

ردیابی بی‌درنگ Hypoxia glycolysis در نمونه‌های کونیزاسیون برای تشخیص نئوپلازی در دهانه رحم (CIN)

چکیده

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

زمینه و هدف: اگرچه سرطان دهانه رحم در زنان بالغ با آزمایش‌های تشخیصی زودهنگام، قابلیت درمان و مدیریت بیماری بهتری دارد، اما تشخیص دقیق و سریع هرگونه نشانه‌ای از ضایعات نئوپلازی درون اپی‌تلیالی دهانه رحم و دیسپلازی پرخطر در هر مرحله‌ای بسیار مهم است. اگر هر سلول پیش‌سرطانی/مشکوک غیرطبیعی در فرآیند تشخیصی مرسوم (پاتولوژی) شناسایی نشود، نمی‌توان آن را پیش از تبدیل ضایعه به سرطان دهانه رحم درمان کرد و در نتیجه میزان بقای بیماران را افزایش داد.

روش بررسی: در این مطالعه بالینی که یک مطالعه آزمایشی و غیرتصادفی است، کارایی و دقت تشخیصی حسگر سنجش الکتروشیمیایی متابولیسم گلیکولیز در سلول‌های سرطانی (HEA) بر روی نمونه‌های تازه خارج شده از دهانه رحم ۴۰ بیمار کاندید کونیزاسیون بدلیل سابقه حضور سلول‌های غیرطبیعی در نتایج پاپ اسمیر آنها از تاریخ ۱۳۹۷/۵/۳۱ تا ۱۴۰۳/۳/۳۱، در بخش زنان بیمارستان یاس، دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستان‌های وابسته بررسی شد.

یافته‌ها: دقت آستانه جریان الکتروشیمیایی نه جریانی الکتروشیمیایی ROS/H_2O_2 به‌دست آمده توسط حسگر برای تمایز نواحی سرطانی از غیر آن، بیش از ۹۵٪ بود ($P < 0.0001$) که نشان از رابطه معنادار بین افزایش جریان الکتروشیمیایی و وجود CIN داشت. در این مطالعه، یک طبقه‌بندی تشخیصی بالینی همسان بین نتایج پاتولوژیک بافت‌های آزمایش شده و پاسخ الکتروشیمیایی ROS/H_2O_2 تشخیصی حسگر، براساس طبقه‌بندی CIN پیشنهاد شد. **نتیجه‌گیری:** ارزیابی پاتولوژیکی بیشتر نمونه‌های آزمایش شده نشان داد که شناسایی الکتروشیمیایی متابولیسم گلیکولیز در نمونه‌های کونیزاسیون دهانه رحم توانست ۱۰٪ از ضایعات CIN تشخیص داده نشده توسط پاتولوژی مرسوم را به‌درستی مثبت تشخیص دهد. از این رو به‌عنوان یک روش مکمل، قابلیت کمک به افزایش دقت و سرعت تشخیص ضایعات CIN در مرحله کونیزاسیون دارد.

کلمات کلیدی: سرطان، نئوپلازی دهانه رحم، کونیزاسیون، گلیکولیز، پاسخ الکتروشیمی.

زهره‌السادات میری‌پور^۱، مهسا فرامرزپور^۱، پریسا آقایی^۱، الهام شیرعلی^۲، سهیلا سرمدی^۳، پریسا حسین‌پور^۴، محمد عبدالاحد^{۵*}

۱- آزمایشگاه ادوات نانو بایو الکترونیک، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات الکترونیک سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه آنکولوژی زنان، بیمارستان یاس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- گروه پاتولوژی، بیمارستان یاس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵- آزمایشگاه پاتولوژی سپاس، تهران، ایران.

* انستیتو کانسر، بیمارستان امام‌خمینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تهران، دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر.

تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۴۳۰۷

E-mail: abdoalahad@tums.ac.ir

مقدمه

از HPV، سومین سرطان بدخیم در بین زنان پس از سرطان پستان و کولورکتال در سراسر جهان است، به‌گونه‌ای که سازمان جهانی بهداشت (WHO) تست پاپ‌اسمیر برای تشخیص سریع هر گونه دیسپلازی پرخطر دهانه رحم، به‌ویژه ضایعات نئوپلازی درون

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان رایج در میان بانوان و چهارمین علت مرگ ناشی از سرطان است.^۱ سرطان دهانه رحم ناشی

بافت‌های سالم بوده و اطلاعاتی در مورد سایر موارد هستیولوژی دیده شده در بافت‌های نمونه‌برداری شده، داده نشده است.^{۱۱-۱۳}

با توجه به دقت تشخیصی پایین پاتولوژی متداول و آماده‌سازی زمان‌بر بلوک و لام‌های بسیار جهت ارزیابی کامل این نمونه‌ها، ما از سیستم جدید تشخیص مارجین‌های سرطانی خود برای سرطان پستان به نام پروب تشخیص سرطان (Cancer diagnostic probe, CDP), (SG1, Nano Hesgarsazan Salamat Arya, Iran) که دارای چندین ثبت اختراع آمریکا (US 11,179,076 B2, US 10,786,188 B1, US 11,181,499 B2) و چندین مقاله ISI چاپ شده است، برای بررسی نمونه‌های کونیزاسیون استفاده کردیم.^{۱۴-۱۷} این سیستم جدید مبتنی بر تشخیص بی‌درنگ ROS/H₂O₂ آزاد شده از سلول‌های سرطانی یا آپتی‌کال بر اثر پدیده hypoxia glycolysis در سلول‌های بدخیم/پیش‌بدخیم از طریق پدیده Reverse Warburg و مسیرهای گلیکولیز وابسته به هایپوکسی است.^{۱۸-۲۱} نشان داده شده است که بسیاری از مارکرهای مرتبط با Hypoxia glycolysis مانند CAIX1 و HIF1- α در هنگام تبدیل شدن سلول‌های دهانه رحم سالم به CIN، بیش از حد تولید می‌شوند.^{۲۲} از این‌رو ردیابی الکتروشیمیایی Hypoxia glycolysis توسط حسگر طراحی و ساخته شده بر مبنای سنجش الکتروشیمی ROS/H₂O₂ (HEA) در بافت‌های نمونه‌برداری شده از دهانه رحم، می‌تواند در تشخیص سریع حضور احتمالی CIN موثر باشد. نتایج نشان داد که حسگر الکتروشیمیایی در تشخیص CIN حدود ۹۵٪ دقت دارد. بنابراین این حسگر می‌تواند یک ابزار مکمل مفید برای آگاهی پاتولوژیست از ارزیابی بیشتر نمونه‌های مثبت (تشخیص داده شده توسط حسگر)، برای رسیدن به تشخیص دقیقتر CIN در نمونه‌های بیوپسی باشد.

