

اثر هم افزایی دو کسورویسین و امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز در شدت پایین بر مهار رشد تومور سرطان آدنوکارسینوم پستان در موش BALB/c

هما سلیمانی^۱ - پرویز عبدالمالکی^۲ - منیژه مختاری دیزجی^۲ - طیبه تولیت^۴ - عباس توسلی^۵

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات انجام شده نشان می دهد که تابش یک یا دو بسامد به صورت پیوسته و یا متناوب در شدت پایین در درمان سرطان در مدل حیوانی کارآمد است. اثر هم افزایی امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز با شدت که در ترکیب با داروی ضد سرطان دوکسورویسین (DOX) بر روی رشد تومور آدنوکارسینومای پستان در شرایط درون تنی در مدل حیوانی موش ماده ی نژاد BALB/c بررسی گردید. روش تحقیق: در این مطالعه ی تجربی ۴۴ حیوان مورد بررسی قرار گرفت. موش های دارای تومور به پنج گروه تقسیم شدند. دو گروه درمان نشده (شاهد و شم) و سه گروه تحت درمان شامل: داروی تنها، امواج تنها و دارو+امواج که به ترتیب از طریق دریافت ویدی دوکسورویسین (۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، امواج به تنهایی (۳۰ دقیقه) و قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت همراه با دریافت دارو تحت درمان بودند. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس در محیط نرم افزار SPSS نسخه ی ۱۳ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: پس از تزریق دوکسورویسین و قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه، اثر دارو بر رشد تومور آدنوکارسینوم در مقایسه با گروه شاهد دو برابر شد. درصد مهار رشد تومور در گروه های تحت درمان با امواج+دارو و دارو به تنهایی به ترتیب به میزان ۵۵ و ۲۳ درصد نسبت به حالت گروه شم افزایش نشان داد. همچنین تفاوت معنی داری بین دو گروه تحت درمان با دارو و دارو+امواج فراصوت در مقادیر زمان مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به ۲ و ۷ برابر حجم اولیه مشاهده شد.

نتیجه گیری: اعمال همزمان تابش امواج فراصوت همراه با استفاده از داروی ضد سرطان در مقایسه با استفاده از دارو به تنهایی، تفاوت معنی داری را در مهار رشد تومور آدنوکارسینوم پستان نشان می دهد. کلید واژه ها: اثر حفره سازی صوتی؛ امواج فراصوت در فرکانس پایین؛ سرطان پستان؛ دوکسورویسین؛ موش BALB/c

افق دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلباد (دوره ی ۱۷؛ شماره ی ۳؛ پاییز ۱۳۹۰)

دریافت: ۱۳۹۰/۲/۵ اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۵/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۳

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- نویسنده ی مسئول؛ دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

آدرس: تهران - تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و چمران - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده ی علوم زیستی - گروه بیوفیزیک
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۴۰۴
نمابر: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۴۸۴
پست الکترونیکی: Parvizi@modares.ac.ir

۳- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۴- دانشیار، گروه داروسازی، دانشکده ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

سرطان های پستان، ریه و برنش و کلورکتوم در زنان، همچنان به عنوان شایع ترین سرطان های کشنده شناخته می شوند. بر اساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۱۰ سرطان پستان به تنهایی ۲۸ درصد از همه ی موارد سرطان را در میان زنان آمریکایی تشکیل داده است (۱).

اگر چه شیمی درمانی نقش بسیار مهمی در درمان سرطان ایفا می کند، با این حال استفاده از عوامل ضد سرطان اثر نامطلوب خود را بر روی بافت نرمال می گذارد. دوکسوروبیسین^۱ یکی از داروهای ضد سرطان است که امروزه به طور گسترده ای استفاده می شود (۲). این دارو دارای طیف وسیعی از واکنش ها و فعالیت ضد نوپلاستیک در برابر بسیاری از انواع سرطان های انسانی است. با این حال استفاده ی بالینی از دوکسوروبیسین با اثرات حاد و تحت حاد جانبی مانند سمیت غیر قابل برگشت در قلب و سایر بافت ها (۳،۴) همراه بوده که استفاده از این دارو را با مشکل روبرو کرده است. سرطان شناسان تحقیقات خود را بر روی افزایش تخریب سلول های بدخیم و در عین حال کاهش عوارض جانبی مصرف دارو متمرکز کرده اند. متأسفانه افزایش مقاومت دارویی منجر به شکست بسیاری از روش های درمانی پیشنهادی شده است (۴-۲).

از سوی دیگر پژوهش در زمینه ی اثرات زیستی فراصوت و کاربردهای آن به سرعت در حال گسترش است. به طور معمول اثرات زیستی قرار گرفتن در معرض تابش فراصوت عبارت از حرارت، اثرات مکانیکی و پدیده ی حفره سازی صوتی است^۲. با این حال این سه مکانیسم به شیوه ی یکسان عمل نمی کنند. در پدیده ی حفره سازی، فراصوت با تجزیه ی مولکول آب تولید رادیکال های آزاد می کند.

۱- دوکسوروبیسین (Doxorubicin) آنتراسایکلین گلیکوزید آنتی بیوتیک سیتوتوکسیک، با اسم ژنریک آدریامایسین (Adriamycin) است که به طور گسترده ای در درمان لوکمیا (Leukemias)، لنفوما، میلوم متعدد (Multiple Myeloma)، سارکوما (Sarcomas) بافت نرم و بسیاری از انواع تومورهای جامد از جمله سرطان پستان استفاده می شود. اثرات ضد نوپلاستیک دوکسوروبیسین مربوط به جاگیری (Intercalation) دی.ان.ای، Alkylation، ایجاد گونه های اکسیژن واکنش پذیر، تداخل با دی.ان.ای و آر.ان.ای پلی مرز و مهار Topoisomerase II نسبت داده شده است (۵،۴).

