

تأثیر فرایند الکتروپوریشن بر الکتروتراوایی

مطالعه کمی تأثیر فرایند الکتروپوریشن بر الکتروتراوایی و بقاء سلولی به

روش فلوتوریمتری

آمنه سازگارنیا^{۱*}، سید محمد حسین بحرینی طوسی^۲، مجید ولی زاده^۳، فاطمه همایی^۴، حبیب الله اسماعیلی^۵، اعظم عباسی^۶

۱- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل

۴- استادیار گروه رادیوتراپی و انکولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، بیمارستان امید، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۶- کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۷

چکیده

مقدمه: الکتروپوریشن یکی از شیوه‌هایی است که به منظور انتقال مولکولها از میان غشاء سلولی، مورد بهره‌برداری واقع شده است. استفاده از مولکولهای فلوتورسنت به منظور تعیین میزان تراوایی سلولها پس از اعمال پالسهای الکتریکی یکی از متداولترین شیوه‌های ارزیابی کارایی این تکنیک است. از طرف دیگر روشهای ریاضی می‌تواند به منظور پیش‌بینی چگونگی تأثیر تغییر ویژگیهای پالس بر بازده الکتروتراوایی، امکان به‌کارگیری تکنیک را به منظور ایجاد حداکثر تراوایی و در صورت لزوم حداقل مرگ سلولی فراهم آورد.

مواد و روشها: پس از کشت و تکثیر رده سلولی ام سی اف ۷^۱ مشتق شده از تومورهای آدنوکارسینوما پستان انسانی، جهت پایش نتایج الکتروتراوایی و بقاء سلولی از روش فلوتوریمتری و ماده فلوتورسنت یدید پروپیدیوم استفاده گردید. بعد از مجاورت یدید پروپیدیوم با سلولها و نفوذ این ماده به داخل سلول تحت تأثیر پالسهای الکتریکی، غشاء سلولها تخریب و مولکولهای فلوتورسنت مذکور آزاد و سیگنال فلوتورسانس ناشی یدید پروپیدیوم به روش فلوتوریمتری ارزیابی گردید. سیگنال ناشی سلولهای مرده نیز در نمونه‌های سلولی با درصد بقاء متفاوت تعیین و منحنی استاندارد آن بر حسب درصد بقای سلولها ترسیم و بر اساس آن، سیگنال ناشی سلولهای زنده تراوا شده پیش‌بینی گشت. همچنین تراوایی و بقای سلولی در ۶ دز الکتریکی بلافاصله و پس از ۷۲ ساعت تعیین و داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: طول موج‌های حداکثر شدت تحریک و نشر فلوتورسانس محلول یدید پروپیدیوم بترتیب ۵۴۰ و ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. بیشترین سیگنال تراوایی و کمترین میانگین درصد بقاء سلولی به ترتیب در پالس‌های الکتریکی ۱۵۰۰ ولت در زمان ۲۵ میکروثانیه و ۸۰۰ ولت در زمان ۵۰ میکروثانیه ثبت شد. میزان مرگ سلولی بلافاصله پس از اعمال پالس، کمتر از نتیجه به دست آمده ۷۲ ساعت بعد از آن بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری: پیش‌بینی می‌شود افزایش قدرت پالس‌ها یا پهنای زمانی آنها بتواند موجب افزایش الکتروتراوایی سلولها شود، مگر آنکه موجب تخریب و مرگ سلول گردد. یک رابطه ریاضی بین سطح سیگنال الکتروتراوایی، بر حسب قدرت و پهنای زمانی پالس و درصد بقای سلولی بدست آمد که در آن تراوایی با توان دوم پهنای زمانی پالس و توان اول قدرت آن نسبت مستقیم دارد. به نظر می‌رسد با افزایش قدرت و پهنای زمانی پالس فرایندهایی فعال می‌شود که علاوه بر مرگ فوری سلول، مانع از تکثیر و یا ترمیم سلول پس از صدمات پالس می‌گردند. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱۴ و ۱۵، بهار و تابستان ۸۶: ۳۳-۴۱)

واژگان کلیدی: الکتروپوریشن، رده سلولی ام سی اف ۷، الکتروتراوایی، پالس الکتریکی، فلوتوریمتری