روش بررسی

طراحی و ساخت حسگر الکتروشیمیایی HEA برای بافت‌های نمونه‌برداری شده از دهانه رحم: این حسگر از یک برد خوانش الکتروشیمیایی اتوماتیک و مجتمع و یک سر پروب یک بار مصرف، به‌عنوان جز اصلی سیستم تشکیل شده است. سر پروب توسط پوشش‌دهی نانولوله‌های کربنی بر روی سروسوزن‌های استیل که تشکیل یک سیستم سه الکتروود متشکله از الکتروود کار (WE)، الکتروود

اپی‌تلیالی دهانه رحم (Cervical intraepithelial neoplasia I-III) را به‌شدت توصیه می‌کند.^{۲۳} غربالگری سرطان دهانه رحم با استفاده از تست پاپ‌اسمیر ضایعات اولیه را تشخیص داده و امکان درمان سریعتر و کمتر تهاجمی‌تر را فراهم می‌کند.^{۲۴} اگر در تست پاپ‌اسمیر هرگونه ناهنجاری، سلول غیرطبیعی (Low/high grade) یا شواهد بدخیمی تشخیص داده شود، به بیمار انجام کولپوسکوپی و یا کونیزاسیون که در آن از قسمت بیرونی دهانه رحم با یک ابزار برش مخصوص مانند لیزر CO₂ یا روش‌های لوپ الکتروسرجیکال نمونه‌برداری شده، توصیه می‌شود.^{۲۵-۲۸} نمونه بافتی (حدود ۳×۲ cm²) برای ارزیابی پاتولوژی فرستاده می‌شود تا هرگونه علائم CIN (I تا III) یا سایر دیسپلازی‌های پرخطر مشخص شود. اگرچه روش رنگ‌آمیزی H&E یک استاندارد معیار تشخیصی است، اما برای رسیدن به یک تشخیص کامل و بدون هرگونه منفی کاذب، باید بلوک‌ها و لام‌های زیادی تهیه شود.^{۲۹} روند زمان بر و کم دقت بررسی حاشیه (Margin)، به‌همراه ۱۰ تا ۳۵٪ منفی کاذب، محدودیت‌های ارزیابی مارجین‌ها توسط پاتولوژی نهایی (Permanent) به حساب می‌آیند.^{۳۰} در مطالعه‌ای بر روی ۷۳۱۰ نمونه کونیزاسیون انجام شده، شایعترین علل خطای پروسه معمول پاتولوژی مواردی مانند خطا در کولپوسکوپی، پسرفت خودبه‌خودی ضایعه، از بین رفتن کامل ضایعات کوچک در حین بیوپسی، خطا در مواد اولیه، آماده‌سازی نمونه، خطای برش و تشخیص بوده است. استفاده از نشانگرهای زیستی ایمونوهیستوشیمی p16 و Ki-67 می‌تواند دقت تشخیص را بهبود بخشیده و در تشخیص‌های افتراقی چالش‌برانگیز کمک کند.

بنابراین به‌دلیل اهمیت تشخیص دقیق و سریع سلول‌های سرطانی در حین نمونه‌برداری، دانشمندان همواره در تلاش برای توسعه روش‌های نوینی جهت تشخیص سریع و دقیق سلول‌های سرطانی هستند. اما درحال حاضر هیچ تکنیکی که در حین نمونه‌برداری بتوان از آن برای تشخیص بافت‌های سرطانی با طبقه‌بندی کامل پاتولوژی تأیید شده در سرطان دهانه رحم استفاده کرد، گزارش نشده است (جدول ۱). در حال حاضر چندین روش تحقیقاتی برای تشخیص سرطان دهانه رحم مانند استفاده از سیستم طیف سنجی امیدانس، طیف‌سنجی نوری و طیف‌سنجی رامان معرفی شده است که به‌طور کلی برای تشخیص نمونه‌های CIN یا Invasive carcinoma از

سرطان پستان است (US 11,179,076 B2, US 10,786,188 B1, US 11,181,499 B2) تحت نظر کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران (IRCT ID: IR.TUMS.VCR.REC.1397.355) و با کد آزمون بالینی IRCT20190904044697N1 انجام گرفت.^{۱۷-۱۴} در این ابتدا نمونه‌های کونیزاسیون توسط جراح همکار طرح، خانم دکتر الهام شیرعلی خارج شده و پیش از فرستادن نمونه برای بررسی پاتولوژی، حداقل سه نقطه از آن نمونه تازه خارج شده از بدن توسط سیستم HEA توسط خانم دکتر زهره السادات میری پور و همکاران ایشان (خانم مهندس مهسا فرامرزی پور و خانم مهندس پریسا آقایی) تست شده و با جوهر مخصوص محل انجام تست علامت زده شد. در ابتدا از طریق ارزیابی پاتولوژی معمول، تشخیص بالینی هر نمونه توسط همکاران پاتولوژیست طرح، خانم دکتر سهیلا سرمندی و خانم دکتر پریسا حسین‌پور اعلام شد. سپس از نواحی علامت زده شده با جوهر نیز لام‌های H&E تهیه و توسط همکاران پاتولوژیست ارزیابی شد. پاسخ‌های جریانی الکتروشیمیایی بدست آمده از حسگر و نتایج پاتولوژی نقاط علامت زده با یکدیگر مقایسه و یک نمودار تشخیصی کالیبره شده بر اساس نتایج حسگر و پاتولوژی CIN ارایه شد.