گام های اولیه در تجزیه ی آب، تولید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل است. گونه های دیگر از قبیل هیدروژن پراکسید، اکسیژن منفرد و یون های سوپراکسید هستند که شکل گیری آن ها بستگی به شرایط خاص بعدی دارد (۶). همچنین مطالعات پیشین تأیید کرده است که اثرات زیستی کاربرد فراصوت وابسته به شدت و فرکانس هستند (۷،۸). ویژگی امواج فراصوت با شدت بالاتر، تولید حرارت و با فرکانس پایین تر، ایجاد حفره می باشد. تابش امواج فراصوت به بافت ها باعث تغییرات ساختاری و یا عملکردی می شود. تغییرات ساختاری شامل دامنه ی گسترده ای از آسیب خفیف اما قابل ترمیم تا مرگ سلولی است. تغییرات عملکردی عبارت از تکثیر، مهاجرت، سنتز، ترشح، بیان ژن، عمل غشایی و ... است (۱۰-۷). بنابراین با توجه به هدف زیستی مورد نظر، هنگام استفاده از فراصوت در درمان، پارامترهای صوتی باید با دقت انتخاب شوند (۱۱).

در سال های اخیر استفاده از امواج فراصوت برای درمان تومورها به طور موفقیت آمیزی در حال توسعه بوده است. فراصوت با امواج متمرکز در شدت بالا^۳ به منظور درمان تومورهای جامد کاربرد داشته و کارایی و ایمنی آن در تحقیقات بالینی مورد تأیید است (۱۳،۱۲). از طرف دیگر تحقیقات بر روی اثرات زیستی و کاربردهای فراصوت با شدت نسبتاً کم در بافت های بدخیم هنوز در حال بررسی است. استفاده از این نوع فراصوت با شدت کم دارای پتانسیل بسیار زیادی بوده و می تواند نسبتاً به راحتی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات نشان می دهد که پاسخ سلول های بدخیم به فراصوت با شدت کم، نسبت به سلول های طبیعی یکسان نیست و در این شرایط سلول های سرطانی بیشتر مستعد کشته شدن هستند (۱۴،۷). فراصوت با شدت کم، باعث سرکوب تکثیر سلولی و تشکیل کلون، افزایش اثرات مواد شیمیایی ضد سرطانی و غیر فعال کردن سلول ها از طریق مکانیسم های غیر مستقیم می شود (۱۵،۱۴،۸،۷). این یافته ها آشکار می کند که فراصوت با شدت کم، به عنوان تکنیکی برای درمان سرطان توانایی متمایزی دارد. اثرات هم افزایی داروهای ضد سرطان و امواج فراصوت در محیط

3- High Intensity Frequency Ultrasound (HIFU)

2- Acoustic Cavitation

BALB/c که خود به خود دارای آدنوکارسینوم سرطان پستان شده بود. این منبع از بخش ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شد. محلول کتامین- گزایلین^۷ (به نسبت ۲:۱) با ۸/۵ میلی لیتر محلول نمکی بافر فسفات^۸ به حجم ۱۰ سی سی رسید و موش منبع با تزریق این محلول به صورت داخل صفاقی بیهوش شد. سپس تومور حیوان تحت عمل جراحی در شرایط استریل جدا و به قطعات کوچک (۳-۲ میلی متر مکعب) برش داده شد. همزمان با این عمل موش گیرنده مانند روش فوق بیهوش شد. پوست سینه پهلو در نزدیکی غدد شیری حیوان باز شد و یک قطعه از تومور استخراجی (عاری از بافت نکروز یا چربی) تحت شرایط استریل پیوند شد. پس از گذشت یک هفته از لانه گزینی تومور^۹، موهای سطح پوست منطقه تومور با استفاده از کرم موبر حذف و سپس میزان حجم تومور رشد یافته توسط کولیس دیجیتالی اندازه گیری شد.

حجم تومور به شرح زیر محاسبه شد (۲۰):

$$\text{حجم تومور (mm}^3\text{)} = \frac{(\text{قطر کوچک}) \times (\text{قطر بزرگ})}{2}$$

تومورها هر دو یا سه روز یک بار اندازه گیری شد تا قطر تومورها تقریباً به ۹-۸ mm رسید. آن دسته از موش هایی که تومور در آن ها رشد خوبی داشت از دیگران جدا شده و برای آزمایش آماده شدند. حجم اولیه ی تومور در این موش ها قبل از درمان به طور متوسط $350 \pm 50 \text{ cm}^3$ و وزن آن ها 19 ± 3 گرم بود. میزان موفقیت پروتکل درمانی را روزهای متوالی پس از درمان نسبت به گروه شام، به کمک پارامتر درصد مهار در روند رشد تومور و مطابق رابطه ی زیر ارزیابی شد (۲۱):

$$\text{TGI (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Vdayx}}{\text{Vsdcy}}\right) \times 100$$

همه ی مراحل آزمایش مطابق با پروتکل های تأیید شده توسط UFAW^{۱۰} انجام شد (۲۲). موش ها از تمام گروه ها برای درمان مطابق روش فوق بیهوش شدند. به منظور انتخاب حداقل یک دوز از دوکسوروبیسین و اثر

درون تنی^۱ بر روی سلول های بافت های سرطانی تخمدان، گردن رحم، خون، فیروبلاست و پستان مطالعه شده است (۱۹-۱۵). تحقیقات نشان داده اند که هر دو شکل موج پیوسته و پالسی می تواند به عنوان حساس کننده مورد استفاده قرار گیرد (۱۷، ۱۵). محققان بر این باورند که استفاده ی همزمان از برخی از مواد سیتوتوکسیک و امواج فراصوت بر کارایی درمان تأثیر داشته است. این مطالعات بر روی اثرات سیس پلاتین^۲، ۵-فلوئورواوراسیل^۳، آرابینوزیل سیتوزین^۴ و چندین ماده ی سیتوتوکسیک دیگر از جمله آدریامایسین صورت گرفته است (۱۹-۱۵). تحقیقات نشان داده است که اگر آدریامایسین پیش از تابش فراصوت به محیط کشت سلول اضافه شود، میزان بقای سلول ها کمتر از زمانی است که تابش قبل از تزریق آدریامایسین صورت گیرد (۱۵).

