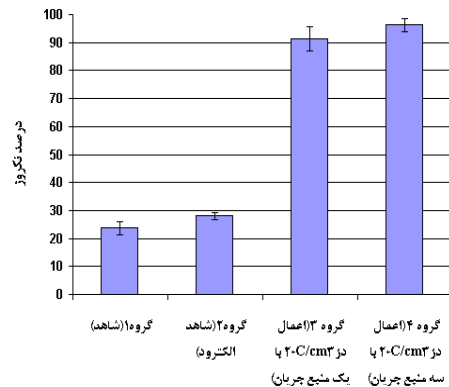
در مجموع نتایج کسب شده در این مطالعه و بررسی مقالات، بیانگر آن است که الکترولیز بسیاری از شرایط و ویژگی‌هایی را که یک تکنیک در زمینه درمان یا کنترل سرطان باید داشته باشد را داراست. به نظر می‌رسد، هزینه‌های کم درمان، ایمنی، عوارض جانبی محدود و بازده بالا در کنار ویژگی‌هایی از جمله سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته باعث خواهد شد که در آینده، نقش به‌سزایی در درمان سرطان ایفا کند و به عنوان یک روش مکمل در کنار روش‌هایی از جمله جراحی و پرتودرمانی عامل افزایش بازده درمان و بقا در بیماران گردد. شاید بزرگ‌ترین معضل این روش زمان طولانی درمان باشد. به نظر می‌رسد، این مشکل با کنترل و بهینه‌سازی پارامترهایی از جمله آرایش الکترودی، نحوه توزیع دوز، پلاریته و تعداد مناسب الکتروود و حتی به کارگیری تکنیک‌های دیگر از جمله هایپرترمیا به طور هم‌زمان قابل تعدیل باشد.^{۲۹}

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقایان دکتر محمد حسین بحرینی طوسی، دکتر علیرضا خویی و مهندس شهرام بیانی که انجام این پژوهش بدون همکاری و تشویق این بزرگواران میسر نبود، صمیمانه تشکر می‌نمائیم. این مقاله برگرفته از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد به شماره ۸۵۲۶۸ می‌باشد.

References

1. Garcea G, Lloyd TD, Aylott C, et al. The emergent role of focal liver ablation techniques in the treatment of primary and secondary liver tumours.



نمودار ۱: میانگین نکروز (means ± SD) ثبت شده در گروه‌های مختلف

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد همانند دیگر روش‌های فیزیکی درمان سرطان نظیر پرتودرمانی، جهت درمان موفقیت آمیز تومورها با استفاده از الکترولیز، توزیع یکنواخت دوز فاکتور موثر می‌باشد. در هنگام الکترولیز با یک منبع جریان، الکتروودها با هم موازی هستند و چون مقاومت که در پیش روی هر جفت الکتروود آند و کاتد است، متفاوت می‌باشد بنابراین جریان عبوری از آن‌ها یکسان نیست و در نتیجه ناحیه زیر پوشش هر جفت الکتروود دوز یکسانی دریافت نمی‌کند. با استفاده از سه منبع جریان، هر جفت الکتروود به یک منبع جریان متصل می‌شوند و بنابراین هر کدام، جریان ۱/۶۶ mA (در مجموع ۵mA) را بدون این که مقدار مقاومت الکتریکی که در پیش رو دارند تأثیری داشته باشد، اعمال می‌کردند و پاسخ کامل و هم‌چنین درصد نکروز بیشتر در گروه ۴ نسبت به گروه ۳ نشان داد که این راه کار باعث توزیع یکنواخت‌تر دوز و در نتیجه احتمال نابودی کامل بیشتر تومور شده است. با توجه به نتایج کسب شده به نظر می‌رسد نحوه توزیع دوز نیز علاوه بر پارامترهای دیگر، از جمله مقدار دوز اعمالی و آرایش الکتروودها که در مطالعات دیگر به آن اشاره شده است، می‌تواند بر بازده درمان تأثیرگذار باشد.^{۹،۱۳} به نظر می‌رسد افزایش تعداد منابع جریان در کنار چیدمان مناسب الکتروودها، بتواند به توزیع یکنواخت‌تر دوز در تومور کمک کند و می‌توان از آن جهت نابودی کامل تومور در زمان و دوز اعمالی کمتر استفاده کرد. زیرا وقتی که توزیع دوز یکسان نباشد ناخداگاه دوز اعمالی و زمان درمان جهت اطمینان از نابودی همه جای تومور زیاد می‌شود که این خود خطراتی از جمله سندرم تومور لیز که در شیمی درمانی نیز ممکن است اتفاق افتد، را به همراه دارد. این سندرم که به دلیل عدم تعادل الکتروولت‌های خون صورت می‌گیرد، می‌تواند منجر به مرگ شود.^{۲۴} کاهش معنی دار حجم و نابودی حداقل ۸۰ درصد حجم تومور در گروه‌های آزمون مشاهده گردید. این نتیجه نشان می‌دهد که الکترولیز دارای اثرات ضد توموری است و پتانسیل بالایی برای نابودی و کنترل تومورهای سرطانی دارد. محققانی چون Schaefer و Samuelsson نیز اثر افزایش دوز بر ازدیاد نکروز را گزارش