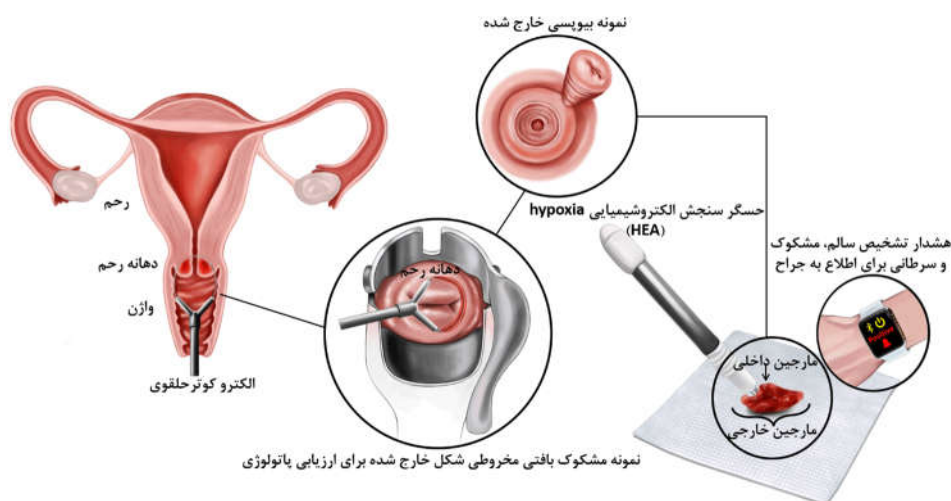
در این نسخه، شکل پروب مجدداً برای تست خارج بدنی نمونه‌های بیوپسی طراحی و اصلاح شد. همچنین، نرم‌افزار و آستانه جریان تشخیصی بر مبنای *Hypoxia glycolysis* در نئوپلازی دهانه رحم مجدداً نوشته شد (شکل ۱). تمام بیماران برای شرکت در مطالعه انجام گرفته در بخش زنان بیمارستان یاس، دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستان‌های وابسته به آن رضایت داشتند.

فرآیند رنگ‌آمیزی با استفاده از هماتوکسیلین-ئوزین: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ئوزین (H&E) معمول‌ترین روش رنگ‌آمیزی در هیستوپاتولوژی است. هماتوکسیلین و ئوزین برای نشان دادن هسته و اجزای سیتوپلاسمی در نمونه‌های بالینی استفاده می‌شوند. بافت‌ها ابتدا در فرمالین فیکس شده، سپس برای ارزیابی پاتولوژی استاندارد (آبگیری، آماده‌سازی بلوک از بافت‌ها، تهیه یک لام لایه نازک از بلوک و رنگ‌آمیزی H&E از اسلایدها) ارسال می‌شوند. هماتوکسیلین، هسته را رنگ آبی روشن می‌کند. استفاده از ئوزین، رنگ صورتی به سیتوپلاسم می‌دهد. پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ئوزین، لام حاوی نمونه باید با آب شسته شود تا

شمارنده (CE) و الکتروود مرجع (RE) با فواصل ۳ mm از یکدیگر را می‌دهد، ساخته شده است.^{۱۷،۱۵} سرپروب‌ها پس از ساخت تحت پروتکل استریل پلاسم (شماره استاندارد: ISO/NP 22444) که هیچگونه اختلالی در مرفولوژی و عملکرد نانو ساختار ایجاد نمی‌کند، استریل شدند. آنها حدود چهار بار درون اسفنج بیولوژیکی وارد شدند تا نانولوله‌های کربنی که اتصال ضعیفی برقرار کرده بودند، پیش از استریل کردن جدا شوند. رهایش مولکول‌های ROS/H₂O₂ حاصل از متابولیسم سلول‌های پیش‌سرطانی/سرطانی یکی از شواهد شکل‌گیری تومور در اثر پدیده‌های Reverse Warburg و Hypoxia glycolysis در این سلول‌ها است.^{۱۹،۲۰} مکانیسم شناسایی HEA براساس تجزیه همزمان مولکول‌های ROS/H₂O₂ آزاد شده و رهایش انتخابی دو الکترون بر نانولوله کربنی پوشش داده شده بر روی الکترودهای سوزنی حسگر است که منجر به ثبت پیک جریان الکتروشیمی در سیستم نمایشگر می‌شود (شکل ۱). در واقع تشخیص براساس رابطه‌ای میان وضعیت‌های پاتولوژی تومور، میزان ROS/H₂O₂ تولید شده در میکرومحیط بافت تومور و میزان جریان پیک الکتروشیمیایی HEA، انجام می‌پذیرد.

در طول این تحقیقات، ما حداقل سه قسمت از بافت تازه بیوپسی شده را با حسگر الکتروشیمیایی فوق تست کرده و با جوهر مخصوص محل انجام تست را علامت زدیم. در ابتدا از طریق ارزیابی پاتولوژی معمول، تشخیص بالینی هر نمونه اعلام شد. سپس از نواحی علامت زده شده با جوهر نیز لام‌های H&E تهیه و توسط پاتولوژیست ارزیابی شد. پاسخ‌های جریانی الکتروشیمیایی بدست آمده از حسگر و نتایج پاتولوژی نقاط علامت زده با یکدیگر مقایسه و یک نمودار تشخیصی کالیبره شده براساس نتایج حسگر و پاتولوژی CIN ارایه شد. معیار بررسی در این مطالعه، ارزیابی نتایج تشخیصی H&E‌های گرفته شده از بررسی‌های معمول بافت و نقاط علامت زده بواسطه تشخیص حسگر بود.

طراحی مطالعه: این پژوهش یک مطالعه آزمایشی و غیرتصادفی بر روی نمونه‌های تازه دهانه رحم تهیه شده از ۴۰ بیمار کاندید کونیزاسیون به دلیل سابقه حضور سلول‌های غیرطبیعی در نتایج پاپ اسمیر آنها از تاریخ ۱۳۹۷/۵/۳۱ تا ۱۴۰۰/۳/۳۱ می‌باشد. تمام آزمایشات برای تشخیص CIN در نمونه‌های بیوپسی دهانه رحم که بر پایه سیستم طراحی شده برای بررسی مارجین‌های سرطانی در



شکل ۱: شمایی از روند استفاده از حسگر الکتروشیمیایی در تشخیص بی‌درنگ بافت مشکوک پس از فرآیند کونیزاسیون برای یافتن سلول‌های پیش‌سرطانی/سرطانی. واکنش‌های الکتروشیمیایی انتخابی ROS/H_2O_2 آزاد شده بر روی نانولوله‌های کربنی باعث ایجاد جریان یونی کاتدی می‌شود. در واقع سلول‌های سرطانی به دلیل Hypoxia glycolysis، ROS/H_2O_2 آزاد کرده که به دلیل متابولیسم متمایز آنها نسبت به سلول‌های سالم است.