هدف از مطالعه ی حاضر بررسی تأثیر هم افزایی تابش فراصوت در فرکانس ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته^۵ و داروی دوکسوروبیسین، بر روی تومور آدنوکارسینوم در موش های ماده ی نژاد BALB/c است. با استفاده از میزان رشد تومور و مدت زمان بقا در گروه های مختلف موش ها، ما می خواهیم بدانیم که آیا تجویز همزمان فراصوت تحت شرایط فوق الذکر اثرات هم افزایی قابل توجهی در عملکرد سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین در مدل حیوانی به وجود می آورد یا خیر.

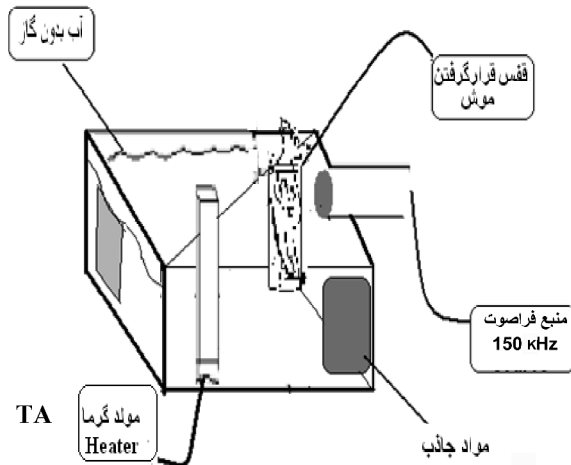
روش تحقیق

مواد: دوکسوروبیسین هیدروکلراید از EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, A-4866 Unterach، استرالیا و کتامین و گزایلین از سیگما - الدریج خریداری شد. **حیوانات:** موش ماده ی نژاد BALB/c با سن ۴-۵ هفته از مؤسسه ی پاستور تهران خریداری شد. مراقبت از آن ها از نظر حمل و نقل، رطوبت، دما، آب و تغذیه در شرایط استاندارد انجام گرفت. پس از یک هفته، آن ها تحت پیوند^۶ قرار گرفتند. تومور منبع متعلق بود به یک موش ماده ی نژاد

- 1- In Vivo
- 2- Cisplatin
- 3- 5-Fluorouracil (5-FU)
- 4- Arabinosyl Cytosine (AraC)
- 5- kHz_{con}
- 6- Homographed

- 7- Ketamine-Xylazine
- 8- Phosphate Buffer Saline (PBS)
- 9- Tumor Growth Inhibition (TGI %)
- 10- Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)

بخشی آن بر حجم تومور، با توجه به مقالات (۲۶-۲۳)، زمان تابش در این مطالعه ۳۰ دقیقه و مقدار دوکسوروبیسین ۲ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن حیوان انتخاب شد. محلول دارو با حجم مناسبی از محلول نمکی بافر فسفات رقیق شده و تزریق از طریق ورید دم انجام گرفت. پس از ۳۰ دقیقه از تزریق دوکسوروبیسین، حیوان بیهوش شده و در مقابل مبدل فراصوت قرار داده شد. زمان تابش دهی بر اساس تجربه های پیشین در این آزمایشگاه نیز معادل ۳۰ دقیقه انتخاب گردید. پس از درمان، هر سه روز یک بار حجم تومور با کولیس مطابق روش بالا اندازه گیری و هر اندازه گیری سه بار تکرار شد. دوره ی بقای هر موش به دقت اندازه گیری شد و موش هایی که از خونریزی مرده یا برای مطالعات آسیب شناسی فرستاده شده بودند حذف شدند. در تحقیق حاضر تومور آدنوکارسینوما به ۶۰ موش القا شد که در نهایت با احتساب پیوندهای موفق و مرگ و میر، ۴۴ حیوان در مطالعه بررسی شدند.



طراحی آزمایش های *in vivo*: موش های ماده ی نژاد BALB/c به ۵ گروه تقسیم شدند: کنترل، شم (در آب ۳۰ دقیقه بدون تابش امواج فراصوت قرار داده شده)، دارو به تنهایی (تزریق ۲ میلی گرم داروی دوکسوروبیسین، به ازای هر کیلوگرم وزن موش)، گروه تحت تابش امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با شدت 0.2 W/cm^2 بدون تزریق دارو و آخرین گروه موش هایی که در معرض تابش امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته + دارو قرار گرفتند.

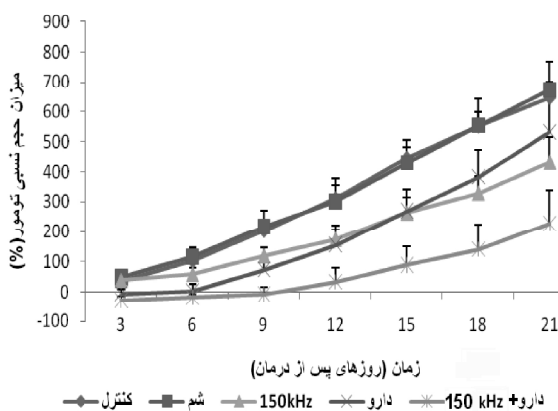
دستگاه سونوگرافی و اندازه گیری شدت: شمایی دستگاه مورد استفاده در آزمایش ها در شکل ۱ نشان داده شده است. یک مبدل پیزوالکتریک^۱ ۱۵۰ کیلوهرتز با قطر پروب ۳۰ میلی متر و به مساحت تابش مؤثر ۵ سانتی متر مربع مورد استفاده قرار گرفت (SM3678B, Shrewsbury Medical Co., UK). برای کسب اطمینان از این که حداکثر انرژی صوتی در ضمن تیمار به موش ها می رسد، در آغاز قدرت و شدت دستگاه در محفظه ی آب عاری از گاز با روش هیدروفون^۲ در محفظه ی مکعب (Bruel & Kjaer)

3- Temporal Average
4- Spacial Average
5- Thermocouple

1- Piezoelectric
2- Hydrophone

مشابه گروه کنترل بود، بنابراین نتایج گروه شم در تمام آزمایش ها به عنوان مرجع برای تمام گروه های تیمار استفاده شد.