Eur J Cancer 2003; 39(15):2150-64.

2. Royal Australasian college of surgeons. NET-S procedure brief summary electrolytic ablation of

- tumours. Procedure Brief. 2002 Sep. Available from http://www.racs.edu.au/media/7467/Electrolytic_Ablation. Accessed September 11, 2010.
3. Wemyss-Holden SA, Robertson GS, Dennison AR, et al. A new treatment for unresectable liver tumours: Long-term studies of electrolytic lesions in the pig liver. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98(5):561-7.
 4. Yamamoto H, Nagino M, Kamiya J, et al. Surgical treatment for colorectal liver metastases involving the paracaval portion of the caudate lobe. *Surgery* 2005; 137(1):26-32.
 5. Schaefer N, Schaefer H, Maintz D, et al. Efficacy of direct electrical current therapy and laser-induced interstitial thermotherapy in local treatment of hepatic colorectal metastases: An experimental model in the rat. *J Surg Res*. 2008; 146(2):230-40.
 6. Berry D, Garcea G, Chong C, et al. Systematic reaction to electrolytic treatment of pig livers in vivo. *ANZ J Surg*. 2004; 74(7):586-90.
 7. Morrison CP, Teague BD, Court FG, et al. Experimental studies of serum cytokine concentration following pancreatic electrolytic ablation. *Med Sci Monit* 2003; 9(1):BR43-6.
 8. Metcalfe MS, Mullin EJ, Texler M, et al. The safety and efficacy of radiofrequency and electrolytic ablation created adjacent to large hepatic veins in a porcine model. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(5):662-7.
 9. Ciria HC, Quevedo MS, Cabrales LB, et al. Antitumor effectiveness of different amounts of electrical charge in Ehrlich and fibrosarcoma Sa-37 tumors. *BMC Cancer* 2004; 4:87.
 10. von Euler H, Nilsson E, Olsson JM and 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; 54(2):117-24.
 11. Nilsson E, von Euler H, Berendson J, et al. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry* 2000; 51(1):1-11.
 12. von Euler H, Strahle K, Thorne A and Yongqing G. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EchT). *Bioelectrochemistry* 2004; 62(1):57-65.
 13. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Berry DP and Maddern GJ. Local ablation for unresectable liver tumours: is thermal best? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11(2):97-106.
 14. Samuelsson L, Jonsson L, Lamm IL, et al. Electrolysis with different electrode materials and combined with irradiation for treatment of experimental rat tumours. *Acta Radiol* 1991; 32(2):178-81.
 15. Turler A, Schaefer H, Schaefer N, et al. Experimental low-level direct current therapy in liver metastases: Influence of polarity and current dose. *Bioelectromagnetics* 2000; 21(5):395-401.
 16. Baxter PS, Wemyss-Holden SA, Dennison AR and Maddern GJ. Electrochemically induced hepatic necrosis: The next step forward in patients with unresectable liver tumours? *Aust N Z J Surg* 1998; 68(9):637-40.
 17. Li K, Xin Y, Gu Y, et al. Effects of direct current on dog liver: Possible mechanisms for tumor electrochemical treatment. *Bioelectromagnetics* 1997; 18(1):2-7.
 18. Nordenstrom BE. Survey of mechanisms in nordenstrom treatment (ECT) of cancer. *Eur J Surg Suppl* 1994; (574):93-109.
 19. Samuelsson L, Jonsson L. Electrolytic destruction of tissue in the normal lung of the pig. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1981; 22(1):9-14.
 20. Blank M, Lavie G, Mandel M and Keisari A. Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncol Res* 2001; 12(9-10): 409-18.
 21. Chou CK, McDougall JA, Ahn C, Vora N. Electrochemical treatment of mouse and rat fibrosarcomas with direct current. *Bioelectromagnetics* 1997; 18(1):14-24.
 22. von Euler H, Nilsson E, Olsson JM and 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; 54(2):117-24.
 23. Vijn AK. Electrochemical field effects in biological materials: Electro-osmotic dewatering of cancerous tissue as the mechanistic proposal for the electrochemical treatment of tumors. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10(7):419-23.
 24. Griffin DT, Dodd NJ, Moore JV, et al. The effects of low-level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: Tumour regression and systemic biochemical sequelae. *Br J Cancer* 1994; 69(5):875-8.
 25. Samuelsson L, Olin T, Berg NO. Electrolytic destruction of lung tissue in the rabbit. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1980; 21(4):447-54.
 26. Berry DP, Garcea G, Vanderzon P, et al. Augmenting the ablative effect of liver electrolysis: using two electrodes and the pringle maneuver. *J Invest Surg* 2004; 17(2):105-12.
 27. Xin YL. Advances in the treatment of malignant tumours by electrochemical therapy (ECT). *Eur J Surg Suppl* 1994; (574):31-5.
 28. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Finch GJ, et al. Electrolytic ablation as an adjunct to liver resection: Experimental studies of predictability and safety. *Br J Surg* 2002; 89(5):579-85.
 29. 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; 7(8):654-9.