Glycolysis از نمونه‌های تازه خارج شده از دهانه رحم تهیه شده از ۴۰ بیمار کاندیدای کونیزاسیون با سابقه حضور سلول‌های غیرطبیعی در نتایج پاپ‌اسمیر آنها توسط حسگر اندازه‌گیری و ثبت شد. بافت‌های تازه دهانه رحم، بلافاصله پس از خارج کردن از بدن (با اندازه آبیگری نشده 6 cm^2) مورد بررسی قرار گرفتند و در هر نمونه حداقل سه نقطه بر روی همه بافت‌ها تست شد و محل تست با جوهر مخصوص علامت‌گذاری گردید. در مرحله بعد، بافت‌ها در فرمالین قرار گرفته و برای ارزیابی پاتولوژی استاندارد (آبیگری، آماده‌سازی بلوک از بافت‌ها، تهیه یک لام لایه نازک از بلوک و رنگ‌آمیزی H&E از اسلایدها) ارسال شدند.

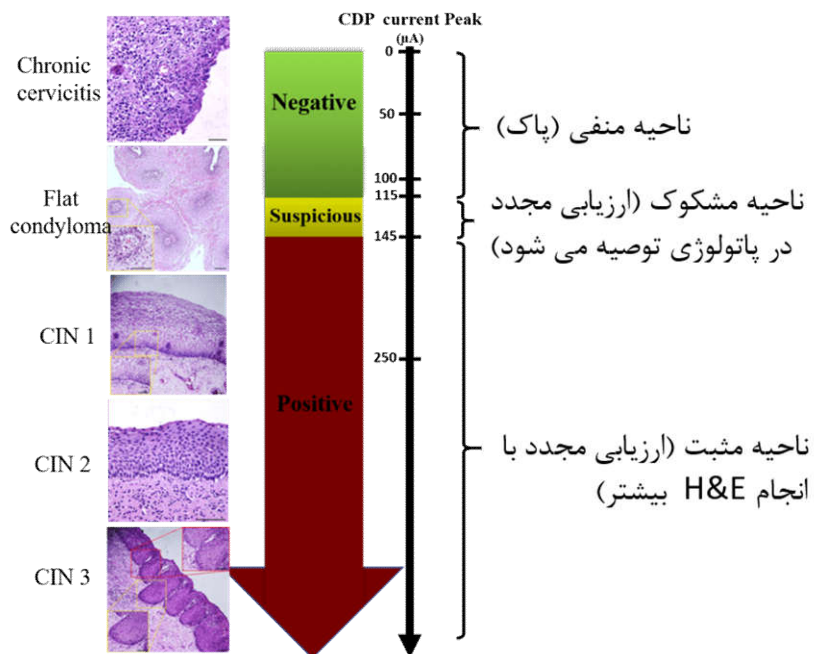
نتایج تشخیصی پاتولوژی پرممنت نمونه‌ها بدون در نظر گرفتن محل‌های علامت‌گذاری شده با جوهر انجام شد. پس از اعلام نتایج پاتولوژی، از بلوک نمونه‌ها مجدداً از روی سطحی که در آن آثار نقاط جوهر (نقاط تست شده با حسگر) مشاهده می‌شد، لام H&E تهیه شد و تشخیص پاتولوژی مجدد برای مناطق علامت خورده اعلام شد و ارزیابی دوم توسط پاتولوژیست به‌عنوان پاسخ حسگر ثبت شد. پس از طبقه‌بندی پیک‌های جریان ثبت شده حسگر از نمونه‌ها و

رنگ‌های اضافه خارج شود. در نهایت برای آبیگری نمونه، باید آن را در غلظت‌های مختلف الکل (۸۰٪، ۹۶٪، ۹۹/۸٪) فرو برده و سپس در زایلن پاکسازی کرد. بدین صورت لام‌های رنگ‌آمیزی شده برای مشاهده با میکروسکوپ نوری جهت ارزیابی پاتولوژیست آماده می‌شوند.

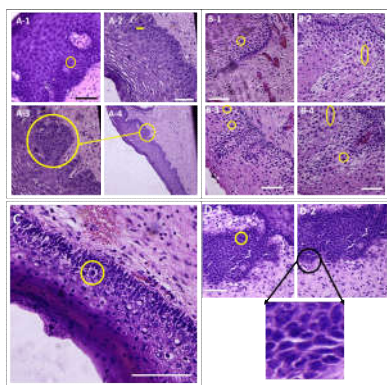
تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey برای اندازه‌گیری‌های مکرر با سطح معناداری ۵٪ ($P < 0.05$) انجام شد. تفاوت پیک‌های جریان الکتتریکی HEA در نواحی منفی نسبت به مثبت بسیار معنادار بود (۹۵٪ CI، $P < 0.0001$) اما بین نواحی منفی و مشکوک چندین قابل‌توجه نبود (NS). تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با Prism (software, version 8.0.1, GraphPad, USA) انجام شده است.

یافته‌ها

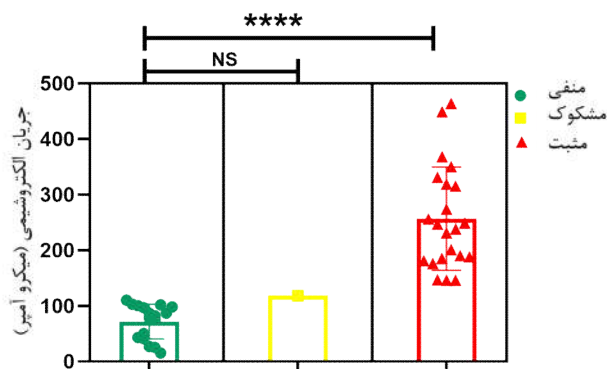
طبقه‌بندی پاسخ‌های جریان الکتروشیمی حسگر در نمونه‌های بیوپسی تازه: جریان‌های الکتروشیمی ROS/H_2O_2 مربوط به Hypoxia



شکل ۲: طبقه‌بندی تشخیصی بالینی میان تشخیص پاتولوژی نمونه‌های بی‌پرسی (شامل CIN I, II, III) با پیک‌های جریان الکتروشیمی حسگر در ۴۰ بیمار کاندید کونیزاسیون. نتایج معناداری میان تشخیص‌های پاتولوژی بر پایه CIN و نتایج حسگر وجود دارد.