بررسی تغییرات حجم نسبی در طی ۳۰ روز انجام گرفت. بعد از اعمال تابش فراصوت نتایج نشان می دهد که تا ۹ روز پس از درمان، تفاوت معنی داری بین گروه درمان شده با دارو به تنهایی و گروه دارو+ امواج فراصوت، در مقایسه با گروه شم وجود داشت ($p < 0.05$). همچنین تفاوت معنی داری تا روز نهم بین گروه درمان شده با دارو به تنهایی و گروه امواج ۱۵۰ kHz به تنهایی مشاهده شد ($p < 0.05$). اگرچه از روز ۱۲ تا روز ۳۰ پس از درمان تفاوت قابل توجهی بین گروهی که دارو+ امواج فراصوت را دریافت کرده بود و گروه شم مشهود بود ($p < 0.05$)، اما تفاوتی بین گروهی که تنها دارو دریافت کرده بود و گروه شم مشاهده نگردید ($p > 0.05$). همچنین از روز نهم به بعد تفاوت معنی داری بین گروه درمان شده با دارو به تنهایی و گروه امواج به تنهایی مشاهده نشد ($p > 0.05$).



نمودار ۱: مقایسه ی تغییرات حجم نسبی تومور (بر حسب درصد) در طول ۲۱ روز بعد از تابش فراصوت (در غیاب یا حضور دوکسوروبیسین) در گروه های کنترل، شم، تابش امواج پیوسته ی فراصوت با فرکانس ۱۵۰ کیلو هرتز در شدت 0.2 W/cm^2 به مدت ۳۰ دقیقه، تزریق دوکسوروبیسین (۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن حیوان) و تزریق دوکسوروبیسین (۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن حیوان) + تابش امواج پیوسته ی فراصوت با فرکانس ۱۵۰ کیلو هرتز در شدت 0.2 W/cm^2 به مدت ۳۰ دقیقه.

داده های فراهم آمده از ترموکوپل ها به واحد کنترل ورودی ها ارائه شده که حاوی یک ریزپردازنده ی متصل به کامپیوتر از طریق RS-232 port بود. چگالی انرژی کل سونیکاسیون با توجه به فرمول زیر برای ۳۰ دقیقه برابر 360 J/cm^2 بود.

$$\text{چگالی انرژی کل} = \text{ISATA (W/cm}^2) \times t \text{ (ثانیه)} \\ = (30 \times 60) \times 0.2 \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2}\right) = 360 \text{ (J/cm}^2)$$

پاتولوژی: به منظور تایید نوع تومور و عدم تغییر در بافت توموری، بافت های تومور از لحاظ پاتولوژی مورد مطالعه قرار گرفتند. از موش ها در گروه شاهد توسط اتر بیهوش و بدون درد کشته شدند. لام های میکروسکوپی نمونه هایی از بافت توده ی تومور غده ی پستانی جهت آزمایش تهیه شد. همه ی نمونه های بافتی با ضخامت ۴ میلی متر برش داده شده و در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پردازش نمونه های بافتی شامل مراحل مختلف کاهش آب بافتی با الکل، پاکسازی با گزبل و اشباع با پارافین ذوب شده بودند. نمونه های بافت در پارافین جاسازی شده و پس از آن در ابعادی به ضخامت ۵ میکرون با میکروتوم برش داده شدند و سپس با هماتوگزایلین^۱ و اتوزین^۲ مطابق روش لونا رنگ آمیزی شدند (۲۷).

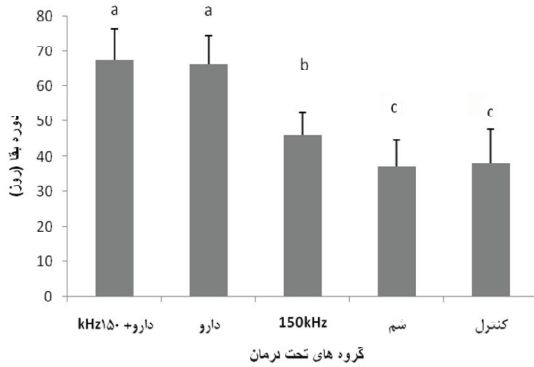
تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آنالیز واریانس انجام شد و به دنبال آن از آزمون تعقیبی کمترین تفاوت معنی دار برای مقایسه ی دو به دوی میانگین متغیرها در گروه های مختلف استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده SPSS V.13 (SPSS/PC Inc., Chicago, IL) بود. نتایج در هر گروه ۱۰-۸ تایی به صورت "میانگین ± انحراف معیار" ارائه شد. پس از تأیید یک توزیع نرمال و همگن، تحلیل واریانس با سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

اثربخشی درمان با اندازه گیری رشد تومور در گروه های مختلف موش ها مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور به دست آوردن داده های نرمال از رشد حجم نسبی (درصد) استفاده شد (نمودار ۱). از آن جا که نتایج به دست آمده در گروه شم

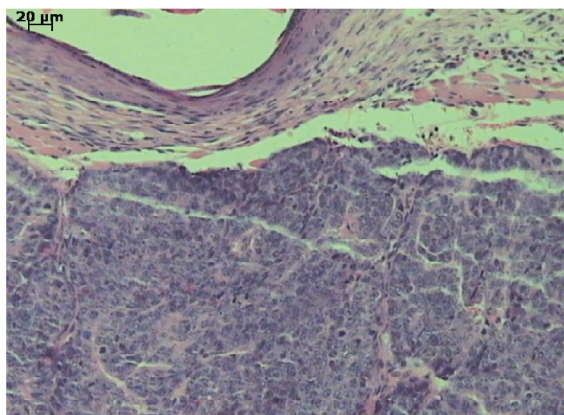
1- Hematoxylin
2- Eosin

دوره ی بقای گروه دارو+امواج نسبت به گروه دارو تفاوت نشان می داد، ولی این تفاوت معنی دار نبود. در حالی که دوره ی بقا در این دو گروه نسبت به گروهی که تنها امواج ۱۵۰ کیلوهرتز را دریافت کرده و همچنین گروه شم معنی دار بود ($p < 0.001$) (نمودار ۴).



