

## مقایسه روش‌های درمانی شامل: شیمی درمانی با دوکسوروبیسین، اولتراسونوگرافی ۱۵۰ KHz و ترکیب این دو روش در ایجاد مناطق نکروزه با روش هیستوپاتولوژی در تومور ادنوکارسینومای پستان موش

سحر غفاری خلیق<sup>۱</sup> عباس توسلی<sup>۱\*</sup> سید حسین مرجانمهر<sup>۱</sup> هماسلیمانی<sup>۲</sup> عباس جواهری وایقان<sup>۳</sup>

(۱) بخش پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) بخش فیزیولوژی، دانشکده فیزیولوژی و فیزیوپاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(۳) بخش پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

(دریافت مقاله: ۶ شهریور ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۲۷ آبان ماه ۱۳۹۵)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** سرطان پستان به تنهایی ۲۸٪ از همه موارد سرطان را در میان زنان تشکیل داده است. اگرچه شیمی درمانی نقش بسیار مهمی در درمان سرطان دارد، با این حال استفاده از داروهای ضد سرطان اثر نامطلوب خود را بر روی بافت نرمال هم می‌گذارد. لذا همواره دانشمندان به دنبال روشی برای کاهش دوز مصرفی این داروها بوده‌اند. هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثر هم افزایی امواج فراصوت ۱۵۰ KHz با شدت کم در ترکیب با داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین با دوز کاهش یافته در درمان رایج‌ترین سرطان پستان (ادنوکارسینوما) انجام شد. روش کار: در این مطالعه ۲۵ موش ماده نژاد BALB/C انتخاب و تومور ادنوکارسینوما با روش جراحی در زیر پوست پستان آن‌ها کاشته شد. موش‌های دارای تومور به پنج گروه شامل شاهد، شام، تزریق وریدی دوکسوروبیسین (۲ mg/kg)، امواج فراصوت (۱۵۰ KHz) و امواج + دارو (در غلظت ۱ mg/kg) تقسیم و تحت درمان قرار گرفتند. نتایج درمان تومور بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز ANOVA در محیط نرم افزار نسخه ۱۳ SPSS و تست تکمیلی توکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: پس از تزریق دوکسوروبیسین و قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت به مدت ۱۵ دقیقه مناطق نکروزه در تومور ادنوکارسینوم در مقایسه با گروه کنترل و شام افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.001$ ). همچنین در مقایسه بین گروه دارو + امواج با گروهی که تنها دارو دریافت کرده بودند گروه دریافت کننده امواج رشد مناطق نکروزه بیشتری را نسبت به حجم کل تومور نشان داد ( $p < 0.05$ ). نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این مطالعه حاکی از این است که استفاده از امواج فراصوت با شدت کم می‌تواند در کاهش دوز داروی دوکسوروبیسین در درمان ادنوکارسینومای پستانی مؤثر واقع گردد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، دوکسوروبیسین، امواج فراصوت در فرکانس پایین، نکروز، حفره سازی صوتی

### مقدمه

استفاده از شیمی درمانی ترکیبی مشکلی را حل نکرده است (۴). از طرفی روش‌های مرسوم برای جستجوی داروهایی با خاصیت انتخابی بیشتر و قوی‌تر که مستعد ایجاد مقاومت نباشند، چندان موفق نبوده‌اند و در نتیجه نیاز به توسعه روش‌های جایگزین برای غلبه بر این مسائل وجود دارد (۲۲). از سوی دیگر پژوهش در زمینه اثرات زیستی فراصوت و کاربردهای آن رو به گسترش است. به طور معمول اثرات زیستی در معرض قرار گرفتن تابش فراصوت شامل سه پدیده حرارت، اثر مکانیکی و پدیده حفره‌سازی صوتی است، اما این سه پدیده به شیوه یکسان عمل نمی‌کنند. در پدیده حفره سازی صوتی، فراصوت با تجزیه مولکول آب تولید رادیکال آزاد می‌کند. نخستین مرحله در تجزیه آب تولید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌باشد. گونه‌های دیگر از قبیل هیدروژن پر اکسید، اکسیژن منفرد یون سوپر اکسیدبستگی به شرایط خاص بعدی دارند. همچنین مطالعات نشان می‌دهد اثرات زیستی کاربرد امواج فراصوت وابسته به شدت و فرکانس هستند (۱۳، ۱۱).

ویژگی امواج فراصوت با شدت بالاتر، تولید حرارت و با فرکانس پایین‌تر، ایجاد حفره می‌باشد. تابش امواج فراصوت به بافت باعث تغییرات

سرطان پستان، ریه و برونش و کلورکتوم در زنان، همچنان به عنوان شایع‌ترین سرطان‌های کشنده شناخته می‌شوند. بر اساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۱۰ سرطان پستان به تنهایی ۲۸٪ از همه موارد سرطان را در میان زنان آمریکایی تشکیل داده است. اگرچه شیمی درمانی نقش بسیار مهمی در درمان سرطان دارد، با این حال استفاده از عوامل ضد سرطان اثر نامطلوب خود را بر روی بافت نرمال می‌گذارد (۱۲).

آنتراسایکلین دوکسوروبیسین و هم خانواده آن بیش از ۳۰ سال است که برای درمان انواع سرطان‌ها مورد استفاده بوده‌اند (۱۲). آن‌ها در مراحل اولیه و پیشرفته سرطان پستان استفاده می‌شوند، اما سمیت قابل توجه حاد و مزمنی را دارا هستند (۲۵، ۵). اثر سیتوتوکسیک دارو از طریق مکانیسم‌های واسطه مختلف به نسل گونه‌های اکسیژن نسبت داده شده است (۵). استفاده بالینی از دوکسوروبیسین باتوجه به سمیت آن، به ویژه کاردیوتوکسیسیتهی تجمع‌ی وابسته به دوز و نیز به علت توسعه مقاومت در برابر دارو محدود شده است. متأسفانه به آنکه مقاومت در برابر دارو علت مهم برای نارسایی شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان بوده است، حتی



وجود می‌آید که با اعمال امواج فراصوت امکان کاهش دوز دارو وجود داشته در حالی که حفظ بقا و یا حتی افزایش بهره‌وری درمانی حفظ گردد و در نتیجه، تحمل بیمار به شیمی درمانی افزونی یابد (۳۷).