شکل ۲: ارزیابی‌های پاتولوژی بیشتر براساس نتایج مثبت حسگر الکتروشیمی HEA- A- (1) بیمار با شماره شناسایی ۱۶، که در ارزیابی پاتولوژی نخست **Chronic cervicitis** تشخیص داده شد در حالی که پیک جریان الکتروشیمی برای آن ۲۰۱ میکروآمپر بود. این بیمار در ارزیابی پاتولوژیست دوم با CIN1 تشخیص داده شد. (B-1) بیمار با شماره شناسایی ۱۴، ابتدا با **Polypoid endocervicitis with flat condyloma** تشخیص داده شد، درحالی‌که نتیجه تشخیصی ثبت شده حسگر مثبت بود (۲۴۹ میکروآمپر). در ارزیابی پاتولوژیست دوم، این بیمار با CIN1 تشخیص داده شد. (C) بیمار با شماره شناسایی ۷، نیز با **Chronic cervicitis** تشخیص داده شد، اما پس از ارزیابی‌های پاتولوژی بیشتر، CIN1 تایید شد (۴۴۹ میکروآمپر). (D1-2) تشخیص نخست بیمار با کد شناسایی ۱۹، **Chronic cervicitis** بود که در ارزیابی پاتولوژیست دوم، CIN1 آن تایید شد.



شکل ۱: تجزیه و تحلیل آماری از پاسخ‌های حسگر منطبق بر پاتولوژی CIN در نمونه‌های کونیزاسیون. H&E permanent دوم استاندارد معیار می‌باشد. تفاوت میان پیک‌های جریان حسگر در نواحی منفی و مثبت بسیار قابل‌توجه است ($P < 0.0001$), اما تفاوت میان نواحی مشکوک و منفی چندان قابل‌توجه نبود (NS). تحلیل‌های آماری با روش تحلیل یک طرفه ANOVA انجام شد. تمام آنالیزهای آماری با برنامه GraphPad Prism V8.0.1 صورت گرفت.

جدول ۱: مشخصات روش‌های تحقیقاتی معرفی شده در مراجع برای تشخیص سرطان دهانه رحم

| تعداد نمونه تست شده | زمان لازم برای اعلام تشخیص | دقت گزارش شده | استاندارد مقایسه (Gold standard) | مکانیسم | روش (مرجع) |
|--|--|--|----------------------------------|---|--|
| ۱۲۳ بیمار از جمله ۶۹ بیمار مشکوک به CIN و ۵۴ بیمار کنترل بدون دیسپلازی دهانه رحم که تحت هیستریکتومی (برداشتن کامل رحم) برای بیماری خوش خیم (غیر CIN) | هر نمونه بافتی سه بار برای بررسی تکرارپذیری و صحت پاسخ، اندازه‌گیری شد و میانگین سه تست به‌عنوان پاسخ نهایی اعلام شد. برای هر تست حدود یک دقیقه زمان لازم است. | Sensitivity ٪۹۴/۳ Specificity ٪۸۴ Accuracy ٪۹۰ | هیستوپاتولوژی | استفاده از پروب چند الکترودی مبتنی بر طیف‌سنجی امپدانس الکتریکی | Tissue Characterization Using an Electrical Bioimpedance Spectroscopy-Based Multi-Electrode Probe to Screen for Cervical Intraepithelial Neoplasia |
| ۶۰۴ بیمار | ۱۲ ثانیه | Sensitivity ٪۹۲ Specificity ٪۵۰ | هیستوپاتولوژی | در این سیستم تشخیصی نوری لیزر نیتروژن فرابنفش ۳۳۷ نانومتری برای القای فلورسانس و دو لامپ فلش زنون با پهنای باند نور سفید برای اندازه‌گیری بازتاب استفاده می‌شود. منابع نوری از طریق یک کابل فیبر نوری به پروب نوری متصل می‌شوند، در محلی که یک سیستم اسکن به‌طور انتخابی دهانه رحم را روشن می‌کند. لامپ‌های فلاش زنون نیز نور سفید را برای دوربین فیلمبرداری داخلی فراهم می‌کنند. از سیستم ویدیویی برای تصویربرداری از دهانه رحم و تنظیم مکان پروب و عکسبرداری استفاده می‌شود. الگوریتم‌های طبقه‌بندی چند متغیره برای پردازش و طبقه‌بندی عکس‌های به‌دست آمده استفاده شده تا تشخیص مبتنی بر پاتولوژی برای بافت دهانه رحم استفاده شد. | Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in vivo: Results of a 604-patient study |
| ۴۰ بیمار | ۱۵ ثانیه | Sensitivity ٪۹۹ / ٪۹۸/۵ Specificity ٪۹۹/۲ / ٪۹۹ for CIN, Invasive carcinoma, respectively. | هیستوپاتولوژی | در این مطالعه بررسی پتانسیل طیف‌سنجی رامان به‌عنوان یک ابزار تشخیصی برای تغییرات بیوشیمیایی متناسب با میزان پیشرفت سرطان دهانه رحم استفاده شده است. طیف رامان از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها برای به‌دست آوردن بینشی در مورد ترکیب بیوشیمیایی سلول‌ها و بافت‌ها استفاده می‌کند. | Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to ¹³ C diagnostic tool |
| ۴۰ بیمار | ۱۵ ثانیه | Sensitivity ٪۱۰۰ Specificity ٪۹۰ Accuracy ٪۹۵ | هیستوپاتولوژی | تشخیص الکتروشیمیایی و بلادرنگ ROS/H ₂ O ₂ آزاد شده از سلول‌های سرطانی یا آپتیکال بر اثر پدیده Hypoxia glycolysis در سلول‌های بدخیم/پیش بدخیم و از طریق پدیده Reverse Warburg | Real-time tracking of hypoxia glycolysis in conization samples for cervical intraepithelial neoplasia detection |

جدول ۲: نتایج تشخیصی حسگر CIN-HEA از بافت‌های بیوپسی شده از ۴۰ بیمار کاندید کونیزاسیون. تشخیص حسگر نیز در مقایسه با نتایج پاتولوژی آورده شده است. مثبت‌های کاذب حسگر با رنگ نارنجی در جدول مشخص شده‌اند.