نمودار ۴: میانگین دوره های بقا بر حسب روز در گروه های مختلف: کنترل، شم، تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه و تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه + داروی دوکسوروبیسین. داده ها برحسب میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. حروف بیان گر تفاوت معنی دار گروه ها در سطح خطای پنج درصد بر اساس آزمون کمترین تفاوت معنی دار است.

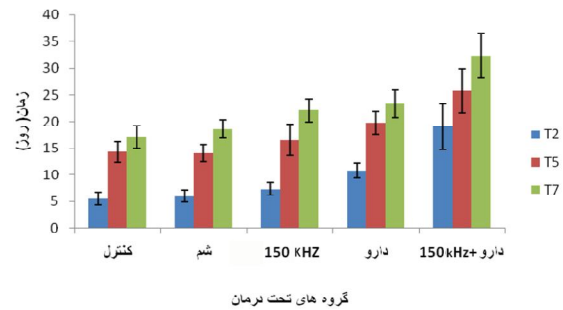
نتایج آسیب شناسی: نتایج بافت شناسی از بافت تومور پستانی نشان می دهد که تومور از نوع پاپیلومای سرطان پستان است. نشانه های بدخیم آدنوکارسینوم با پلی مورفیسم و هایپرکروماتیسم^۱ در بافت تومور مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲: آسیب شناسی بافت تومور بیوندی. تومور از نوع پاپیلاری آدنوکارسینوم غدد پستانی در موش بود. پاپیلاری رشد سلول های نئوپلاستیک آشکار است (رنگ آمیزی H&E).

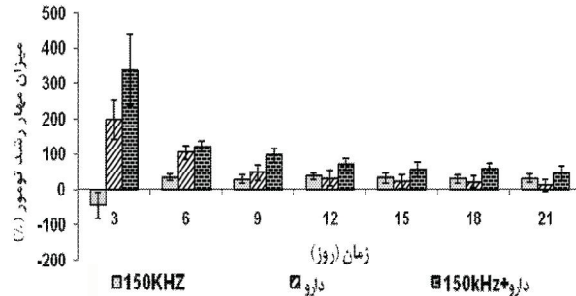
1- Hyperchromatism

زمان های مورد نیاز برای رسیدن هر یک از تومورها به ۲، ۵ و ۷ برابر حجم اولیه ی خود (T_2 ، T_5 و T_7)، محاسبه شد (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه ی زمان مورد نیاز جهت رشد تومور برای رسیدن به دو برابر (T_2)، پنج برابر (T_5) و هفت برابر (T_7) حجم اولیه ی تومور (در روز صفر). در گروه های کنترل، شم، امواج ۱۵۰ کیلوهرتز به تنهایی، داروی دوکسوروبیسین به تنهایی و دارو + امواج ۱۵۰ کیلوهرتز.

اگر چه مقادیر محاسبه شده برای T_2 ، T_5 و T_7 در گروه امواج فراصوت به تنهایی و گروه دارو به تنهایی نشان دهنده ی یک تفاوت نسبی بود، اما این تفاوت تنها در T_5 بین گروه دارو به تنهایی و گروه امواج به تنهایی معنی دار بود ($p < 0.05$). همچنین علی رغم وجود تفاوت نسبی میان T_2 ، T_5 و T_7 در گروه دارو+امواج فراصوت در مقایسه با گروه دارو به تنهایی، فقط در T_2 و T_7 بین گروه دارو به تنهایی و گروه دارو+امواج تفاوت معنی داری مشاهده گردید ($p < 0.001$). میانگین TGI محاسبه شده در فاصله ی زمانی ۳ تا ۲۱ روز در گروه های دارو به تنهایی و دارو+امواج به ترتیب معادل ۲۳ درصد و ۵۵ درصد بود (نمودار ۳).



نمودار ۳: نسبت مهار حجم تومور (درصد) در مقایسه با گروه شم برای ۳ گروه در ۳ تا ۲۱ روز بعد از درمان نشان داده شده است (تعداد موش در هر گروه ۱۰-۸ سر بوده است). گروه تحت درمان با امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با مدت زمان تابش ۳۰ دقیقه، گروه تحت درمان با دوکسوروبیسین به تنهایی (۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن حیوان) و گروه دوکسوروبیسین+امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با مدت زمان تابش ۳۰ دقیقه جهت درمان.

بحث

یکی از مکانیزم های اصلی مقاومت بافت توموری علیه تعداد قابل توجهی از عوامل شیمی درمانی، نفوذ پذیری ناکارآمد دارو به داخل بافت تومور و یا به داخل سلول های سرطانی است. شواهد متعددی نشان دهنده ی توزیع نامناسب و ناکافی بسیاری از داروهای ضد سرطان در بافت های توموری است. در نتیجه نیاز شدیدی به یافتن استراتژی های نوین وجود دارد که کاربرد آن ها باعث بهبود نفوذ داروها به داخل بافت توموری و نهایتاً افزایش شاخص درمانی شود (۲۸).