* نویسنده مسؤول: آمنه سازگارنیا

۱- مقدمه

هدف شیمی درمانی عبارت است از به دست آوردن سمیت انتخابی بر علیه سلولهای بدخیم تومور و حفظ سلولهای طبیعی میزبان. یک درمان موفق بستگی به کاربرد آن مقدار از داروی ضد سرطان دارد، که علاوه بر کشتن سلولهای بدخیم، فرصت ترمیم و ریکاوری را به سلولهای طبیعی در حال رشد و تکثیر بدهد. اعمال راهکارهایی که طی آنها، میزان داروی دریافتی سلولهای سالم، کاهش و میزان ورود دارو به درون سلولهای توموری افزایش یابد، منجر به حفظ سلولهای طبیعی و درعین حال، افزایش بازده شیمی درمانی خواهدگردید[۱]. الکتروپوریشن یکی از شیوه هایی است که به منظور انتقال مولکولها از میان غشاء سلولی، مورد بهره برداری واقع شده است. الکتروتراوایی^۱ حاصل از این پدیده، که الکتروترانسفکشن^۲ یا الکترواینجکشن^۳ نیز نامیده شده است، درمقایسه با سایر روش های انتقال مولکول، از مزایایی چون سادگی و سرعت، بازده انتقال بالاتر، قابلیت تکرارپذیری و بهینه سازی کمیت های الکتریکی، عدم لزوم استفاده از عوامل سمی شیمیایی نظیر پلی اتیلن گلیکول، افزایش میزان برداشت^۴ سلول و بالاخره قابلیت کنترل تعداد و ابعاد منافذ، برخوردار است[۲]. با استفاده از این اثر، می توان ورود داروها را به سلول تسهیل نمود. در صورت بسته شدن منافذ غشاء پس از قطع میدان الکتریکی خارجی، بقای سلول های گیرنده تحریک الکتریکی تضمین خواهد شد. این موضوع که اعمال میدان های الکتریکی به غشاء های زنده^۵ با ایجاد آشفتگی های ساختاری در آن به ورود مولکولهای دی-ان-ا^۶ به داخل سلول کمک می کند، اولین بار توسط نیومن^۷ و پس از او توسط پاتر^۸ و همکارانش

روی سلولهای موش اثبات گردید [۲].

الکتروشیمی درمانی در ۱۹۹۱ توسط مایر^۹ و همکارانش روی سلولهای ملانومای پوست موش [۲] بکار گرفته شد. در ۱۹۹۳، سلفورد^{۱۰} و همکارانش به منظور درمان گلیومای مغز رت و رامیرز^{۱۱} و همکاران نیز در درمان کارسینوم کبد خرگوش از الکتروشیمی درمانی بطور موفقیت آمیزی بهره جستند [۲]. بلهرادک^{۱۲} و همکارانش در ۱۹۹۴ استفاده از پالس های الکتریکی را راهی برای انتقال داروهای چربی دوست به درون سلولها معرفی کردند. در همین سال موارد دیگری نیز از الکتروشیمی درمانی موفق روی سلولهای فیروسارکومای ام-بی-تی^{۱۳} موش، ارائه گردید [۲]. در ۲۰۰۰، سرسا^{۱۴} و همکارانش پاسخ شیمی درمانی با داروی سیس پلاتین را در درمان متاستازهای ملانومای بدخیم پوست با همیاری پالسهای الکتریکی از ۲۲ به ۴۸ درصد رساندند [۳] و در ۲۰۰۳ دنس^{۱۵} و پریست^{۱۶}، با بهره گیری از اثر الکتروپوریشن، ورود تیمولول^{۱۷} به زیر پوست را سه برابر تسریع کردند [۴]. در ۲۰۰۴ ساتکوسکا^{۱۸} و همکارانش، وابستگی تأثیر الکتروشیمی درمانی را به شکل، قدرت و پهنای زمانی پالس بر روی تومورهای ایجاد شده در موش، بررسی و افزایش قدرت و پهنای زمانی پالس، را موجب افزایش بازده الکتروشیمی درمانی دانستند [۵]. کرانک^{۱۹} و همکارانش نیز در ۲۰۰۵ تأثیر الکتروشیمی درمانی بر روی سلولهای سارکومای ال-پی-بی^{۲۰} موش را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند

9- Mier
10 -Salford
11- Ramirez
12- Belehradec
13- MBT-2
14- Sersa
15- Denet
16- Preat
17- Timolol
18- Satkauskas
19- Kranjc
20- LPB

1- Electropemabilization
2- Electrotransfection
3- Electroinjection
4- Uptake
5- Biomembrane
6- DNA
7- Neumann
8- Potter