Treatment of the colon carcinoma tumors by electrolysis: The effect of dose distribution

Mahdi Shirin-Shandiz,¹ Amene Sazgarnia²

Background: Electrolysis therapy is a new and effective physical method for treating localized cancer which is used to DC electrical effects, including extreme changes in pH, toxic substances produced and electric field effects, to destroy tumor. In this study, the effect of electrolysis and the efficiency of dose distribution have studied in the treatment of colon carcinoma tumor model in Balb/c mice.

Materials and method: Colon carcinoma tumors were induced in 60 animals by subcutaneous injection of CT26 cells in right side of Balb/c mice. As the tumor size reached $340 \pm 30 \text{ mm}^3$, the animals were categorized randomly into four groups (20 mice in two control groups 1 and 2 and 40 mice in two treatment groups 3 and 4). One current supply was used in group 3 while in group 4 we applied three current supplies. In both treatment groups 3 and 4, 20 C/cm^3 dose was applied through six electrodes. In addition, pathological study was performed to confirm the treatment effects. Also daily measurements of tumor size and animal mortality were recorded.

Results: While in the control group, tumors quickly grow without even one regression case, in two treatment groups, tumor growth delayed significantly and sometimes complete destruction of the tumor was recorded (in group 3, 40% and group 4, 60%) Which had increased significantly compared to control group (in group 3, $p=0.029$ and group 4, $p=0.002$). Also, the fraction of cumulative survival in the treatment group increased so that increased survival in group 4 than the control groups was quite significant ($p=0.02$).

Conclusion: Observations indicate antitumor effects and high potential of electrolysis in destruction of tumors that it is increased with more current supply and more electrodes in other to more dose distribution. Also, very few side effects and observation of just one death case and healthy animals up to 150 days after treatment indicates safety of this method.

Keywords: Electrolysis, direct current, dose, colon carcinoma, CT26 cell line

1. MSc of Medical Physics, Zahedan University of Medical Sciences and Health services, Zahedan, Iran
2. Assistant Professor of Medical Physics, Research Center of Medical Physics, Mashhad University of Medical Sciences and Health services, Mashhad, Iran