امواج فراصوت منجر به افزایش تخلخل غشای سلولی می شود و این اثر اجازه می دهد که به صورت مؤثرتری ورود و تجمع داروهای ضد سرطان به سلول انجام شود. از طریق این عمل ضمن حفظ حداکثر اثربخشی، با هم افزایشی فراصوت امکان استفاده از دوزهای پایین تری از داروی سیتوتوکسیک وجود دارد. از این طریق اثرات دارو در مناطق خاص و تعیین شده تشدید می گردد (۲۹). در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده شده است که فراصوت به طور مستقیم می تواند مرگ سلولی را از طریق تحلیل تدریجی سلولی^۱، نکروز و یا آپوپتوز القا کند (۳۰). از اثرات بالقوه ی فراصوت در بافت های زیستی می توان به افزایش قابلیت عبور دارو و پدیده ی حفره سازی صوتی به عنوان مهم ترین مکانیسم های غیر حرارتی اشاره کرد. حبابچه های حاصل از پدیده ی حفره سازی می تواند منجر به القای نفوذپذیری گذرا در غشای سلولی و یا مرگ سلولی شود (۳۱). همزمان با تابش اولتراسوند مولکول ها می توانند با از هم گسستگی که در غشای سلول توسط مکانیزمی که شامل پدیده ی حفره سازی می شود، وارد شوند (۳۰، ۳۲). رادیکال های آزاد تولید شده توسط حفره سازی می تواند به غشای سلولی صدمه بزند و از طریق تغییر در نفوذپذیری غشایی نقل و انتقال مواد از غشا را تغییر دهند. در نتیجه ی این تغییرات روند حمل و نقل دارو بهبود می یابد و این فرآیندها منجر به افزایش تجمع مواد دارویی در داخل سلول می گردد (۱۱). کاربرد فراصوت با شدت کم به صورت غیر تهاجمی با داروهای ضد سرطان می تواند اندازه ی تومور و احتمال عود

مجدد آن را کاهش داده، ضمن آن که میزان عوارض جانبی شدید را نیز کم می کند (۱۳). به علاوه فراصوت به طور ویژه می تواند به طور عمیق تری در بافت نفوذ نماید و توانایی تمرکز انرژی بر روی حجم کوچکی از بافت را نیز حفظ می کند. در این صورت ضریب میرایی مناسبی برای بافت حاصل می گردد که از آن می توان در درمان غیر تهاجمی تومورهای غیر سطحی استفاده کرد. فراصوت با این ویژگی ها در مقایسه با روش های الکترومغناطیسی مانند اشعه ی لیزر دارای ارجحیت کاربردی بیشتری است (۳۳).

تحقیقات نشان داده اند که کاربرد فراصوت سمیت سلولی دوکسوروبیسین را در محیط های آزمایشگاهی (in vitro) و در شرایط هایپرترمی و دوزهای بالای آدریامایسین مانند (۲۰-۱۰ mg/kg) در شرایط درون تنی افزایش می دهد (۳۴-۱۱،۳۴). مطالعات به وضوح سودمندی هم افزایی امواج فراصوت و دوکسوروبیسین را در سطح سلولی نشان داده است (۳۴). بدیهی است که شرایط آزمایشگاهی و شرایط درون تنی موجود زنده همواره یکسان نیست. به عنوان مثال مین جینتون و همکاران (۲۸) نشان دادند که تعدادی از عوامل ضد سرطانی که در کشتن سلول های تک لایه ی تومور مؤثر بودند، قادر به رسیدن به سلول های تومور در داخل بدن نیستند.

با وجود این با در نظر گرفتن اثر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی پیچیده که ممکن است ایجاد اختلال در اثربخشی این داروها داشته باشند، تکمیل آزمایش ها در شرایط داخل بدن به ویژه در دوزهای پایین دوکسوروبیسین در مدل های حیوانی درون تنی ضروری به نظر می رسد. این آزمایش ها به خصوص مطالعات روی فرکانس و یا شدت فراصوت کاربردی، می تواند مقدمه ای برای تعمیم نتایج از مدل های حیوانی، به سطح کاربردهای کلینیکی ایمن و مؤثرتر باشد.

در مطالعه ی حاضر اثر هم افزایی بین کاربرد فراصوت و دوکسوروبیسین در محیط داخل بدن بررسی شد. این مطالعه شامل مجموعه ای از آزمایش ها با استفاده از پروتکلی شامل درمان به صورت تک دوز دوکسوروبیسین و امواج فراصوت بود. زمان پرتودهی به دنبال مطالعات قبلی در این آزمایشگاه

برگزیده شد (۳۶،۳۷). همچنین میزان دوکسوروبیسین بر اساس نتایج مطالعات محققین (۲۳،۲۴،۳۶،۳۸) انتخاب شد.

ارزیابی ها نشان داد که ترکیب فراصوت با شدت کم با دوکسوروبیسین اثر قابل توجهی بر رشد تومور سرطان آدنوکارسینوم پستان در مدل حیوانی BALB/c دارد. در این تحقیق تفاوت در رشد تومور (حجم نسبی تومور) در هنگام استفاده از دوکسوروبیسین در مقایسه با ترکیب وکسوروبیسین و فرکانس پایین فراصوت مشهود بود. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس روی نرخ رشد تومور مشخص کرد که بین گروهی که تنها دارو و گروهی که دارو+ امواج دریافت کرده اند، تفاوت معنی داری وجود دارد. همراه با دفع تدریجی دارو از بدن (از روز ۱۲ تا روز ۱۸) تفاوت معنی داری بین گروه داروی تنها و دارو+ امواج در نرخ رشد تومور آشکار است ($p < 0.05$). چنین به نظر می رسد که اثر امواج فراصوت باعث افزایش زمان اثربخشی بیولوژیکی دارو شده است. تحت این شرایط، میزان افزایش حجم نسبی تومور در گروه داروی تنها، تفاوتی معنی دار با گروه کنترل و شم نشان نداد. اما گروه دارو+ امواج (از روز ۱۲ تا روز ۱۸) تفاوت معنی داری با هر دو گروه کنترل و شم نشان می داد ($p < 0.05$) که تأییدی دیگر بر افزایش زمان اثربخشی بیولوژیکی دارو به واسطه ی کاربرد فراصوت می باشد.