تأثیر فرایند الکتروپوریشن بر الکتروتراوایی

۲- مواد و روشها

در این مطالعه، بررسی اثر الکتروتراوایی در شرایط برون تنی، بر روی رده سلولی ام سی اف ۷ مشتق شده از تومورهای آدنوکارسینوما پستان انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است. رده سلولی ام سی اف-۷ از بانک سلولی انستیتو پاستور خریداری و درون فلاسک های استریل و در محیط کشت آر پی ام آی - ۱۶۴۰^۲ دارای ۱۰٪ اف سی اس^۳ و آنتی بیوتیک بیوتیک های استروپتومایسین و پنی سیلین، به صورت سوسپانسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ دی اکسید کربن کشت و تکثیر گردید. بعد از دو تا سه روز که سلولها به صورت تک لایه کف فلاسک را می پوشاندند توسط تریپسین-۱-د-ت-آ^۴ از آن کنده، شمارش و در محلول بافر فسفات^۵ با غلظت (۲۰×۱۰^۶) سلول در هر میلی لیتر تهیه می شد. به منظور حفظ بقای سلولها و تداوم منافذ باز شده در غشاء، ۱۰ دقیقه قبل و پس از اعمال پالسهای الکتریکی، سلولها بر روی یخ قرار داده می شدند.

جهت پایش نتایج الکتروتراوایی و بقاء سلولی از روش فلوریمتری استفاده شد. بدین منظور ماده فلوروسنت یدید پروپیدیوم با وزن مولکولی ۶۶۷/۴ گرم بر مول که در شرایط عادی، امکان ورود به سلولهای زنده را نداشته و فقط قادر است از غشاء سلولهای مرده و یا تراوشده عبور نماید، مورد استفاده قرار گرفت. بعد از مجاورت یدید پروپیدیوم با سلولها و نفوذ این ماده به داخل سلول تحت تاثیر پالسهای الکتریکی، از محلول تریپسین با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر با همراهی تکانهای شدید به نمونه به مدت دو ساعت، غشاء سلولها تخریب و مولکول های فلوروسنت مذکور آزاد می شد. لذا ابتدا طیف های

الکتروپوریشن سلولها در شرایط برون تنی باعث افزایش تأثیر بلئومایسین به میزان یک و نیم برابر می شود [۶]. بر اساس یکی از آخرین مطالعات کلینیکی انجام شده بر روی ملانوما و ندولهای توموری جلدی و زیرجلدی، الکتروشیمی درمانی توانسته است در این بیماران بترتیب ۷۵ درصد پاسخ کامل و ۱۰ درصد پاسخ جزئی ببار آورد [۷].

در حال حاضر شرایط پالسهای الکتریکی به منظور ورود دی-ان-ا^۱ به داخل سلولهای حیوانی، گیاهی، قارچها و انواع باکتریها و همچنین ورود داروهای شیمی درمانی به داخل سلولهای بدخیم [۲]، بر اساس مطالعات تجربی موجود انتخاب می گردد. روشهای ریاضی می تواند به منظور پیش بینی چگونگی تاثیر تغییر ویژگیهای پالس بر بازده الکتروتراوایی، امکان به کارگیری تکنیک را به منظور ایجاد حداکثر تراوایی و در مواردی که هدف حفظ بقای سلول باشد، با حداقل مرگ سلولی فراهم آورده، انجام مطالعات الکتروترانسفکشن و الکتروشیمی درمانی را آسان تر نماید. مطالعه حاضر اقدام به یافتن رابطه ای مناسب برای تعیین شرایط مطلوب پالسهای الکتریکی جهت ورود ملکولهای دارویی مورد استفاده در شیمی درمانی آدنوکارسینوما پستان نموده است. این روش می تواند در کمک به مدلسازی در راستای انتخاب شرایط بهینه پالسهای الکتریکی، به منظور افزایش کارایی شیمی درمانی و کاستن دز داروی تجویزی به بیمار و در نتیجه کاهش عوارض جانبی درمان بر روی بافتهای سالم مفید واقع شده و جایگزین روشهای سعی و خطا جهت دستیابی به بازده مناسبتر در شیمی درمانی گردد. همچنین به حفظ سلولها به دلیل صرفا صدمات ناشی از پالس، با انتخاب مناسب شرایط پالس نیز توجه شود.

2- RPMI-1640
3- FCS
4- EDTA
5- PBS

1- DNA

نشری و تحریکی یدید پروپیدیوم در حضور تریپسین، به روش فلوئوریمتری ارزیابی بدست آمد.