هدف از مطالعه حاضر بررسی هیستوپاتولوژی مقاطع توموری که تحت درمان با سه روش مختلف ۱. داروی دوکسوروبیسین ۲. داروی دوکسوروبیسین با دوز کاهش یافته همراه با تابش امواج فراصوت باشد و اندازه‌گیری وسعت ناحیه نکروزه در تومور ادنوکارسینوما پستانی در موش ماده می‌باشد که آیا وسعت ناحیه نکروزه در تومورهای فوق با توجه به روش‌های مختلف درمانی ذکر شده تفاوت معنی‌داری خواهد داشت یا خیر.

### مواد و روش کار

**مواد:** دوکسوروبیسین هیدروکلراید از EBWE,Pharma Unterach ۴۸۶۶-Ges.m.B.H.Nfg.KG,A استرالیا و کتامین و گزایلین از سیگما-الدریج و فرمالین ۳۷٪/ورنگ هماتوکسیلین و اتوزین.

**حیوانات و گروه بندی:** طراحی آزمایش در شرایط درون تنی به گونه‌ای بود که ۲۵ موش ماده BALB/C با سن ۴-۵ هفته از موسسه پاستور تهران خریداری شد. مراقبت از آن‌ها از نظر حمل و نقل، رطوبت، دما، آب و غذا در شرایط استاندارد انجام گرفت و در ۵ گروه (۵ موش در هر گروه) کنترل، شم (در آب ۱۵ دقیقه بدون تابش امواج فراصوت)، دارو به تنهایی (تزریق ۲mg/kg دوکسوروبیسین)، تابش امواج فراصوت (۱۵۰ kHz با شدت ۲ w/cm<sup>۲</sup> بدون تزریق داروی دوکسوروبیسین) و تزریق+تابش (تزریق ۱mg/kg داروی دوکسوروبیسین همراه با تابش امواج فراصوت ۱۵۰ kHz با شدت ۲ w/cm<sup>۲</sup>) تحت تیمار قرار گرفتند.

گروه کنترل به عنوان گروه کنترل مثبت با القای تومور ادنوکارسینوما بود. لازم به ذکر است که در گروه کنترل هیچ تزریق یا تابشی بر روی تومور رشد یافته انجام نگرفت. در گروه شم موش‌ها پس از بیهوشی تنها در محفظه آب (با دمای در حدود ۳۶-۳۷°C) که جهت تابش امواج فراصوت در نظر گرفته شده بود به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند بدون آنکه هیچ تابشی از امواج فراصوت دریافت کنند تا تأثیر قرار گیری حیوان در داخل آب و تغییرات ایجاد شده احتمالی در رشد تومور پس از این مرحله قابل بررسی باشد. در گروه دارو درمانی به منظور انتخاب حداقل یک دوز از دوکسوروبیسین و اثر بخشی آن با توجه به مقالات (۱۸،۲۱) مقدار دوکسوروبیسین در گروهی که فقط دارو دریافت می‌کردند ۲mg/kg و در گروهی که هم دارو و هم تابش فراصوت ۱۵۰ kHz دریافت می‌کردند به ۱mg/kg تعیین شد. محلول دارویی با حجم مناسبی از محلول نمکی بافر فسفات رقیق شده و تزریق از طریق ورید دمی انجام گرفت و پس از ۳۰ دقیقه از تزریق دوکسوروبیسین حیوان بیهوش شده در گروه دارو+تابش در مقابل مبدل فراصوت در محفظه آب جهت تابش امواج فراصوت ۱۵۰ kHz

ساختاری و عملکردی می‌گردد. تغییرات ساختاری شامل دامنه‌ای از آسیب خفیف اما قابل ترمیم تا مرگ سلولی است و تغییرات عملکردی عبارت از تکثیر، مهاجرت، سنتز، ترشح، بیان ژن و... است (۱۳، ۷) پژوهشگران بسیاری بر این باورند که حفره‌سازی (مکانیسم اثر توام همزمان میان داروهای ضد سرطان و فراصوت با شدت پایین) عامل ایجاد رادیکال‌های آزاد تولید شده است. این پدیده می‌تواند به غشاء سلولی صدمه بزند و در نتیجه نقل و انتقال غشاء و فرآیندهای نفوذ پذیری غشایی را تغییر دهد در حالیکه به اتفاق آراء هیچ نتیجه‌گیری در مورد تغییرات ساختاری گزارش نشده است. این فرآیندهای غشایی منجر به افزایش در تجمع مواد دارویی در داخل سلول می‌گردد (۲۷). به عبارتی واژه پوریشن عبارت از انتقال منافذ آبرگیز به سمت منافذ آب دوست است. وقتی که چرخش سرهای قطبی، سطح آب دوست را به سوی منافذ بیاورد، این انتقال ایجاد منافذ استوانه‌ای می‌کند. استفاده از پالس‌های فراصوت در ترکیب با میکروبابل‌ها که به جدار سلول‌ها می‌چسبند، ایجاد نیروی برشی در عرض غشا می‌کند که منجر به تشکیل منافذ می‌شود که یک مرتبه نیروی شکست بیش از حدی را در غشا ایجاد می‌کند و سرعت نوسانات میکروبابل‌ها را ایجاد کرده که ایجاد جریان مایعی روی سطح سلول می‌کند که به این جریان میکروجریان می‌گویند و احتمالاً مسئول اختلال در غشای سلولی توسط گسستگی در غشای دو لایه لیپیدی است (۱۴). در نتیجه با توجه به هدف زیستی مورد نظر، هنگام استفاده از امواج فراصوت در درمان، پارامترهای صوتی باید با دقت انتخاب شوند (۲۷).