| کد بیمار | نتیجه پاتولوژی | جریان الکتروشیمی (میکروآمپر) | تشخیص حسگر در مقایسه با نتایج پاتولوژی | کد بیمار | نتیجه پاتولوژی | جریان الکتروشیمی (میکروآمپر) | تشخیص حسگر در مقایسه با نتایج پاتولوژی |
|----------|---|------------------------------|--|----------|------------------------------------|------------------------------|--|
| ۱ | CIN1 | ۱۴۶ | مثبت | ۲۱ | high grade CIN3 | ۲۴۷ | مثبت |
| ۲ | CIN1 | ۴۶۴ | مثبت | ۲۲ | CIN1, multifocal | ۲۳۱ | مثبت |
| ۳ | chronic cervicitis | ۴۱ | منفی | ۲۳ | CIN1 | ۱۱۸ | مثبت |
| ۴ | chronic cervicitis | ۸۲ | منفی | ۲۴ | chronic endocervicitis | ۸۷ | منفی |
| ۵ | flat condyloma, chronic cervicitis | ۹۷ | منفی | ۲۵ | CIN2 | ۱۴۷ | مثبت |
| ۶ | CIN1 | ۱۸۸ | مثبت | ۲۶ | CIN3 | ۳۵۰ | مثبت |
| ۷ | chronic cervicitis with metaplasia and a few goblet cells suggests cervical intraepithelial neoplasia. CIN1 | ۴۴۹ | مثبت | ۲۷ | CIN3 | ۲۷۴ | مثبت |
| ۸ | acute on chronic cervicitis with reactive epithelial change | ۱۸۵ | مثبت کاذب | ۲۸ | acute on chronic cervicitis | ۱۱۰ | منفی |
| ۹ | one residue of CIN 3 | ۳۱۵ | مثبت | ۲۹ | chronic endocervicitis | ۴۳ | منفی |
| ۱۰ | CIN2 | ۲۵۶ | مثبت | ۳۰ | chronic endocervicitis | ۷۹ | منفی |
| ۱۱ | CIN1 | ۱۴۶ | مثبت | ۳۱ | CIN2,3 | ۳۳۸ | مثبت |
| ۱۲ | CIN 3 multifocal | ۳۱۹ | مثبت | ۳۲ | chronic endocervicitis | ۵۰ | منفی |
| ۱۳ | chronic atrophic cervicitis | ۱۰۳ | منفی | ۳۳ | flat condyloma, chronic cervicitis | ۸۷ | منفی |
| ۱۴ | CIN1 | ۲۴۹ | مثبت | ۳۴ | mild cervicitis feature of HPV | ۷۵ | منفی |
| ۱۵ | CIN3 | ۱۷۶ | مثبت | ۳۵ | chronic endocervicitis | ۲۵ | منفی |
| ۱۶ | CIN1 | ۲۰۱ | مثبت | ۳۶ | chronic endocervicitis | ۲۷ | منفی |
| ۱۷ | chronic cervicitis. With features of HPV | ۱۸۱ | مثبت کاذب | ۳۷ | acute on chronic cervicitis | ۱۰۲ | منفی |
| ۱۸ | mild cervicitis feature of HPV. acute on chronic cervicitis | ۱۰۰ | منفی | ۳۸ | CIN2 | ۲۳۸ | مثبت |
| ۱۹ | CIN1 | ۱۹۰ | مثبت | ۳۹ | chronic endocervicitis | ۱۵ | منفی |
| ۲۰ | CIN2,3 | ۳۳۱ | مثبت | ۴۰ | chronic atrophic cervicitis | ۹۸ | منفی |

حسگر و براساس پاسخ‌های جریان آن، یک طبقه‌بندی تشخیصی برای حسگر بر مبنای CIN پیشنهاد شد. کمترین آستانه تشخیص مثبت در نمونه بیوپسی برای پاتولوژیست، وجود Low-grade CINI یا سلول‌های میتوزی سرطانی در لایه‌های بالایی سلول‌های Basal است.^{۳۳} پیک جریان ۱۱۵ میکروآمپر کمترین مقدار ثبت شده برای یک نمونه درگیر بود (شکل ۲). از این‌رو، این مقدار به‌عنوان جریان آستانه برای پاسخ مثبت

مقایسه آنها با تشخیص H&E نمونه‌های علامت‌زده شده، نتایج جالبی به‌دست آمد (شکل ۲). از میان ۴۰ نمونه، ۱۷ نمونه CIN نداشتند که شامل Chronic cervicitis و بافت‌های Benign flat condyloma بودند و همگی پیک جریان الکتروشیمی بین ۱۱۵-۰ میکروآمپر داشتند. ۲۱ نمونه دارای CIN I, II, III با سلول‌های میتوزی سرطانی بودند که همگی پیک‌های جریان بالاتر از ۱۱۵ میکروآمپر را نشان دادند. با در نظر گرفتن گزارشات پاتولوژی نواحی آزمایش شده با

حسگر پیشنهاد شد. نمونه‌هایی که اعداد پیک جریان الکتروشمی آنها بالاتر از ۱۴۵ میکروآمپر بود، درجات بالاتری از CIN را نشان دادند (جدول ۲، شکل ۲). اگرچه تمام نمونه‌های غیر CIN پیک‌های جریانی پایین‌تر از ۱۸۰ میکروآمپر نشان دادند، دو نمونه غیر سرطانی (نمونه با کد شناسایی ۱۷: Chronic cervicitis with features of HPV و نمونه با کد شناسایی ۸: Chronic inflammatory cervicitis) پیک جریانی بالاتر از ۱۸۰ میکروآمپر را نشان دادند و بنابراین به‌عنوان مثبت کاذب تلقی شدند. از این نظر، حسگر الکتروشیمیایی فوق در حدود ۹۵٪ دقت و ۱۰۰٪ حساسیت در تشخیص نمونه‌های کونیزاسیون با مقدار $P < 0.0001$ نشان داد (شکل ۳). از سوی دیگر، نتایج پاتولوژی محل‌های علامت‌زده شده با جوهر (مناطق ثبت شده با حسگر الکتروشیمی) با یافته‌های پاتولوژی اولیه نمونه‌های بیوپسی که مستقل از در نظر گرفتن مناطق آزمایش شده توسط حسگر بودند، مقایسه شدند.

شایان ذکر است که در ارزیابی‌های پاتولوژی اولیه، شش نمونه که منفی تشخیص داده شده بودند، با حسگر الکتروشیمی HEA مثبت ارزیابی شدند و چهار نمونه از این شش نمونه براساس ارزیابی پاتولوژیست دوم که در مناطق تست شده با حسگر انجام شد، مثبت اعلام شدند (شکل ۴). بنابراین براساس ارزیابی‌های نتایج پاتولوژی نمونه‌های تست شده دقت حسگر الکتروشیمیایی HEA، برای کمک به بهبود تشخیص پاتولوژی اولیه ۹۵٪ بود.