لازم به ذکر است که یدید پروپیدیوم هم در سلولهای زنده تراوشده در اثر اعمال پالس و هم در سلولهای مرده، وارد می شود و می توان سیگنال فلوئورسانس آن را برای تعیین این دو دسته از سلولها به کار گرفت [۲]. با توجه به این امر و نیاز به روشی که طی آن، سیگنال نشری فلوئورسانس دو دسته سلول مذکور نیز از یکدیگر متمایز شود، سیگنال نشری فلوئورسانس این ماده در نمونه های سلولی که درصد بقاء متفاوتی داشتند و به روش تریپان-بلو درصد بقاء سلولی آنها تعیین شده بود، بدون اعمال پالس الکتریکی، بدست آمد. بدین ترتیب سیگنال نشری حاصل از سلولهای مرده در نمونه های سلولی که قبلاً درصد بقاء آنها تعیین شده بود، مشخص گردید. این نمونه ها به گونه ای آماده شدند که بقاء سلولی آنها به ترتیب ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد تعیین گردیده بود. این مراحل چهار بار تکرار و در نهایت، منحنی درصد بقاء سلولها بر حسب سیگنال فلوئورسانس نشری مورد انتظار رسم شد، تا بتوان بر اساس آن پس از اعمال دز الکتریکی به سلولها در حضور یدید پروپیدیوم، با تعیین درصد بقاء سلولی به روش تریپان-بلو، سیگنال نشری سلولهای زنده تراوشده را پیش بینی نمود. بدین منظور ابتدا دز الکتریکی به هر نمونه سلولی در حضور یدید پروپیدیوم اعمال می شمسد. پس از شستشوی سلولها و حذف یدید پروپیدیوم از محیط سلول، غشا سلولها تخریب، ملکولهای فلوئورسانس داخل سلول آزاد و سیگنال فلوئورسانس نشری تعیین شد. از طرف دیگر با توجه به درصد بقای سلولی پس از اعمال دز الکتریکی و منحنی استاندارد رسم شده در مرحله قبل، سهم سلولهای مرده در ایجاد سیگنال نشری پیش بینی و با تفاضل آن از سطح کل سیگنال بدست آمده، در نهایت سیگنال ناشی از الکتروتراوایی سلولهای زنده برآورد گردید. جایگزینی این روش با

فلوسایتومتری می تواند امکان تعیین بقاء سلولی و درصد سلولهای زنده تراوشده را به راحتی فراهم نماید. با توجه به آنکه در فلوسایتومتری برای تفکیک سهم سیگنال الکتروتراوایی سلولهای زنده از مرده نیاز تعیین درصد سلولهای زنده نیز با بهره گیری از یک ماده فلوئورسانس دیگر (فائورسین دی استات) مطرح می شود، روش پیشنهادی در این تحقیق نیاز اخیر را نیز مرتفع می سازد که با شیوه ساده و کم هزینه تریپان بلو جایگزین شده است. ضمن آنکه در نهایت دستیابی به یک رابطه ریاضی محقق را در پیش بینی بازده تراوایی سایر دزهای الکتریکی از انجام آزمایشات پرهزینه و زمانبر بی نیاز ساخته و جهت تخمین کارایی پالس در الکتروتراوایی، تعیین درصد بقای سلولی پس از اعمال پالس کافی خواهد بود.

در مرحله بعد، هشت پالس الکتریکی با فرکانس یک هرتز ولی قدرت و پهنای زمانی مختلف در نوزده شرایط به سلولها اعمال و سیگنال الکتروتراوایی آنها به روش فلوئوریمتری مطالعه گردید.

تولید و اعمال پالس ها به نمونه های سلولی، توسط یک دستگاه مولد پالس مربعی مدل ای-سی-ام-۸۳۰ ساخت شرکت جیترونیکس در کوتهای استریل یکبارمصرف با قطر حفره ۲ میلی متر که قبلاً بر روی یخ سرد شده بود، انجام می گرفت.

شرایط پالس های اعمال شده در جدول (۱) آمده است. پس از اعمال پالسهای الکتریکی به نمونه ها، به منظور تعیین سهم سیگنال الکتروتراوایی سلولهای زنده، بر اساس مطالعه میکروسکوپیک بقای سلولها به روش تریپان-بلو و منحنی استاندارد بدست آمده از داده های مرحله قبل، سطح سیگنال موردانتظار از سلولهای مرده، تعیین و از کل سیگنال نشری اندازه گیری شده، کسر شد.

جدول ۱- ویژگیهای دز الکتریکی اعمال شده به سلولها در گروههای مختلف مورد مطالعه

جدول ۱- ویژگیهای دز الکتریکی اعمال شده به سلولها در گروههای مختلف مورد مطالعه																			
قدرت پالس (ولت بر سانتیمتر)																			
پهنای زمانی پالس (میکروثانیه)																			
شماره گروه																			
۱۵۰۰	۱۳۰۰	۱۱۰۰	۱۰۰۰	۹۰۰	۸۰۰	۸۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۵۰۰	۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰
۱۹	۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	۱