در مجموع مطالعه ی حاضر نشان داد که کاربرد فراصوت با شدت کم می تواند اثر بخشی تک دوز دوکسوروبیسین را با توجه به مجموع روند مهار رشد تومور به ۳۲ درصد افزایش دهد. از طرفی نتایج بیانگر تفاوت قابل ملاحظه ی مقادیر T_2 ، T_5 و T_7 بین گروه امواج فراصوت و گروه دارو است، اما تنها در T_5 تفاوت معنی داری بین این دو گروه مشاهده گردید ($p < 0.05$). این شواهد حاکی از آن است که تأثیر یک دوز امواج فراصوت تا رسیدن حجم تومور به میزان دو برابر، مشابه عملکرد دارو است. چنین به نظر می رسد که میزان اثر بخشی زودرس امواج (تا رسیدن به T_2) در این شرایط بر روی تومور بیش از داروست ولی پس از آن، اثر دارو تا زمان پنج برابر شدن تومور در بدن کاملاً مشخص است. همچنین در این مرحله میزان تجمع دارو در تومورها به حدی است که اثر بخشی خود را به طور برجسته تری نسبت به امواج فراصوت

نشان می دهد. شاید بتوان عدم وجود تفاوت معنی دار در T_7 را چنین توجیه کرد که در فاصله ی زمانی که حجم تومور به هفت برابر حجم اولیه می رسد، مقدار دارو در بدن (با توجه به دفع آن از بدن) به حداقلی رسیده که تأثیری از آن مشاهده نمی گردد. بر اساس نتایج به دست آمده فقط مقادیر T_2 و T_7 برای گروه دارو+ امواج در مقایسه با گروه دارو به تنهایی تفاوت معنی داری نشان داد ($p < 0.01$). تجزیه و تحلیل آماری مقادیر T_2 و T_5 مؤید نتایج آماری برای گروه های دارو و امواج به تنهایی است که اثربخشی زودرس امواج را در مقایسه با دارو نشان می دهد. وجود تفاوت معنی دار در مقدار T_7 به شکلی می تواند بیانگر اثر هم افزایی دارو و امواج باشد. به عبارت دیگر امواج توانسته میزان ورود دارو به سلول های توموری را تا حد مطلوب کنترل کند. به طوری که میزان کمتری از دارو در فضای خارج از بافت توموری بوده است. این نکته با توجه به نیمه عمر بیولوژیکی دارو و دفع تدریجی آن از بدن می تواند منشأ اثر بخشی طولانی مدت در گروه دارو و امواج تلقی شود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده می توان ادعا کرد که با استفاده از تلفیق امواج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز با شدت کم (0.2 W/cm^2) و دوکسوروبیسین کارایی درمان افزایش یافته است. این نکته از طریق سنجش کاهش روند رشد حجمی تومور و طولانی تر شدن دوره ی بقا نسبت به کاربرد داروی دوکسوروبیسین به تنهایی قابل ارزیابی می باشد. ما بر این عقیده هستیم که افزایش اثر بخشی مؤثر به واسطه ی اعمال همزمان امواج و دارو، می تواند نوید بخش کاهش دوز مؤثر دارو و به تبع آن کاهش عوارض جانبی دوکسوروبیسین باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دکترا می باشد و نویسندگان بر خود لازم می دانند تا از حمایت مالی و پژوهشی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تشکر نمایند. همچنین از همکاری آقای سالمانی کارشناس محترم گروه پاتولوژی دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه تهران جهت تهیه ی لام های پاتولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

References:

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics in 2010, CA: Cancer J Clin [serial online] 2010; 60(5): [277.300 screens]. Available at: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610543>. [Cited... Jul. 7]
2. Young RC, Ozols RF, Myers CE. The anthracycline antineoplastic drugs. N Engl J Med 1981; 305: 139-153.
3. Bouma J, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM. Anthracycline antitumour agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties. Pharm world Sci 1986; 8(2): 109-133.
4. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: intermediacy of H₂O₂ and p53-dependent pathways. J Biol Chem 2004; 279(24): 25535-25543.
5. Sartiano GP, Lynch WE, Bullington WD. Mechanism of action of the anthracycline anti-tumor antibiotics, doxorubicin, daunomycin and rubidazole: preferential inhibition of DNA polymerase alpha. J Antibiot 1979; 32(10): 1038-1045.
6. Kardos N, Luche JL. Sonochemistry of carbohydrate compounds. Carbohydr Res 2001; 332(2): 115-131.
7. Lejbkiewicz F, Salzberg S. Distinct sensitivity of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. Environ Health Perspect 1997; 105(6): 1575-1578.
8. Hrazdira I, korpikova J, Dolnikova M. Ultrasonically induced alterations of cultured tumour cells. Eur J Ultrasound 1998; 8 (1): 43-49.
9. Alter A, Rozenszajn LA, Miller HI, Rosenschein U. Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro. Ultrasound Med Biol 1998; 24(5): 711-721.
10. Doan N, Reber P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. J Oral Maxil Surg 1999; 57(4): 409-419.
11. Yu T, Wang Z, Mason TJ. A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. Ultrason Sonochem 2004; 11(2) 95-103.
12. Wu F, Wang ZB, Chen WZ, Zou JZ. Extracorporeal high intensity focused ultrasound for treatment of solid carcinomas: four-year Chinese clinical experience. Proceeding of the 2nd international symposium on therapeutic ultrasound in 29 July-2 August, 2002. USA, Washington, Seattle: Elsevier; 2003.
13. Jin CB, Wu F, Wang ZB, Chen WZ. High intensity focused ultrasound therapy in combination with transcatheter arterial chemoembolism for advanced hepatocellular carcinoma: a primary clinical study, in: Proceeding of the 2nd international symposium on therapeutic ultrasound in 29 July-2 August, 2002. USA, Washington, Seattle: Elsevier; 2003.
14. Lejbkiewicz F, Zwiran M, Salzberg S. The response of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. Ultrasound Med Biol 1993; 19(1): 75-82.
15. Yu T, Wang Z, Jiang S. Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line 3AO by low-level ultrasound. Ultrasonics 2001; 39(4): 307-309.
16. Sur P, Ghosh P, Bay S P, Sur B, Chatterjee S N. On the inhibitory activities of a new boron compound and ultrasound against the mouse ascites tumor. Chemotherapy 1999; 45(5): 360- 369.
17. Harrison GH, Balcer-Kubiczek EK, Eddy HA. Potentiation of chemotherapy by low-level ultrasound. Int J Radiat Biol 1991; 59(6): 1453-1466.
18. Tachibana K, Uchida T, Tamura K, Eguchi H, Yamashita N, Ogawa K. Enhanced cytotoxic effect of Ara.C by low intensity ultrasound to HL.60 cells. Cancer Lett 2000; 149(1-2): 189-194.
19. Takada E, Sunagawa M, Ohdaira E, Ide M. Ultrasonic effects on anti.cancer drugs. Ultrasound Med Biol 1997; 23(1): 132.
20. Yumita N, Nishigaki R, Umemura S. Sonodynamically induced antitumor effect of Photofrin II on colon 26 carcinoma. J Cancer Res Clin 2000; 126(10): 601-606.