بحث

نقش اصلی حسگر HEA در کلینیک، تشخیص ضایعات پیش‌سرطانی و سرطانی است که در یافته‌های پاتولوژی اولیه نمونه‌های بیوپسی، نمی‌توان آنها را تشخیص داد. نتایج حسگر کاملاً منطبق با طبقه‌بندی پاتولوژی نمونه‌های بیوپسی دهانه رحم (CIN) است. همچنین، این حسگر می‌تواند در هنگام کونیزاسیون به تشخیص دقیق و بی‌درنگ در بیماران مشکوک کمک کند. در واقع کاربرد دقیق این دستگاه و تکنیک جدید در آینده، برای تشخیص بی‌درنگ مارجین‌های مثبت در حین انجام کونیزاسیون است که می‌تواند به متخصص زنان در صورت نیاز به برداشتن مجدد بافت (Re-excision) به‌خاطر وجود مارجین مثبت در همان زمان

کونیزاسیون اول کمک کند.

هر بیمار کاندید کونیزاسیون نواحی مشکوک در نتایج کولپوسکوپی/بیوپسی یا پاپ‌اسمیر یا هر را دو دارد و با توجه به نظر اکثر پاتولوژیستان، انجام پاتولوژی فروزن برای نمونه‌های کونیزاسیون از نظر فنی بسیار سخت و زمان‌بر است و حتی ممکن است در صورتی که توسط یک اپراتور و/یا پاتولوژیست غیرمتخصص انجام و/یا آنالیز شود، منجر به نرخ بالای منفی کاذب شود. بنابراین، معمولاً در مراکز بالینی بزرگ و اصلی استفاده می‌شود.

براساس تمام توضیحات ذکر شده، HEA می‌تواند به‌عنوان یک ابزار دقیق و مکمل در کنار پاتولوژی عمل کند تا به متخصص زنان اجازه دهد ضایعه را در صورت نیاز همزمان با انجام کونیزاسیون برداشته و در اثری و زمان لازم برای انجام دقیق‌ترین تشخیص و سریع‌ترین حالت ممکن در درمان صرفه‌جویی کند. برای تشخیص دقیق و سریع سلول‌های سرطانی در حین نمونه‌برداری، در حال حاضر چندین روش تحقیقاتی برای تشخیص سرطان دهانه رحم مانند استفاده از سیستم طیف‌سنجی امپدانس، طیف‌سنجی نوری و طیف‌سنجی رامان معرفی شده است که به‌طور کلی برای تشخیص نمونه‌های CIN یا Carcinoma Invasive از بافت‌های سالم بوده و اطلاعاتی در مورد سایر موارد هیستولوژی دیده شده در بافت‌های نمونه‌برداری شده، داده نشده است (جدول ۱).^{۱۳-۱۴}

به‌طور خلاصه، در این مطالعه نتایج تشخیصی یک سیستم بی‌درنگ برای تشخیص وجود CIN I, II, III و سلول‌های میتوزی سرطانی در طی بیوپسی از دهانه رحم بررسی شد. ما نشان دادیم که ردیابی Hypoxia glycolysis با رویکرد الکتروشیمیایی می‌تواند یک ابزار تشخیصی مکمل برای تشخیص CIN در نمونه‌های کونیزاسیون با منفی کاذب کمتر نسبت به ارزیابی پاتولوژیک معمول باشد.

این روش ضرورت ارزیابی‌های بیشتر پاتولوژی در نمونه‌های با نتیجه مثبت حسگر را نشان داده و قدم بزرگی برای کاهش خطا در تشخیص روش‌های استاندارد متداول نمونه‌های CIN در بیوپسی‌های دهانه رحم می‌باشد. تشخیص این سیستم در بافت‌های نمونه‌برداری شده خارج بدنی، بر روی ۴۰ نمونه انسانی با دقت ۹۵٪ به‌دست آمد. ارزیابی‌های پاتولوژی بیشتر، از نمونه‌های تست شده نشان داد که استفاده از این روش توانست حدود ۱۰٪ ضایعات CIN را که در روش پاتولوژی Permanent معمول بیماران مورد بررسی تشخیص

الکتروشیمیایی Hypoxia glycolysis" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در سال ۱۳۹۷ به کد IR.TUMS.VCR.REC.1397.355 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

داده نشده بود، به درستی تشخیص دهد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل (بخشی از) طرح تحقیقاتی تحت عنوان "آزمون بالینی پروب تشخیص سریع (بلافاصله) سرطانی بودن نواحی مشکوک در محیط بافت زنده هنگام جراحی از طریق ردیابی

References

- Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 2017;26(4):444-57.
- Braue A, Dolianitis C, Varigos G. Spontaneous resolution of facial papular mucinosis in a transplant patient. *Australasian journal of dermatology* 2008;49(3):164-6.
- De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology* 2010;11(11):1048-56.
- Dollin J. Preventing cervical cancer: beyond following guidelines. *Cmaj* 2013;185(1):13-4.
- Rezende MT, Bianchi AG, Carneiro CM. Cervical cancer: Automation of pap test screening. *Diagnostic Cytopathology* 2021;49(4):559-74.
- Waxman AG, Conageski C, Silver MI, Tedeschi C, Stier EA, Apgar B, Huh WK, Wentzensen N, Massad LS, Khan MJ, Mayeaux Jr EJ. ASCCP colposcopy standards: how do we perform colposcopy? Implications for establishing standards. *Journal of lower genital tract disease* 2017;21(4):235.
- Holcomb K, Matthews RP, Chapman JE, Abulafia O, Lee YC, Borges A, Buhl A. The efficacy of cervical conization in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-positive women. *Gynecologic oncology* 1999;74(3):428-31.
- Bizzarri N, Pedone Anchora L, Kucukmetin A, Ratnavelu N, Korompelis P, Carbone V, Fedele C, Bruno M, Vizzielli G, Gallotta V, De Vincenzo R. Protective role of conization before radical hysterectomy in early-stage cervical cancer: a propensity-score matching study. *Annals of Surgical Oncology* 2021;28:3585-94.
- Ramos AM, Ramos ES, Dos Reis HL, de Rezende RB. Quality evaluation of cone biopsy specimens obtained by large loop excision of the transformation zone. *Journal of Clinical Medicine Research* 2015;7(4):220.
- Lorenset LC, Zanine RM. Reliability of negative cone specimens of the cervix: A review. *Annals of Diagnostic Pathology* 2022;58:151929.
- Oh TI, Kang MJ, Jeong YJ, Zhang T, Yeo SG, Park DC. Tissue Characterization Using an Electrical Bioimpedance Spectroscopy-Based Multi-Electrode Probe to Screen for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Diagnostics* 2021;11(12):2354.
- Huh WK, Cestero RM, Garcia FA, Gold MA, Guido RS, McIntyre-Seltman K, Harper DM, Burke L, Sum ST, Flewelling RF, Alvarez RD. Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in vivo: results of a 604-patient study. *American journal of obstetrics and gynecology* 2004;190(5):1249-57.
- Lyng FM, Faoláin EÓ, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Byrne HJ. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Experimental and molecular pathology* 2007;82(2):121-9.
- Miripour ZS, Aghae P, Abbasvandi F, Hoseinpour P, Ghafari H, Namdar N, Akbari ME, Abdollahad M. Electrically guided interventional radiology, in-vivo electrochemical tracing of suspicious lesions to breast cancer prior to core needle biopsy. *Biosensors and Bioelectronics* 2020;161:112209.
- Miripour ZS, Abbasvandi F, Aghae P, NajafiKhoshnood S, Faramarzpour M, Mohaghegh P, Hoseinpour P, Namdar N, Amiri MH, Ghafari H, Zareie S. Electrochemical tracing of hypoxia glycolysis by carbon nanotube sensors, a new hallmark for intraoperative detection of suspicious margins to breast neoplasia. *Bioengineering & Translational Medicine* 2022;7(1):e10236.
- Dabbagh N, Abbasvandi F, Miripour ZS, Hoseinpour P, Jahanbakhshi F, Moradi A, Riazi H, Moradian F, Zanjani FS, Parniani M, Akbari ME. Accuracy of cancer diagnostic probe for intra-surgical checking of cavity side margins in neoadjuvant breast cancer cases: A human model study. *The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery* 2022;18(1):e2335.
- Miripour ZS, Abbasvandi F, Aghae P, Shojaeian F, Faramarzpour M, Mohaghegh P, Hoseinpour P, Namdar N, Hassanpour Amiri M, Ghafari H, Parniani M. Human study on cancer diagnostic probe (CDP) for real-time excising of breast positive cavity side margins based on tracing hypoxia glycolysis; checking diagnostic accuracy in non-neoadjuvant cases. *Cancer Medicine* 2022;11(7):1630-45.
- Goran JM, Phan EN, Favela CA, Stevenson KJ. H₂O₂ detection at carbon nanotubes and nitrogen-doped carbon nanotubes: oxidation, reduction, or disproportionation?. *Analytical chemistry* 2015;87(12):5989-96.
- Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *In Seminars in cell & developmental biology* 2012 (Vol. 23, No. 4, pp. 395-401). Academic Press.
- Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions* 2016;44(5):1499-505.
- Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *In Advances in cancer research* 2014 (Vol. 122, pp. 1-67). Academic Press.
- Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tzeng CC, Shen WL. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecologic oncology* 2008;108(2):377-84.
- Singh C, Manivel JC, Truskinovsky AM, Savik K, Amirouche S, Holler J, Thyagarajan B, Gulbahce HE, Pambuccian SE. Variability of pathologists' utilization of p16 and ki-67 immunostaining in the diagnosis of cervical biopsies in routine pathology practice and its impact on the frequencies of cervical intraepithelial neoplasia diagnoses and cytohistologic correlations. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2014;138(1):76-87.
- Cardenas-Turan M, Freeberg JA, Benedet JL, Atkinson EN, Cox DD, Richards-Kortum R, MacAulay C, Follen M, Cantor SB. The clinical effectiveness of optical spectroscopy for the in vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia: where are we?. *Gynecologic oncology* 2007;107(1):S138-46.

Real-time tracking of hypoxia glycolysis in conization samples for cervical intraepithelial neoplasia detection

Zohreh Sadat Miripour Ph.D.^{1,2}
Mahsa Faramarzpour M.Sc.¹
Parisa Aghaee M.Sc.¹
Elham Shirali M.D.³
Soheila Sarmadi M.D.⁴
Parisa Hoseinpour M.D.⁵
Mohammad Abdolhad
Ph.D.^{1,2,6*}

1- Nano Bio Electronic Devices
Laboratory, School of Electrical
and Computer Engineering,
University of Tehran, Tehran, Iran.

2- Cancer Electronics Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Gynecology
Oncology, Yas Hospital, School of
Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Department of Pathology, Yas
Hospital, School of Medicine,
Tehran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran.

5- SEPAS Pathology Laboratory,
Tehran, Iran.

6- Institute of Cancer, Imam
Khomeini Hospital, School of
Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: School of
Electrical and Computer Engineering,
University of Tehran, Tehran, Iran.
Tel: +98-34-61114307
E-mail: abdolahad@tums.ac.ir

Abstract

Received: 11 Oct. 2022 Revised: 18 Oct. 2022 Accepted: 14 Dec. 2022 Available online: 22 Dec. 2022

Background: Although cervical cancer in adult women with early diagnostic tests has better treatment ability and disease management, precise and fast diagnosis of any signs of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) I-III and high-risk dysplasia is vital. If any precancerous/abnormal suspicious cells are not detected in the routine diagnostic process (pathology), they cannot be treated before the lesion turns into cervical cancer, consequently help increasing the patient's survival rate.

Methods: In this clinical study, the efficiency and diagnostic accuracy of the electrochemical measuring device of glycolysis metabolism in cancer cells (HEA: Hypoxia electrochemical assay) on in-vitro human fresh cervical samples were studied. The samples were prepared from 40 candidates of conization through a history of abnormal cell presentation in their pap smear results. The study was conducted at the Gynecology Department, Yas Hospital, Tehran University of Medical Sciences, and assistant hospitals from August 2018 to June 2021. Patients provided consent according to an ethically approved protocol. A CIN-based scoring of HEA responses was proposed by considering the pathology reports of HEA-tested regions.

Results: The diagnostic calibration of the sensor was achieved by comparing the ROS/H₂O₂ electrochemical current related to cell glycolysis with the presence of cancer cells in the samples' histology. The current diagnostic threshold obtained by the sensor to differentiate cancerous areas from others showed an accuracy of 95% (P<0.0001). The accuracy and sensitivity of the sensor were 95% and 100%, respectively. Therefore, a matched clinical diagnostic classification between the pathological results of tested tissues and the sensor's electrochemical ROS/H₂O₂ response was proposed based on CIN categorization.

Conclusion: Further pathological evaluation of the tested samples showed that electrochemical detection of glycolysis metabolism in cervical conization specimens could detect 10% of CIN lesions missed by conventional pathology of assayed patients, which was confirmed in the pathology re-examination. Therefore, as a complementary method, it can help better diagnose CIN lesions in the conization.

Keywords: cancer, cervical intraepithelial neoplasia, conization, glycolysis, electrochemical current.