از سال ۱۹۷۵ مطالعات زیادی بر روی کاربرد ترکیبی داروهای ضد سرطان و امواج فراصوت صورت گرفته است. گزارشات حاکی از آنند که اثرات سمی داروهای ضد سرطان و حساسیت شیمیایی تومورهای سرطانی در حضور امواج فراصوت با شدت بالا افزایش یافته است (۱،۷).

از طرف دیگر تحقیقات بر روی اثرات زیستی و کاربرد فراصوت با شدت نسبتاً کم در بافت‌های بدخیم هنوز در حال بررسی است. استفاده از امواج فراصوت با شدت کم دارای پتانسیل بسیار زیاد بوده و می‌تواند به راحتی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات نشان می‌دهد که پاسخ سلول‌های بدخیم به فراصوت با شدت کم نسبت به سلول‌های طبیعی یکسان نیست و در این شرایط سلول‌های سرطانی بیشتر مستعد کشته شدن هستند (۱۴). فراصوت با شدت کم، باعث سرکوب تکثیر سلولی و تشکیل کلون، افزایش اثر مواد شیمیایی ضد سرطان و غیر فعال کردن سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های غیر مستقیم می‌شود (۱۴، ۱۶، ۱۱). این یافته‌ها آشکار می‌کند که فراصوت با شدت کم، به عنوان تکنیکی برای درمان سرطان توانایی خاصی دارد. قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت با شدت کم، می‌تواند سمیت سلولی مواد شیمیایی ضد سرطان را در سلول‌های سرطانی افزایش دهد. تاجایی که اگر همان غلظت عوامل سیتوتوکسیک استفاده شود و اگر فراصوت اعمال شود، بیشتر سلول‌های سرطانی کشته می‌شوند، بدین ترتیب این احتمال به



روش بدون درد کشته شده و بافت توموری از بدن آن‌ها جدا گردید و به وسیله برش ساجیتال بر روی بزرگترین قطر تومور به دو قسمت تقسیم شد و در داخل فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت تا برای انجام پروسه بافتی و تهیه لام و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین اتوزین آماده گردد. پردازش نمونه‌های توموری شامل کاهش آب بافتی با الکل، پاکسازی با گزیل و اشباع با پارافین ذوب شده بودند سپس نمونه‌های توموری درون پارافین قالب‌گیری شده و با ضخامت ۵ μ با میکروتوم برش داده شدند و بعد با هماتوکسیلین اتوزین روش لونا رنگ آمیزی شدند (۱۶).

پس از برداشت تومور در روز ششم و انجام مراحل فیکس و تهیه بلوک پارافینی و برش و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، تمامی لام‌های تهیه شده به وسیله دستگاه اسکنر لام Path Scan Enabler IV شرکت Plustek اسکن شده و سپس به وسیله برنامه Axio Vision LE Rel4/5 مساحت کل تومور و مساحت ناحیه نکرور از آن براساس میکرو متر مربع اندازه‌گیری شد و نسبت مساحت ناحیه نکرور به مساحت کل تومور در ناحیه برش ساجیتال به درصد محاسبه گردید. میانگین خطای میانگین استاندارد (Mean±SEM) نسبت‌های به دست آمده از گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با آزمون ANOVA و تست تکمیلی توکی در سطح معنی‌داری (p<0/05) با هم مقایسه شدند.

### نتایج

اسکن لام‌های تهیه شده از نمونه‌های کنترل، شم، تزریق داروی تنها، امواج تنها و تزریق دارو + تابش به ترتیب در تصاویر ۲ تا ۶ نمایش داده شده‌اند.

میانگین ± خطای میانگین استاندارد (Mean±SEM) در صد مساحت ناحیه نکرور به مساحت کل تومور در گروه کنترل ۳/۷۱±۸/۳۳٪، در گروه شم ۳/۶۷±۱۰/۶۶٪ و گروه تزریق دو کسورویسین به تنهایی ۴/۸۴±۳۶/۱۷٪ و در گروه تابش ۱۵۰ KHz، ۹/۱۱±۳۷/۷۹٪ و در گروه تزریق دو کسورویسین همراه با تابش فراصوت به میزان ۸/۴۶±۴۸/۹۳٪ محاسبه گردید (نمودار ۱).

آنالیز آماری نتایج نشان داد که نسبت مساحت نکرور در دو گروه کنترل و شم به طور معنی‌دار از تمام گروه‌های درمان کمتر بود (p<0/001) در حالیکه در مقایسه بین این دو گروه (کنترل و شم) اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نگردید (p>0/05).

در مقایسه بین گروه‌های درمان، نسبت مساحت نکرور تومور در گروه تزریق + تابش از دو گروه تابش تنها و تزریق تنها بیشتر دیده شد. این اختلاف بین گروه تزریق + تابش و گروه تزریق تنها معنی‌دار (p<0/05) و بین گروه‌های تزریق + تابش و تابش تنها غیر معنی‌دار بود (p>0/05). همچنین در مقایسه بین دو گروه تابش تنها و تزریق تنها نیز اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نگردید (p>0/05).

قرار داده شد. در گروه فراصوت درمانی به تنهایی موش‌ها پس از بیهوشی به مدت ۱۵ دقیقه در مقابل مبدل فراصوت در محفظه آب مورد تابش امواج فراصوت ۱۵۰ KHz قرار گرفتند (تصویر ۱).

دستگاه سونوگرافی استفاده شده یک مبدل پیزوالکتریک ۱۵۰ kHz با قطر پروب ۳۰ mm و به مساحت تابش مؤثر ۵ cm<sup>۲</sup> بود. (Medical Co., UK SM3678B, Shrewsbury) برای کسب اطمینان از این که حداکثر انرژی صوتی در ضمن تیمار به موش‌ها می‌رسد در آغاز قدرت و شدت دستگاه در محفظه آب عاری از گاز با روش هیدروفون در محفظه مکعب (Denmark, Bruel&Kjaer model 8103) آزمایش شد. اطلاعات بدست آمده شامل شاخص نشانگر چگونگی توزیع انرژی در داخل محفظه پر توده‌ای از نظر میانگین زمانی و میانگین فضایی محاسبه شد. این دستگاه مجهز به تایمر دیجیتالی بود که در تمام مراحل آزمایش‌های فراصوت مورد استفاده قرار گرفت و پروب دستگاه در محفظه پر از آب غوطه ور شد. درجه حرارت آب در طول ۱۵ دقیقه تابش دهی با استفاده از ترموکوپل (Lutron Electronic Enterprise, TP-01) روی صفحه کامپیوتر نشان داده شد و در تمام مراحل تابش دهی، برای کسب اطمینان از ثابت ماندن دما، یک ترموکوپل در مجاورت تومور قرار داده شد و در تمام مراحل حرارت در زیر دمای آستانه (۴۰-۴۲ C) برای محیط زیستی بود.

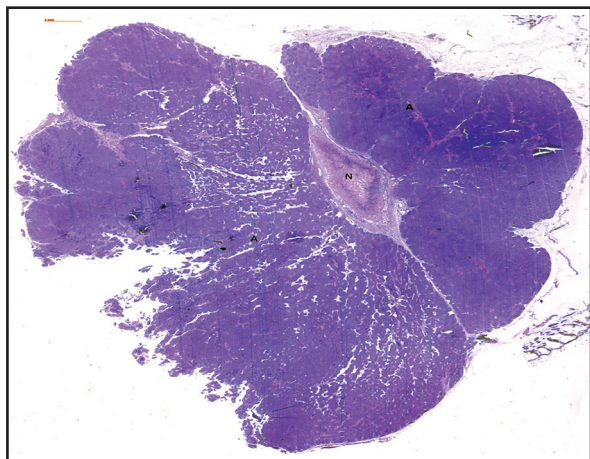
**القا تومور ادنوکارسینوما:** پس از یک هفته از زمان خرید و انتقال موش‌ها به آزمایشگاه هر پنج گروه تحت پیوند تومور ادنوکارسینوما قرار گرفتند. تومور منبع متعلق به یک موش ماده نژاد BALB/C بود که خودبه خود در گیر ادنوکارسینوم پستان شده بود. این منبع از بخش ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شد. محلول کتامین گزاییلین به نسبت ۲:۱ با ۸/۵ ml محلول نمکی بافر فسفات به حجم ۱۰ ml 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 ۲-۳ mm<sup>۲</sup> در داخل بافر نمکی فسفات تقسیم گردید. همزمان موش‌های گیرنده در تمامی گروه‌ها مانند روش فوق بیهوش شد و یک قطعه از تومور استخراجی عاری از بافت نکرور و چربی تحت شرایط استریل به زیر پوست پهلوی چپ در نزدیکی غددشیری حیوان پیوند شد. پس از یک هفته از پیوند تومور با استفاده از کرم مو بر موهای سطح پوست منطقه تومور پاکسازی و میزان حجم تومور رشد یافته توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد و حجم تومور بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (۲۰).

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

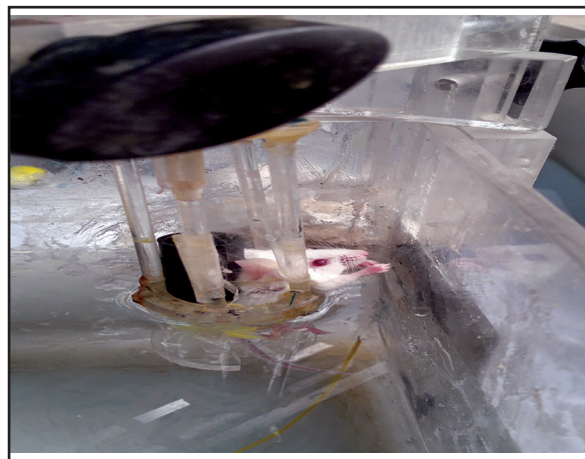
تومورها هر دو یا سه روز یکبار اندازه‌گیری شده تا قطر تومور تقریباً به ۸-۹ mm رسید. سپس موش‌ها از تمام گروه‌ها برای درمان طبق روش فوق الذکر بیهوش شدند و به روش ذکر شده در بالا مورد درمان قرار گرفتند. پس از درمان، در روز ششم موش‌ها به وسیله بیهوشی استنشاقی با اثر به



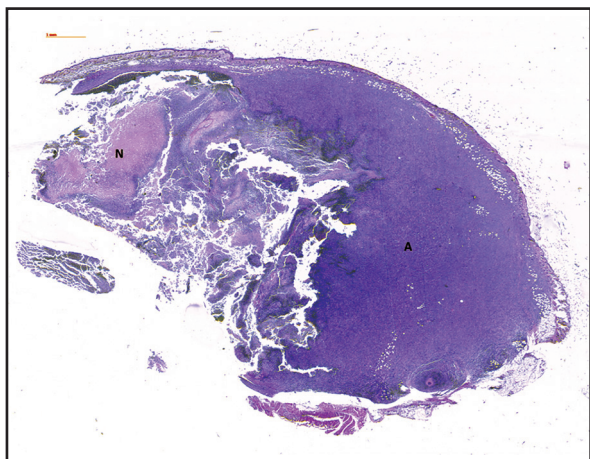




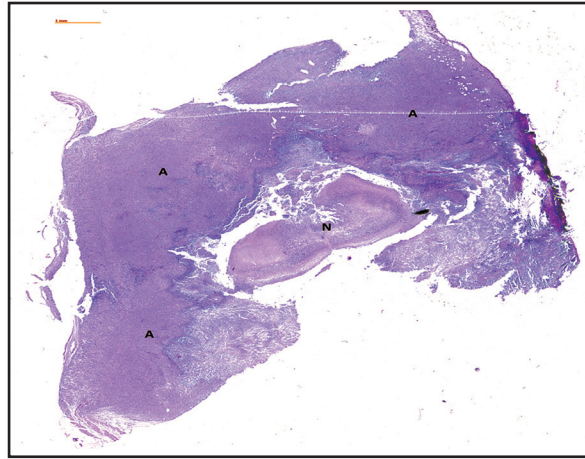
تصویر ۲. اسکن نمونه کنترل با رنگ آمیزی H&E، ۵۰x. منطقه نکروزه (N) در مرکز تومور ورشد غده ای تومورادنو کارسینوما (A).



تصویر ۱. نحوه قرار گرفتن حیوان در داخل محفظه آب در مقابل پروب اولتراسوند.



تصویر ۴. اسکن نمونه تزریق دو کسورویسین به میزان ۲mg/kg با رنگ آمیزی H&E، ۵۰x. منطقه نکروزه (N) در مرکز تومور و رشد غده ای تومور ادنو کارسینوما (A).



تصویر ۳. اسکن از نمونه شام با رنگ آمیزی H&E، ۵۰x. منطقه نکروزه (N) مرکز تومورورشد غده ای تومور ادنو کارسینوما (A).

مستقیم می‌تواند مرگ سلولی را از طریق تحلیل تدریجی سلول، نکروز و یا آپاپتوز القا کند (۳). از اثرات بالقوه فراصوت در بافت می‌توان به افزایش قابلیت عبور دارو و پدیده حفره سازی صوتی به عنوان مهمترین مکانیسم غیر حرارتی اشاره کرد.

حبابچه‌های حاصل از پدیده حفره سازی می‌تواند منجر به القا نفوذپذیری گذرا در غشای سلول و یا مرگ سلولی گردد (۱۵). به گونه‌ای که تعامل فراصوت و توده مایع منجر به پدیده‌ای کاملاً منحصر به فرد بنام حفره سازی باغلظت بسیار زیاد و تبدیل انرژی منتشره صوت می‌شود. از لحاظ تاریخچه، حفره سازی به دو نوع گذرا (غیر ساکن) و غیر گذرا (ساکن) طبقه‌بندی شده است. حباب حاصل از پدیده حفره‌سازی غیر گذرا حول وحوش یک شعاع نوسان می‌کند و اغلب برای بسیاری از چرخه‌های اکوستیکی در حال تعادل باقی می‌ماند. در نتیجه این نوسانات، جریانی از مایع در اطراف رخ می‌دهد و تنش مکانیکی ایجاد آشفستگی در محیط می‌کند. حفره‌های گذرا حباب‌های گازی هستند که تا اندازه نزدیک تشدید رشد می‌کنند و ممکن است قبل از فرورویختن (ترکیدن) به حداکثر گسترش

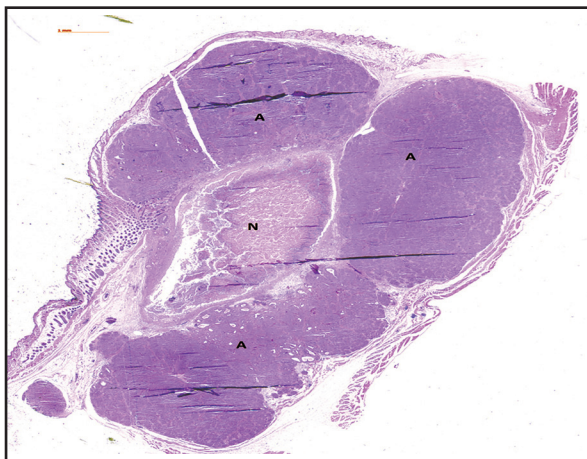
## بحث

یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت بافت توموری علیه تعداد قابل توجهی از عوامل شیمی درمانی، نفوذ ناکامد دارو به داخل بافت توموری و یا به داخل سلول‌های سرطانی است. شواهد متعددی نشان دهنده توزیع نامناسب و ناکافی بسیاری از داروهای ضد سرطان در بافت تومور است. در نتیجه نیاز شدیدی به یافتن استراتژی نوین وجود دارد که کاربرد آن‌ها باعث بهبود نفوذ داروها به داخل بافت توموری و نهایتاً افزایش شاخص درمانی شود (۱۷).

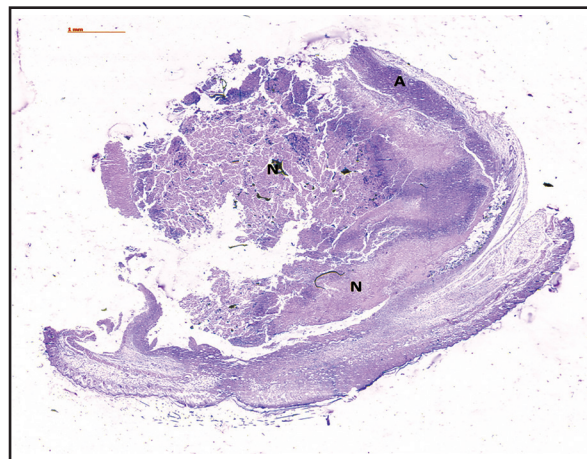
امواج فراصوت منجر به افزایش تخلخل غشای سلولی می‌شود و این اثر اجازه ورود مؤثر و تجمع داروهای ضد سرطان به داخل سلول را می‌دهد. از این طریق ضمن حفظ حداکثر اثر بخشی، با هم افزایی فراصوت امکان استفاده از دوزهای پایین تری از داروی سایتوتوکسیک وجود دارد. از این طریق اثر دارو در مناطق خاص و تعیین شده تشدید می‌گردد (۴).

در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده شده است که فراصوت به طور





تصویر ۶. اسکن نمونه درمان با تزریق ۱mg/kg توام با امواج فرا صوت ۱۵۰kHz با رنگ آمیزی H&E، ۵۰x. وسعت زیاد نکرور (N) رشد محدود تومور ادنو کارسینوما (A).



تصویر ۵. اسکن نمونه درمان با امواج فرا صوت ۱۵۰kHz با رنگ آمیزی H&E، ۵۰x. منطقه نکرور (N) و رشد غده‌ای تومور ادنو کارسینوما (A).

انرژی بر روی حجم کوچکی از بافت را حفظ نماید که منجر به ضریب میرایی مناسبی برای بافت می‌گردد که از آن می‌توان در درمان غیر تهاجمی تومورهای غیر سطحی استفاده کرد. فراصوت با این ویژگی‌ها در مقایسه با روش‌های الکترومغناطیسی مانند اشعه لیزر دارای ارجحیت کاربردی بیشتری می‌باشد (۳۳).

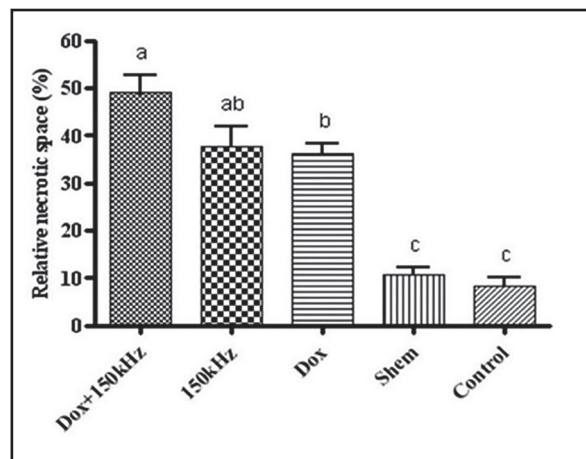
تحقیقات حاکی از آن است که کاربرد فراصوت سمیت سلولی دوکسوروبیسین را در محیط‌های آزمایشگاهی و در شرایط هایپرترمی و دوزهای بالای آدریامایسین (۱۰-۲۰ mg/kg) در شرایط درون تنی افزایش می‌دهد (۲۷، ۱۸، ۱۰). همچنین مطالعات دیگری به وضوح سودمندی هم افزایی امواج فراصوت و دوکسوروبیسین را در سطح سلولی نشان داده است (۱۰).

بدیهی است که شرایط آزمایشگاهی و شرایط درون تنی موجود زنده همواره یکسان نیست. به عنوان مثال Minchinton و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که تعدادی از عوامل ضد سرطان که در کشتن سلول‌های تک لایه تومور مؤثر بودند، قادر به رسیدن به سلول‌های تومور در داخل بدن نیستند (۱۷).

با این وجود، آزمایش‌های تکمیلی در شرایط درون تنی موجود زنده در جهت کاهش دوز داروی دوکسوروبیسین و اثر همزمان آن در کنار امواج فراصوت با شدت پایین مناسب در مدل‌های حیوانی، می‌تواند مقدمه‌ای برای تعمیم نتایج به سطح کاربردهای کلینیکی ایمن و مؤثرتر باشد.

در مطالعه حاضر اثر هم افزایی بین کاربرد فراصوت و دوکسوروبیسین در محیط داخل بدن بررسی شد. این مطالعه شامل مجموعه‌ای از آزمایش‌ها با استفاده از پروتکلی شامل درمان به صورت تک دوز از دوکسوروبیسین و امواج فراصوت بود. زمان پرتوهی به دنبال مطالعات قبلی برگزیده شد (۲، ۱۸). همچنین میزان دوکسوروبیسین بر اساس نتایج مطالعات محققین انتخاب شد (۲۱، ۱۸، ۸، ۶).

ارزایی‌ها نشان داد که ترکیب فراصوت با شدت کم با دوکسوروبیسین



نمودار ۱. میانگین  $\pm$  خطای میانگین استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) نسبت مساحت نکرور به مساحت کل تومور در گروه‌های کنترل (Control)، شام (Sham)، تزریق دوکسوروبیسین (Dox) به میزان ۲mg/kg، تابش (۱۵۰kHz) و گروه تزریق ۱mg/kg + تابش (۱۵۰kHz+Dox). حروف لاتین نامشابه در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

برسند و پس از اندک زمانی سقوط گذرا دچار رمبش (کلاپس) شده تولید فشار و درجه حرارت بالایی در آن موضع نموده این شرایط ممکن است باعث القاء بسیاری از واکنش‌های شیمیایی در داخل و اطراف حباب شود، همزمان با تابش اولترا سوند، ملکول‌ها می‌توانند با از هم گسیختگی که در غشا سلول توسط مکانیسمی که باعث حفره سازی می‌شود، وارد سلول شوند (۳۹). از طرفی رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط حفره سازی می‌تواند به غشا سلولی صدمه بزند و از طریق تغییر در نفوذ پذیری غشایی نقل و انتقال مواد از غشا را تغییر دهند. در نتیجه این تغییرات روند حمل و نقل دارو بهبود می‌یابد و این فرایندها منجر به افزایش تجمع مواد دارویی در داخل سلول می‌گردد (۲۷).

کاربرد فراصوت با شدت کم به صورت غیر تهاجمی با داروهای ضد سرطان می‌تواند اندازه تومور و احتمال عود مجدد آن را کاهش داده و میزان عوارض جانبی شدید آن را نیز کم کند (۱۴). همچنین فراصوت به ویژه می‌تواند به طور عمیق تری در بافت نفوذ کرده و توانایی تمرکز





پستان موش BALB/C می‌باشد.

### تشکر و قدرانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دکترای تخصصی می‌باشد و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت مالی و پژوهشی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدرانی نموده و همچنین از همکاری جناب آقای مهندس رضا سامانی کارشناس محترم گروه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت تهیه لام‌های پاتولوژی کمال تشکر و قدرانی را دارد.

### References

1. Alter, A., Rozenszajn, L.A., Miller, H.I., Rosen-schein, U. (1998) Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 24: 711-721.
2. Barati, A.H., Mokhtari-Dizaji, M., Mozdarani, H., Bathaie, S.Z., Hassan, Z.M. (2009) Treatment of murine tumors using dual-frequency ultrasound in an experimental in vivo models. *Ultrasound Med Biol.* 35: 756-763.
3. Barnett, S.B., Ter Haar, G.R., Ziskin, M.C., Nyborg, W.L., Maeda, K., Bang, J. (1994) Current status of research on biophysical effects of ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 20: 205-218.
4. Bernard, V., Skorpikova, J., Mornstein, V., Slaninova, I. (2010) Biological effects of combined ultrasound and cisplatin treatment on ovarian carcinoma cells. *Ultrasonics.* 50: 357-362.
5. Bouma, J., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, W.J.M. (1986) Anthracycline antitumor agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties. *Pharm world Sci.* 8: 109-133.
6. Colombo, T., Donelli, M.G., Urso, R., Dallarda, S., Bartosek, I., Guaitani, A. (1989) Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats. *Exp Gerontol.* 24: 159-171.
7. Doan, N., Reber, P., Meghji, S., Harris, M. (1999) In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg.* 57: 409-419.
8. Gustafson, D.L., Lond, M.E. (2001) Alterations

اثر قابل توجهی بر رشد تومور آدنوکارسینوم پستان در مدل حیوانی BALB/C دارد. در این تحقیق تفاوت آشکار در نسبت مساحت ناحیه نکروزه به کل مساحت تومور ایجاد شده در گروه درمانی توام با دوز کاهش یافته دوکسوروبیسین و امواج فراصوت با شدت پایین با گروه‌های غیر درمانی کنترل و ششم و همچنین گروه‌های درمانی که تنها از داروی دوکسوروبیسین دریافت کرده بودند دیده شد به گونه‌ای که نسبت مساحت ناحیه نکروزه به مساحت کل تومور در گروه درمانی دوکسوروبیسین + امواج فراصوت به طور معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) از گروه کنترل و ششم وسیع‌تر بود. همچنین این اختلاف معنی‌دار از نسبت مساحت ناحیه نکروزه به کل تومور در مقایسه گروه فوق (درمان توام دوکسوروبیسین + امواج فراصوت) با گروه درمانی که تنها از داروی دوکسوروبیسین دریافت کرده بودند نیز دیده شد از آنجا که در گروه درمانی توام با دوکسوروبیسین و امواج فراصوت از دوز کاهش یافته دارو به میزان  $1\text{mg/kg}$  استفاده شد، خود تأییدی دیگر بر افزایش اثر بخشی بیولوژیکی دارو به واسطه کاربرد فراصوت می‌باشد.

از طرفی اختلاف معنی‌دار بین گروه درمانی توام (فراصوت + دوکسوروبیسین) و گروه درمانی که به تنهایی امواج فراصوت با شدت کم دریافت کرده بودند وجود نداشت ( $p < 0/05$ ) که می‌توان به این نکته اشاره کرد که با توجه به مدت زمان و شدت امواج انتخابی احتمال آسیب به غشا سلولی در اثر ایجاد حفره سازی ناشی از تابش به گونه‌ای بوده است که در نهایت باعث آسیب غیر قابل برگشت به دیواره غشا سلولی شده و در اثر این آسیب تبادلات یونی داخل و خارج سلولی دچار اختلال گردیده و در نهایت منجر به نکروز سلولی گشته است.

از طرفی اختلاف معنی‌داری گروه درمانی که تنها از دوکسوروبیسین دریافت کرده بودند و گروه دیگری که تنها از امواج فراصوت دریافت کرده بودند دیده نشد ( $p < 0/05$ ). از آنجا که در گروه درمانی با دوکسوروبیسین به تنهایی از دوز دو برابر شده دارو به میزان  $2\text{mg/kg}$  استفاده شده می‌توان نتیجه گیری کرد که میزان نکروز ایجاد شده در این گروه با میزان نکروز در گروه درمانی که تنها از امواج فراصوت دریافت کرده بودند به نوعی برابری کرده اما از آنجا که دوز دارو به میزان دو برابر افزایش یافته احتمال ایجاد اثرات جانبی مضر نیز به مراتب بالاتر می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج به دست آمده می‌توان ادعا کرد که با استفاده از تلفیق امواج فراصوت  $150\text{kHz}$  با شدت کم  $0/2\text{w/cm}^2$  و دوکسوروبیسین با دوز کاهش یافته  $1\text{mg/kg}$  کارایی درمان افزایش یافته و از طرفی از آنجا که دوز دارو به نصف تقلیل یافته است اثرات سوء جانبی ناشی از داروی شیمی درمانی نیز می‌تواند به حداقل رسیده و از آنجا که مرگ سلولی وسیع ناشی از روش درمانی توام با دوکسوروبیسین و امواج فراصوت در داخل تومور اتفاق افتاده است، افزایش اثر بخشی مؤثر به واسطه اعمال همزمان امواج و دارو و به تبع آن کاهش عوارض جانبی دوکسوروبیسین نوید بخش کارایی روش فوق در درمان آدنوکارسینوم



- in p-glycoprotein expression in mouse tissues by doxorubicin: implications for pharmacokinetics in multiple dosing regimens. *Chem Biol Interact.* 138: 43-57.
9. Guzman, H.R., Nguyen, D.X., Khan, S., Prausnitz, M.R. (2001) Ultrasound-mediated disruption of cell membranes-I. Quantification of molecular uptake and cell validity. *J Acoust Soc Am.* 110: 588-596.
  10. Harrison, G.H., Balcer-Kubiczek, E.K., Gutierrez, P.L. (1996) In vitro mechanisms of chemopotentialization by tone-burst ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 22: 355-362.
  11. Hrazdira, I., Skorikova, J., Dolnikova, M. (1999) ultrasonically induced alterations of Cultured tumor cells. *Eur J Ultrasound.* 8: 43-49.
  12. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 61: 133-4.
  13. Jin, C.B., Wu, F., Wang, Z.B., Chen, W.Z. (2003) High intensity focused ultrasound therapy in combination with trans catheter arterial chemo embolism for advanced hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Oncology.* 25: 401-3.
  14. Lejbkowitz, F., Zviran, M., Salzberg, S. (1993) The response of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 19: 75-82.
  15. Liu, Y., Yang, H., Sakanishi, A. (2006) Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol Adv.* 24: 1-16.
  16. Luna, L.G. (1968) *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* (3<sup>rd</sup> ed.) McGraw-Hill. New York, USA.
  17. Minchinton, A.I., Tannock, I.F. (2006) Drug penetration in solid tumors. *Nat Rev Cancer.* 6: 583-592.
  18. Saad, A.H., Hahn, G.M. (1992) Ultrasound-enhanced effects of Adriamycin against murine tumors. *Ultrasound Med Biol.* 18: 715-723.
  19. Sartiano, G.P., Lynch, W.E., Bullington, W.D. (1979) Mechanism of action of the anthracycline anti-tumor antibiotics, doxorubicin, daunomycin and rubidazole: preferential inhibition of DNA polymerase alpha. *J Antibiot.* 32: 1038-45.
  20. Soleimani, H., Abdolmaleki, P., Mokhtari-Dijazi, M., Toliat, T., Tavasoli, A. (2011) The synergistic effect of Doxorubicin and 150 kHz ultrasound in low intensity on tumor growth of adenocarcinoma breast cancer in BALB/c mice. *Ofogh-e-Danesh. GMUHS J.* 17: 5-14.
  21. Tachibana, K., Uchida, T., Tamura, K., Eguchi, H., Yamashita, N., Ogawa, K. (2000) Enhanced cytotoxic effect of Ara.C by low intensity ultrasound to HL 60 cells. *Cancer Lett.* 149: 189-194.
  22. Wang, S., Konorev, E.A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., Kalyanaraman, B. (2004) Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem.* 279: 25535-43.
  23. Wang, X.B., Liu, Q.H., Wang, P., Wang, Z.Z., Tong, W.Y., Zhu, B., Wang, Y. (2009) Comparisons among sensitivities of different tumor cells to focused ultrasound in vitro. *Ultrasonics.* 49: 558-564.
  24. Wu, F., Wang, Z.B., Chen, W.Z., Zou, J.Z. (2004) extracorporeal high intensity focused ultrasound for treatment of solid carcinomas: four-year Chinese clinical experience. *Ultrasound Med Biol.* 30: 245-60.
  25. Young, R.C., Ozols, R.F., Myers, C.E. (1981) The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med.* 305: 139-153.
  26. Yu, T., Wang, Z., Jiang, S. (2001) Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line AO3 by low-level ultrasound. *Ultrasonics.* 39: 307-309.
  27. Yu, T., Wang, Z., Mason, T.J., (2004) A review of research in to uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason Sonochem.* 11: 95-103.



## Histopathological findings in necrotic spaces developed with doxorubicin and 150 kHz ultrasound at low intensity and a combination of these two methods on adenocarcinoma tumor breast cancer in BALB/c mice

Ghaffari Khaligh, S.<sup>1</sup>, Tavasoli, A.<sup>1\*</sup>, Mardjanmehr, S.H.<sup>1</sup>, Soleimani, H.<sup>2</sup>, Javaheri Vayghan, A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Medical Physics and Physiology, School of Medical Science, Arak university of Medical Science, Arak, Iran

<sup>3</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

(Received 27 August 2016, Accepted 17 November 2016)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women. One in eight women will be diagnosed with breast cancer in their lifetime. Chemotherapy works on active cells. Active cells are cells that are growing and dividing into more of the same type of cell. Cancer cells are active, but so are some healthy cells. Also, scientists work constantly to develop ways of providing treatment with fewer chemotherapy side effects. **OBJECTIVES:** The aim of this study was antitumor effect of simultaneous low-intensity, 150 kHz ultrasound, in combination with the reduced dose of anticancer drug Doxorubicin (DOX) on breast adenocarcinoma using murine model (BALB/c). **METHODS:** Twenty-five female BALB/c mice were used in this study. The tumor was implanted under the breast skin of mice. Mice were divided into five groups, namely control, sham, drug (IV injected of 2 mg/kg of DOX), drug (IV injected of 1 mg/kg of DOX) + US (150 kHz for 15 minutes) and exposure to ultrasound (150 kHz for 15 minutes) alone. The data were analyzed employing ANOVA using SPSS software V.13 and complementary test of Tooki was done. **RESULTS:** It was shown that, after injection of DOX, exposure to ultrasound at 150 kHz the necrotic spaces in adenocarcinoma tumors compared to control and sham groups have meaningful variance ( $p < 0.001$ ). There was also a significant difference (the bigger the necrotic spaces) between the drug+US group and drug treated group ( $p < 0.05$ ). It should be mentioned that the dose of DOX in drug+US group was reduced to 1mg/kg. **CONCLUSIONS:** The co-administration of DOX and low-intensity ultrasound provided a more effective treatment than the drug alone in murine adenocarcinoma breast cancer. The combined treatment appeared to produce synergistic effects that could prove 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.

**Keyword:** breast cancer, doxorubicin, ultrasound, necrotic space, acoustic cavitation

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** Position of BALB/c mice toward the ultrasound probe.

**Figure 2.** The necrotic spaces (N) within the breast adenocarcinoma (A) in scanned Control slide (H&E 50X).

**Figure 3.** The necrotic spaces (N) within the breast adenocarcinoma (A) in scanned Sham slide (H&E 50X).

**Figure 4.** The necrotic spaces (N) within the breast adenocarcinoma (A) in scanned DOX (2mg/kg) Injected slide (H&E 50X).

**Figure 5.** The necrotic spaces (N) within the breast adenocarcinoma (A) in scanned 150 kHz ultrasound exposure slide (H&E 50X).

**Figure 6.** The necrotic spaces (N) within the breast adenocarcinoma (A) in scanned DOX (1mg/kg) injected+150 kHz ultrasound exposure slide (H&E 50X).

**Graph 1.** Mean±Standard error of mean in 5 different groups: Control, Sham, DOX (2mg/kg), 150kHz(ultrasound), DOX+150kHz (1mg/kg+ ultrasound). the different letters in each vertical column indicate the significant difference between the groups ( $p < 0.05$ ).

\*Corresponding author's email: atavasoli@ut.ac.ir, Tel: 021-61117000, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 71, 4, 2016