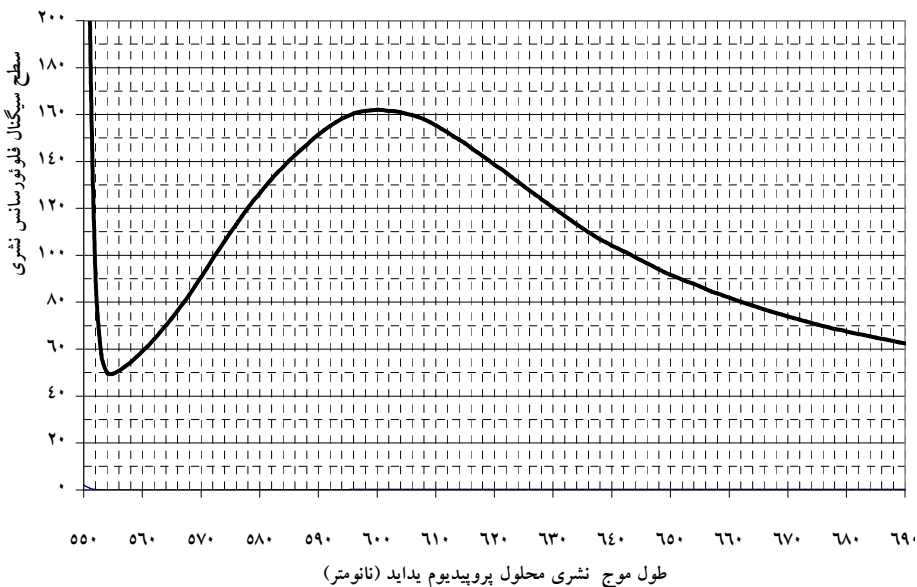
میکروثانیه است، نمایش داده خواهد شد.

۳- نتایج

همانطور که شرح داده شد، در قدم اول، طول موج های مربوط به حداکثر شدت تحریک و نشر فلئورسانس محلول یدید پروپیدیوم به روش فلئوریمتری مورد مطالعه قرار گرفت که بر اساس آن، مناسبترین طول موجهای تحریک و نشر به ترتیب ۵۴۰ و ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. طیف حاصله در منحنی (۱) نشان داده شده است.

همچنین با هدف بررسی تأثیر زمان در فرایند مرگ سلولی، به ازای ۶ دز الکتریکی آزمایشات تکرار و پس از ۷۲ ساعت کشت نمونه ها در پلیتهای استریل ۹۶خانه، مجدداً درصد بقای سلولی تعیین گردید.

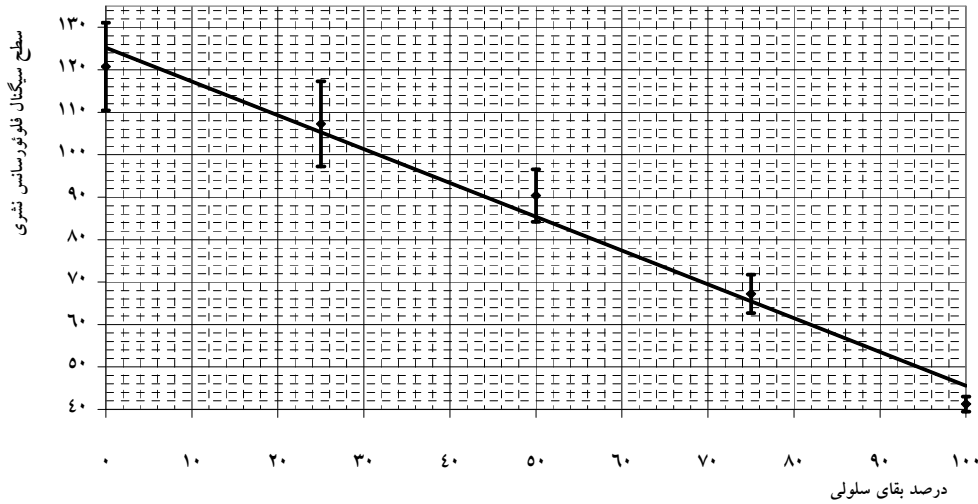
کلید داده ها در مراحل مختلف، با نرم افزار اس پی اس اس ۱۱/۵^۱ و پس از انجام آزمون نرمالیتی بر روی آنها به روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمونهای توکی^۲ و تی^۳ مورد مقایسه قرار گرفتند. در ادامه، به منظور رعایت اختصار، مشخصات پالسهای الکتریکی اعمال شده، در قالب کسری که صورت آن قدرت پالس بر حسب ولت بر سانتیمتر و مخرج پهنای زمانی پالس بر حسب



شکل ۱- طیف فلئورسانس نشری محلول یدید پروپیدیوم با حضور تریپسین در برابر شاهد (طول موج تحریک ۵۴۰ نانومتر انتخاب شده است).

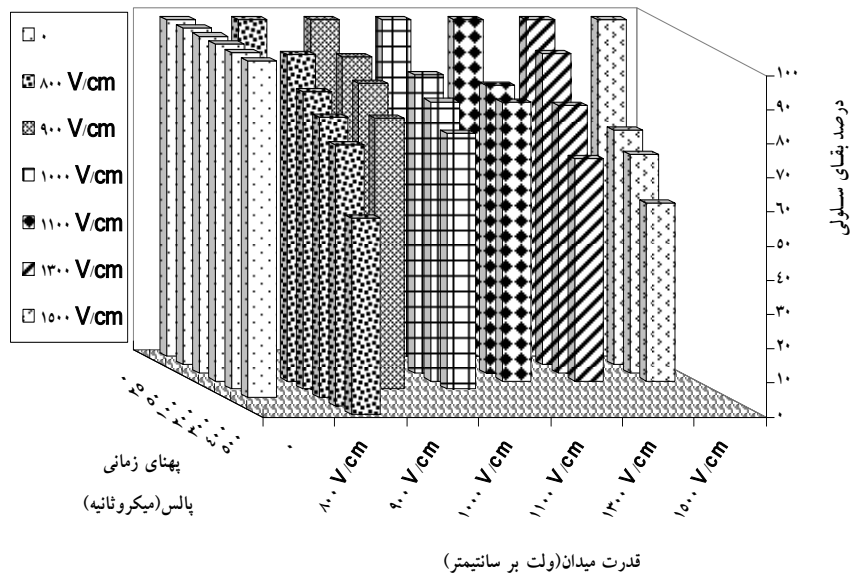
1- SPSS (11.5)
2- Tukey test
3- T-test

- ۳ در دومین مرحله اقدام به تعیین رابطه بین سطح سیگنال
 ۴ فلوئورسانس نشری مورد انتظار در ارزیابیهای فلوئوریمتری بر
 ۵ حسب درصد بقای سلولها به روش تریپان-بلو گردید که
 ۶ حاصل آن در منحنی استاندارد(۲) به چشم می خورد. بدیهی
 ۷ است در این مرحله دز الکتریکی به سلولها اعمال نشده است.



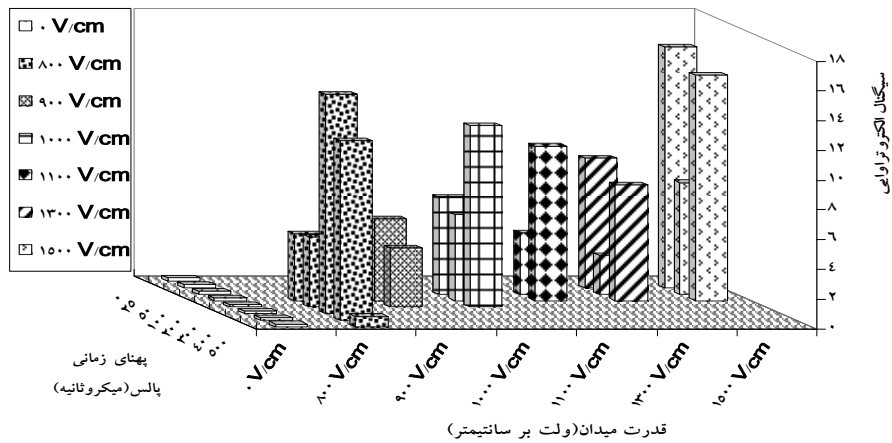
شکل ۲- منحنی استاندارد سطح سیگنال نشری از سلولهای مرده نشاندار شده با یدید پروپیدوم بر حسب درصد بقاء سلولی (داده ها نمایانگر میانگین چهار بار اندازه گیری \pm خطای استاندارد است). سیگنال نشری به روش فلوئوریمتری و درصد بقای سلولی با تریپان بلو تعیین شده است.

و بالاخره نتایج به دست آمده برای تغییرات درصد بقاء سلولی و تغییرات سیگنال الکتروترایابی سلولها بر حسب قدرت و پهنای زمانی نوزده دز الکتریکی، در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.



نمودار ۱- نمودار تغییرات درصد بقاء سلولی بر حسب قدرت و پهنای زمانی پالس (داده ها نمایانگر میانگین چهار بار اندازه گیری است).

تأثیر فرایند الکتروپوریشن بر الکتروتراوایی



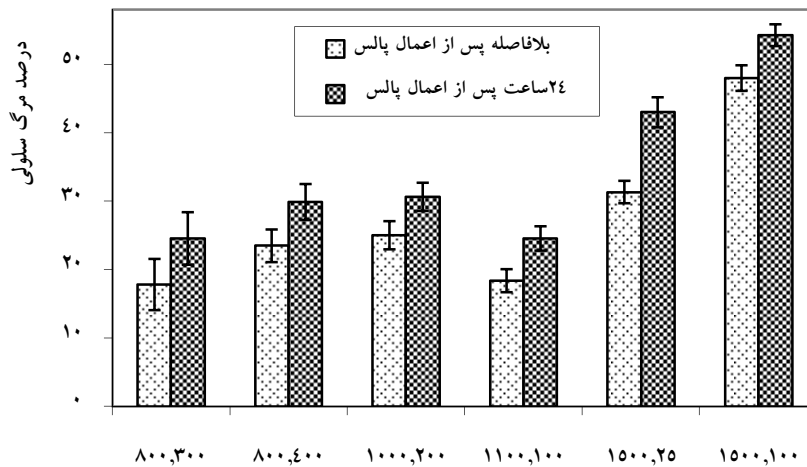
نمودار ۲- نمودار تغییرات سیگنال الکتروتراوایی بر حسب قدرت و پهنای زمانی (داده ها نمایانگر میانگین چهار بار اندازه گیری است).

همانطور که در نمودارهای (۱) و (۲) مشاهده میشود، بیشترین سیگنال تراوایی به ترتیب در پالس های الکتریکی $\frac{1500}{100}$ ، $\frac{1500}{25}$ ، $\frac{1000}{200}$ ، $\frac{800}{400}$ و $\frac{1000}{50}$ ، $\frac{800}{200}$ ، $\frac{1000}{300}$ ، $\frac{800}{500}$ به دست آمده است که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی دار داشته ولی این شرایط با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند. همچنین کمترین میانگین درصد بقاء سلولی به ترتیب در پالس های $\frac{1500}{25}$ ، $\frac{1500}{100}$ ، $\frac{1100}{100}$ ، $\frac{800}{500}$ ثبت شده، که تفاوت آنها نیز در مقایسه با گروه کنترل، معنی دار بوده است.

ضمناً درصد مرگ سلولی بلافاصله و ۷۲ ساعت پس از اعمال پالس، مورد مقایسه قرار گرفت. درصد مرگ سلولی بلافاصله پس از اعمال پالس، به طور متوسط $7/3$ کمتر از نتیجه به دست آمده ۷۲ ساعت پس از اعمال پالس بوده است (نمودار ۳).

بلافاصله پس از اعمال پالس

۲۴ ساعت پس از اعمال پالس



شرایط پالس [پهنای زمانی (میکروثانیه)، قدرت (ولت بر سانتیمتر)]

نمودار ۳- نمودار تغییرات درصد بقاء سلولی بر حسب دز الکتریکی اعمال شده به سلول بلافاصله و ۷۲ ساعت پس از اعمال پالس (داده ها نمایانگر میانگین چهار بار اندازه گیری \pm خطای استاندارد است).

۲۰۰۲ توسط پوکیهار^۱ و همکارانش صورت گرفته است [۸]. در مطالعه مذکور، از سلول دی-سی-۳-اف^۲ مشتق شده از فیروبلاست موش و همچنین ماده فلئورسنت لوسیفیریلو^۳ با وزن مولکولی ۵۲۲ g/mol جهت انجام آزمایشات و پایش نتایج الکتروتراوایی استفاده شده است. نتیجه این مدل سازی در معادله (۲) به چشم می خورد:

$$P = P_{MAX} EXP\left(-\frac{(V_C - V)^2}{2D^2}\right) \quad (2)$$

در رابطه فوق P سیگنال تراوایی، P_{MAX} بیشترین میزان تراوایی، V قدرت پالس های الکتریکی، V_C قدرت پالس الکتریکی زمانی که $P = P_{MAX}$ است و D پهنای زمانی هر پالس می باشد [۸].

با مقایسه معادلات به دست آمده در مطالعه مذکور و این مطالعه، مشاهده می شود در هر دو رابطه، توان دوم پهنای زمانی (D^2) در رابطه تراوایی وارد شده است. پیش بینی می شود دو عامل بیانگر علت تفاوت نتیجه دو مطالعه باشد: اول آنکه ما علاوه بر سیگنال الکتروتراوایی و قدرت و پهنای زمانی پالس الکتریکی، درصد بقاء سلولی را نیز لحاظ کرده ایم و دیگر آنکه نوع و مشخصات سلول می تواند عامل موثری در بروز آثار پالسهای الکتریکی بوده باشد.

با توجه به تفاوت معنی دار مرگ سلولی ۷۲ ساعت پس از اعمال پالس، در مقایسه با مرگ آنی آنها، شاید بتوان پیش بینی نمود که اثر تخریبی پالس های الکتریکی بر سلول علاوه بر مرگ فوری سلول، موجبات مرگ برنامه ریزی شده را نیز فراهم می کند. به عبارت دیگر به نظر می رسد اثر منفی دزهای الکتریکی بر بقای سلولها که با افزایش قدرت و پهنای زمانی پالس مشهودتر می شود، به گونه ای است که ضمن آن

نتایج آنالیز واریانس یکطرفه بر روی این داده ها حاکی از معنی دار بودن دو گروه نسبت به یکدیگر است. اما مقایسه موارد مشابه با آزمون تی، در مورد دزهای الکتریکی

$$\frac{1100}{100}, \frac{1500}{100}, \frac{1500}{25} \text{ معنی دار ثبت شده اند.}$$

۴- بحث

همان طور که از نمودار ۱ مشاهده می شود، می توان نتیجه گرفت که در همه دزهای الکتریکی، با افزایش پهنای زمانی، درصد بقاء سلولی کاهش می یابد. با توجه به افت محسوس و معنی دار درصد بقاء سلولی در پهنای زمانی بالای پالس ها، به نظر می رسد کاهش تراوایی، ناشی از ایجاد منافذ برگشت ناپذیر و نهایتاً پارگی غشاء و مرگ برخی از سلولها باشد. بدین ترتیب افزایش قدرت پالس ها نیز می تواند موجب افزایش الکتروتراوایی سلولها شود، مگر آنکه افزایش قدرت در حدی باشد که موجب تخریب و مرگ سلول گردد.

پس از بررسی های فراوان برای پیدا کردن رابطه ای بین سطح سیگنالهای الکتروتراوایی، درصد بقاء سلولی، پهنای زمانی و قدرت پالسهای الکتریکی، اقدام به تعیین ارتباط ریاضی بین آنها گردید. بدین منظور در محیط اس پی اس اس تلفیق توابع ریاضی گوناگون بر روی داده ها منطبق و ضریب همبستگی آنها ارزیابی گردید. مناسبترین ترکیب با ضریب همبستگی ۰/۸۱ طی معادله (۱) بدست آمده است:

$$P = 25/84 + 0/34[V \times D^2 \times S^{0.12}] - 0/25S \quad (1)$$

در رابطه فوق P سیگنال تراوایی، V قدرت پالس های الکتریکی، D پهنای زمانی هر پالس و S درصد بقاء سلولی بلافاصله پس از اعمال پالس های الکتریکی می باشد.

تنها اقدام انجام شده به منظور مدل سازی رابطه بین سیگنال الکتروتراوایی، پهنای زمانی و قدرت پالس الکتریکی، در سال

1- G. Pucihar
2- DC3F
3- Lucifer Yellow

بیشترین تراوایی و کمترین مرگ سلولی روشهای ریاضی و مدلسازی می تواند راهگشای مناسب و کم هزینه ای باشد. پیش بینی می شود پالس های الکتریکی علاوه بر مرگ فوری سلول، موجبات مرگ برنامه ریزی شده را نیز فراهم کنند.

۵-تشریح و قدردانی

لازم است از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت حمایت مالی و تامین بودجه موردنیاز این تحقیق سپاسگزاری شود.

که مرگ سلولی فوری را رقم می زند، فرایندهایی را فعال می سازد که مانع از تکثیر و یا ترمیم سلول پس از صدمات پالس می گردند. البته برای اطمینان از این نظریه، نیاز به انجام آزمونهای اختصاصی دیگری نیز می باشد.

۴- نتیجه گیری

افزایش پهنای زمانی پالسهای الکتریکی بیش از قدرت آنها در بهبود سطح الکتروتراوایی مؤثرتر بنظر می رسد، البته مادامی که افت بقای سلولی چشمگیر نباشد. در انتخاب قدرت پالسهای الکتریکی و پهنای زمانی آنها به منظور رسیدن به

منابع

1. Smailly B. Anticancer drugs and chemotherapy principals, Tehran, Hadis, 1372.
2. Sazgarnia A. Application of photodynamic therapy in combination with electroporation on fibrosarcoma cells, PhD thesis in Medical Physics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, March 2005.
3. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: the systemic anti tumour effectiveness of cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pulses in the treatment of malignant melanoma skin metastases. *Melanoma Res* 2000; 10(4): 381-385.
4. Denet AR, Preat V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. *J Control Rel.* 2003; 88(2): 253-262.
5. Satkauskas S, Batiuskaite D, Salomskaite DS, Venslauskas MS. Effectiveness of tumor electrochemotherapy as a function of electric pulse strength and duration. *Bioelectrochemistry* 2005; 65(2): 105-111.
6. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, Sentjurc M, Sersa G. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice. *BMC cancer* 2005; 5:115.
7. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumors. *Eur J Surg Oncol.* 2008 Feb;34(2):232-40.
8. Pucihar G, Mir LM, Miklavcic D. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry* 2002 Sep;57(2):167-72.