21. Barati AH, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie SZ, Hassan ZM. Treatment of murine tumors using dual-frequency ultrasound in an experimental in vivo model. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35(5): 756-763.
22. Teicher BA. Tumor models in cancer research. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002: 407-449.
23. Staples BJ. Pharmacokinetics of ultrasonically-released, micelle encapsulated doxorubicin in the rat model and its effect on tumor growth [dissertation]. Department of chemical engineering: Brigham Young University; 2007.
24. Colombo T, Donelli MG, Urso R, Dallarda S, Bartosek I, Guaitani A. Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats. *Exp Gerontol* 1989; 24(2): 159-171.
25. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic, pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(6): 431-444.
26. Van Calsteren K, Hartmann D, Van Aerschot L, Verbesselt R, Van Bree R, D'Hooge R, et al. Vinblastine and doxorubicin administration to pregnant mice affects brain development and behavior in the offspring. *Neurotoxicology* 2009; 30(4): 647-657.
27. Luna LG(ed). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. New York, McGraw-Hill; 1968.
28. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumors. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(8): 583-592.
29. Bernard V, Skorpikova J, Mornstein V, Slaninova I. Biological effects of combined ultrasound and cisplatin treatment on ovarian carcinoma cells. *Ultrasonics* 2010; 50(3): 357-362.
30. Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Nyborg WL, Maeda K, Bang J. Current status of research on biophysical effects of ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20(3): 205-218.
31. Liu Y, Yang H, Sakanishi A. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol Adv* 2006; 24(1): 1-16.
32. Guzmán HR, Nguyen DX, Khan S, Prausnitz MR. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes-I. Quantification of molecular uptake and cell viability. *J Acoust Soc Am* 2001; 110(1): 588-596.
33. Wang XB, Liu QH, Wang P, Wang ZZ, Tong WY, Zhu B, Wang Y, et al. Comparisons among sensitivities of different tumor cells to focused ultrasound in vitro. *Ultrasonics* 2009; 49(6-7): 558-564.
34. Harrison GH, Balcer-Kubiczek EK, Gutierrez PL. In vitro mechanisms of chemopotentialization by tone-burst ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1996; 22(3): 355-362.
35. Paliwal S, Mitragotri S. Therapeutic opportunities in biological responses of ultrasound. *Ultrasonics* 2008; 48(4): 271-278.
36. Saad AH, Hahn GM. Ultrasound-enhanced effects of adriamycin against murine tumors. *Ultrasound Med Biol* 1992; 18(8): 715-723.
37. Barati AH, Mokhtari-Dizaji M. Ultrasound dose fractionation in sonodynamic therapy. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36(6): 880-887.
38. Gustafson DL, Long ME. Alterations in P-glycoprotein expression in mouse tissues by doxorubicin: implications for pharmacokinetics in multiple dosing regimens. *Chem Biol Interact* 2001; 138(1): 43-57.

The Synergistic Effect of Doxorubicin and 150kHz Ultrasound in Low Intensity on Tumor Growth of Adenocarcinoma Breast Cancer in BALB/c Mice

Homa Soleimani¹, Parviz Abdolmaleki², Manijhe Mokhtari-Dizaji³, Tayebeh Toliati⁴ and Abbas Tavasoly⁵

Abstract

Background and Aim: Experiments have showed that the use of combined single or dual frequencies ultrasound irradiation in low-level intensity for treatment of cancer is effective. We investigated the antitumor effect of simultaneous low-intensity, 150 kHz ultrasound, in combination with the anticancer drug doxorubicin (DOX) on breast adenocarcinoma using murine model (BALB/c).

Materials and Methods: Forty-four mice were used in this study. The tumor-bearing mice were divided into five groups, namely, control, sham, drug, drug+US and exposure to ultrasound alone. The administrated dose of DOX was 2 mg/kg (iv), and the time of exposure was 30 minutes. The data were analyzed employing ANOVA using SPSS software V.13.

Results: We showed that, after the injection of DOX, exposure to ultrasound at 150 kHz_{con} potentiates the effect of doxorubicin on the growth of adenocarcinoma tumors compared to control group by two folds. The tumor growth inhibition percent in the groups treated by ultrasound and doxorubicin showed an increase compared with the group treated with doxorubicin alone. The total tumor growth inhibition percent (days 3-21) in the drug alone, drug+150 kHz groups was 23(%), 55(%), respectively. There was also a significant difference between the drug-treated group and the drug+US groups in times needed for each tumor to reach 2 and 7 times its initial volume (T₂ and T₇).

Conclusion: The co-administration of DOX and low-intensity ultrasound provided a more effective treatment than the drug alone in murine breast cancer. The combined treatment appeared to produce synergistic effects that are potentially useful in reducing the side effects of DOX by lowering the required effective dose of the drug while increasing the efficiency of the therapy as a whole.

Keywords: Acoustic cavitations, BALB/c mouse, breast cancer, doxorubicin, ultrasound

Received: 5 April 2011

Revised: 13 August 2011

Accepted: 14 September 2011

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2011; Vol. 17, No. 4

1- MSc, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- **Corresponding Author:** PhD, Associate Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 82883404

Fax: +98 21 82884717

E-mail: parviz@modares.ac.ir

3- PhD, Professor, Department of Medical Physics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- PhD, Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- PhD, Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran