

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

هما سلمانی^۱ - پرویز عبدالملکی^۲ - عنبره مختاری دیرنجی^۳ - طیبه تولست^۱ - عباس تولی^۴

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات انجام شده نشان می دهد که مابش یک به دو پسندیده صورت پیوسته و به متدود در شدت پدیس در درمن سرطان در من حیوانی کاربرد است. اثر هم افزایی موج فراصوت ۱۵۰ کیلوهرتز با شدت کم، در ترکیب با دزوی ضد سرمنش توکسورویسین (DON) بر روی رشد تومور آدنوکارسینومی پستان در شرایط درون منی در مدل حیوانی موش ماده ی BALB/c بررسی گردید. روش تحقیق: در یی مطالعه ی تجربی ۴۴ حیوان مورد بررسی قرار گرفت. موش های دارای تومور به پنج گروه تقسیم شدند: دو گروه درمن شدت ۱ و ۲ که گروه تحت درمن شدت ۱ دارای تومور، موج قند ۱۵۰ دزوی، موج که به ترتیب از طریق دریافت ویدی توکسورویسین ۲ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن، موج به نه دی ۳۰۱ دقیقه و قرار گرفتن در معرض موج فراصوت همراه با دریافت دزوی تحت درمن بودند. نتایج به استفاده از تحلیل واریانس در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه ها: پس از بررسی توکسورویسین و قرار گرفتن در معرض موج فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در دزوی به رشد تومور آدنوکارسینوم در مقایسه با گروه شاهد دزوی بر شدت ۱ و ۲ به ترتیب در گروه های تحت درمن به موج ۱۵۰ دزوی به نه دی به ترتیب به میزان ۵۵ و ۶۶ درصد نسبت به حالت گروه شاهد افزایش شد. داده همچنین تفاوت معنی داری بین دو گروه تحت درمن به دزوی ۱۵۰ دزوی، موج فراصوت در مقادیر معن مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به ۳ و ۶ در حجم اولیه مشاهده شد. نتیجه گیری: تعدیل همزمان مابش موج فراصوت همراه با استفاده از دزوی ضد سرمنش در مقایسه با استفاده از دزوی به نه دی، تفاوت معنی داری را در مقدار رشد تومور آدنوکارسینوم پستان نشان می دهد. **کلیدواژه ها:** موش ماده، موج فراصوت، فرکانس پدیس، سرمنش پستان، توکسورویسین، موش BALB/c

حق نشر: هیأتبه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گیلان (شماره ی ۱۶، شماره ی ۳، پاییز ۱۳۹۰)

دریافت: ۱۳۹۰/۳/۵ - اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۵/۲۲ - پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۳

۱- دانشیار، ۲- استادیار، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- مسئولیت مقاله، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- استادیار، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

پیشین: ۱۳۹۰-۸۳۸۸۳۴۰۴ - شناسه ی مقاله: ۱۳۹۰-۸۳۸۸۳۴۰۴ - سابجکت: آدنوکارسینوم پستان، توکسورویسین، موش BALB/c

۵- استادیار، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۶- استادیار، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۷- استادیار، گروه سونودگ، دانشکده ی علوم پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

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 ۱:۲) 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 (۲-۳ میلی متر مکعب) برش داده شد. همزمان با این عمل موش گیرنده مانند روش فوق بیهوش شد. پوست سینه پهلوی 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):

$$\frac{1}{2} \times (\text{قطر کوچک}) \times (\text{قطر بزرگ}) = (\text{mm}^2) \text{ حجم تومور}$$

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 $250 \pm 50 \text{ cm}^3$ و وزن آن ها 19 ± 3 گرم بود. میزان موفقیت پروتکل درمانی را روزهای متوالی پس از درمان نسبت به گروه شش، به کمک پارامتر درصد مهار در روند رشد تومور و مطابق رابطه ی زیر ارزیابی شد (۲۱):

$$\text{TGI (\%)} = \left(1 - \frac{V_{\text{dayx}}}{V_{\text{sdcy}}}\right) \times 100$$

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، فیبروبلاست 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-فلوئوروئوراسیل^۳، آرابینوسیل 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_{com}
- 6- Homographed

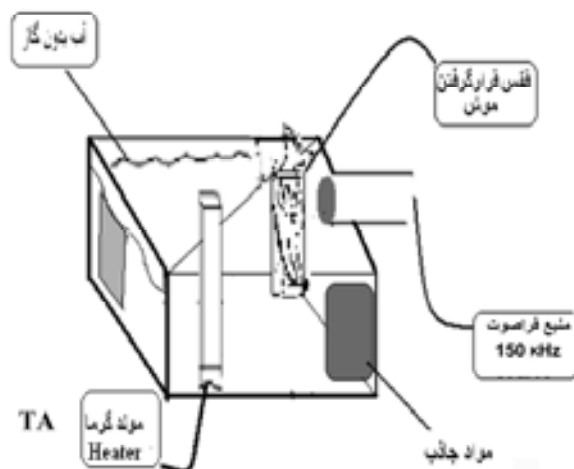
7- Ketamine-Xylazine

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 (۲۳-۲۶)، 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 گولیس مطابق روش بالا اندازه گیری و هر اندازه گیری سه بار تکرار شد. دوره ی بقاء 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.



شکل ۱: ساختمان دستگاه مورد استفاده برای تابش امواج فراصوت تحت شرایط کنترل شده. محفظه به شکل مکعب مستطیل با ابعاد ۲۵ × ۲۵ × ۲۰ سانتی متر، از مواد پلی اکریل ساخته شده بود و از آب عاری از گاز پر شده بود. به منظور انجام آزمایش ها در شرایط تابش امواج و محدود کردن انعکاس صوتی، دیواره های مقابل پروب در سطح داخلی مخزن با مواد جاذب فراصوت پوشانده شده بود.

طراحی آزمایش های *in vivo* موش های ماده ی نژاد

BALB/c به ۵ گروه تقسیم شدند: کنترل، شش (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: شمای

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

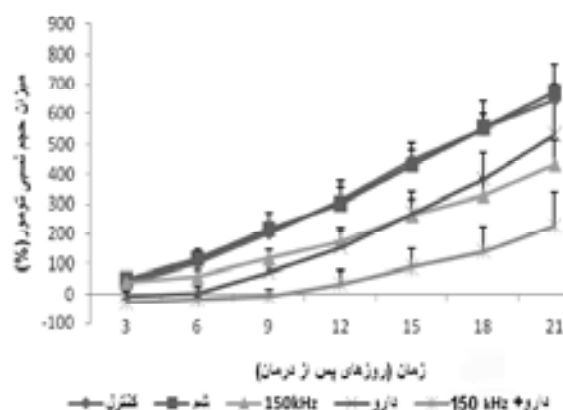
5- Thermocouple

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.

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

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. پرندها از نمونه های بافتی شامل مراحل مختلف کاهش آب بافتی با الکل، پاکسازی با گزیل 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 الئوزین^۲ مطابق روش لونا رنگ آمیزی شدند (۲۷).

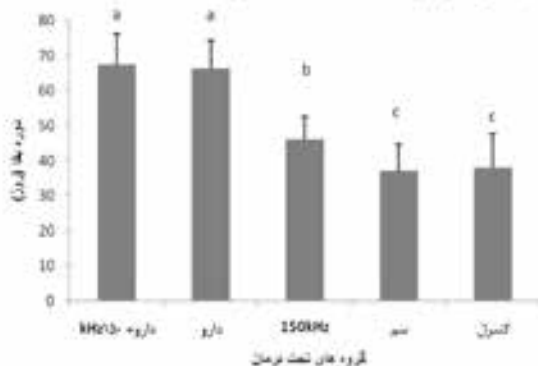
تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آنالیز واریانس انجام شد و به دنبال آن از آزمون تعقیبی کمترین تفاوت معنی دار برای مقایسه ی دو به دو میانگین متغیرها در گروه های مختلف استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده SPSS V.13 (SPSS/PC Inc., Chicago, IL) بود. نتایج در هر گروه ۸-۱۰ تایی به صورت "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

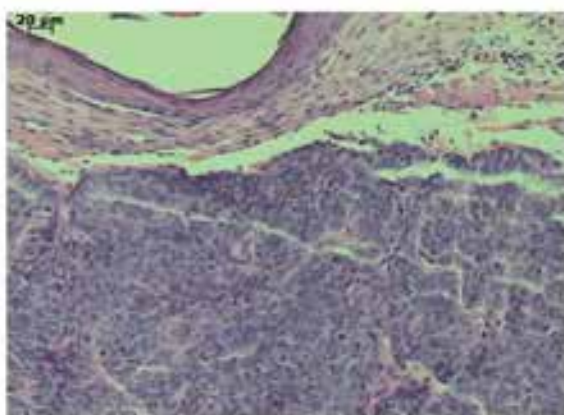
1- Hematoxylin
2- Eosin

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.

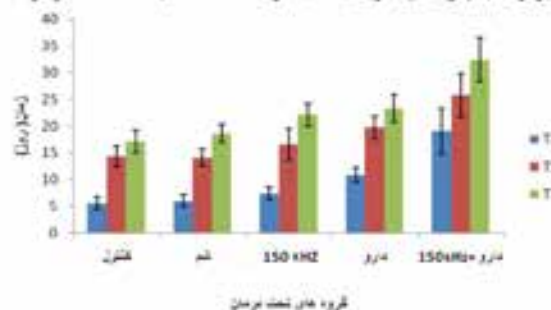
نتایج آسیب شناسی: نتایج بافت شناسی از بافت تومور پیوندی نشان می دهد که تومور از نوع پاپیلومای سرطان پستان است. نشانه های بدخیم آدنوکارسینوم با پلی مورفیسم و هایپرکروماتیسیم^۱ در بافت تومور مشاهده شد (شکل ۲).



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

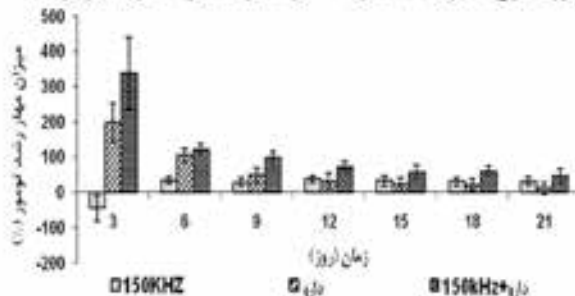
1- Hyperchromatism

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 ۵).



نمودار ۵: 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 ۶).



نمودار ۶: 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 ۸-۱۰ 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 مکنیزم های اصلی مقاومت بافت توموری عصب تعدد قبل نوجویی از عوص شیمی درمانی، توان پذیری زکار آمدن دارو به دخی بافت تومور و یا به دخی سول های سرخشی است. شواهد متعددی نشان دهنده ی توزیع نامناسب و نامکفی بسیاری از داروهای ضد سرخشی در بافت های توموری است در نتیجه یز شدیدی به بافت استراژی های مین وجود دارد که کاربرد آن ها باعث چپود نفوذ دارو به داخل بافت توموری و چید افزایش شاخص درمانی شود (۳۸).

مواج فراصوت منجر به افزایش تخلخل عروانی سول می شود و این اثر اجازه می دهد که به صورت مؤثرتری ورود و تجمع داروهای ضد سرخشی به سول انجام شود. ز طریق یکن عمل ضمن حفظ حداکثر تریخشی، با هم فرای فرای صوت امکان استفاده از دوره های پایین نری از دارو سیتوتوکسیک وجود دارد. ز این طریق اثرات دارو در مناطق خاص و تعیین شده تشدید می گردد (۳۹). در مضاعفات آزمایشگاهی نشان داده شده است که فراصوت به صورت مستقیم می تواند مرگ سولی را ز طریق تحریک سول می سولی (۴۰) و یا ایونوتوز زد کند (۴۰). ز اثرات بالقوه ی فراصوت در بافت های ریستی می سول به افزایش قابلیت عبور دارو و پدیده ی حفره سازی سولی به سول میهم ترین مکنیزم های غیر حرزانی شده کرد. حبابچه های حاصل از پدیده ی حفره سازی می تواند منجر به انشای خودپذیری کفر در غشای سولی و یا مرگ سولی شود (۴۱). همزمان با افزایش پتانسیل موبول د می تواند یا ر هم گسستگی که در غشای سول توسط مکنیزمی که شامل پدیده ی حفره سازی می شود، وارد شود. (۳۰، ۳۲) رلیکشن های آرد تولید شده توسط حفره سازی می تواند به غشای سولی صدمه برسد و ز طریق تغییر در خودپذیری غشایی سل و نقل مواد از عوا را تغییر دهد در نتیجه ی یکن تغییرات روند حمل و نقل دارو بهبود می یابد و یکن فرایدها منجر به فرایش تجمع مواد دارویی در داخل سول می گردد (۴۰). کاربرد فراصوت با شدت کم به صورت غیر نهانجی با داروهای ضد سرخشی می تواند اندازه ی تومور و احتمال عود

محدد آن را کاهش داده، ضمن آن که مین عوارض جانبی شدیدی را بر که می کند (۴۲). به علاوه فراصوت به تنور ویزد می تواند به صورت عمیق نری در بافت نفوذ نماید و توانایی تحرک نری بر روی حفره کوچکی از بافت را یز حفظ می کند. در این صورت ضریب میرایی مسمی سول بافت حفری می گردد که از آن می توان در درمان غیر نهانجی تومورهای غیر سطحی استفاده کرد. فراصوت با این ویژگی ها در مفسه با روش های لکتر و مفاصلی مانند شعه ی یز تازی ارححیت کاربرد ی بیشتری است (۴۳).

تحقیقات نشان داده اند که کاربرد فراصوت باعث سولی توکوروبیین را در محیط های آزمایشگاهی (in vitro) و در شرایط هاییز نری و دوره های باقی تدریسین مانند (۲۰-۶۰ mg/kg) در شرایط درون نی فرایش می دهد (۳۴-۳۶). مضاعفات به وضوح سوزندنی هم فرای صوت فراصوت و توکوروبیین را در سطح سولی نشان داده است (۳۴). سدیپی است که شرایط آزمایشگاهی و شرایط درون نی موجود زنده همواره یکسان است به سول مثل مین جیئون و مکنزان (۴۴) نشان دادند که تعدادی از عوامل ضد سرخشی که در کشتی سول های تک لایه ی تومور مؤثر بودند، قادر به رسیدن به سول های تومور در داخل بدن نیستند.

ما وجود این اثر نظر گرفتن اثر فرایدهای مختلف فزونی سولی به سول که ممکن است احداث حلال در تریخشی یکن دارو داشته باشند، نگمیل آزمایش ها در شرایط داخل بدن به ویژه در دوره های پانی توکوروبیین در مدل های حیوانی درون نی ضروری به نظر می رسد. یکن آزمایش ها به خصوص مضاعفات روی فر کانس و با شدت فراصوت کاربردی، می تواند مقدمه ای برای تعمید نتایج از مدل های حیوانی، به سطح کاربردهای کلینیکی یکن و مؤثرتر باشد.

در مضاعف ی حاضر اثر هم فرای یکن کاربرد فراصوت و توکوروبیین در محیط داخل بدن بررسی شد. یکن مضاعف شامل مجموعه ای از آزمایش ها با استفاده از پروتکلی شانس درمانی به صورت تک دوز توکوروبیین و امواج فراصوت بود. زمانی پروتکلی به دنبال مضاعفات قبلی در این آزمایشگاه

شدن می دهد. شاید بتوان غده وجود تفاوت معنی دار در T_2 را چنین توجیه کرد که در فاصله ی زمانی که حجم تومور به هشت برابر حجم اولیه می رسد، مقدار دارو در بدن (با توجه به دفع آن از بدن) به حد قابل رسیدگی رسیده که تأثیری از آن مشاهده نمی گردد. بر اساس نتایج به دست آمده فقط مقادیر T_1 و T_2 برای گروه دارو، امواج در مقیاسه با گروه درو به تنهایی تفاوت معنی داری شناس داد (0/0001). تحریک و تحلل اماری مقادیر T_1 و T_2 آغوش نتایج اماری برای گروه های دارو و امواج به تنهایی است که اثربخشی روتارس امواج را در مقایسه با دارو شدن می دهد. وجود تفاوت معنی دار در مقدار T_2 به شکلی می تواند بیشتر اثر هم افزایی دارو و امواج باشد به عبارت دیگر امواج توانسته میزان ورود درو به سون های نوموری را تا حد مطلوب کنترل کند. به نحوی که میزان کفتری از دارو در فضای خارج از بافت نوموری بوده است. این نکته - توجه به نیمه عمر بیولوژیکی دارو و دفع فیزیکی آن از بدن می تواند منشأ اثر بخشی امواج مدت در گروه دارو و امواج تلقی شود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده می توان ادعا کرد که با استفاده از شش امواج فراصوت 120 کیلوهرتز شدت کم ($0/17 \text{ W/cm}^2$) و دوکسوروبیسین کارایی درمان فرایض یافته است. این نکته را ضریب کاهش رشد حجمی تومور و طولانی تر شدن دوره ی خاموشیت به کاربرد دروی دوکسوروبیسین به تنهایی قابل ارزیابی می باشد. مابراین مشاهده عینه که افزایش اثر بخشی موثر به واسطه ی عسل همزمان امواج و درو، می تواند بید بخش کاهش دور موثر دارو و بدین نوع آن کاهش عوارض جانبی دوکسوروبیسین باشد.

تشکر و قدردانی

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

برگزید شد (33,33). همچنین میزان دوکسوروبیسین - سس نتایج مطالعات محققین (22,24,36,38) انتخاب شد. روی می ها نشان داد که ترکیب فراصوت با شدت کم با دوکسوروبیسین اثر قابل توجهی بر رشد تومور سرخه ی تنوع کارسیوم 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 دوکسوروبیسین و فرکانس پانسی در صورت مشاهده بود. تحریک و تحلل اماری داده ها با استفاده از روش تغییر واریانس روی نرخ رشد تومور مشخص کرد که پس از روشی که تنها دارو و گروهی که دارو و امواج دریافت کرده اند، تفاوت معنی داری وجود دارد همراه با دفع فیزیکی دارو از بدن (در روز 12 تا روز 18 تفاوت معنی داری بین گروه دارو و دارو - امواج در شرح رسد). تومور شکار است (0/0001). جایی به عمر می رسد که اثر امواج فراصوت باعث افزایش زمان اثربخشی بیولوژیکی دارو شده است. تحت این شرایط، میزان افزایش حجم نسبی تومور در گروه دارو و امواج تفاوتی معنی دار با گروه کنترل و شدت شدن داده. با گروه دارو - امواج (در روز 12 تا روز 18 تفاوت معنی داری با هر دو گروه کنترل و شش پستان می داد) (0/0001) که تأیید دیگر بر افزایش زمان اثربخشی بیولوژیکی دارو به واسطه ی کاربرد فراصوت می باشد.

در مجموع مشاهده ی کاهش شدن داد که کاربرد فراصوت با شدت کم می تواند اثر بخشی تک دوز دوکسوروبیسین را با توجه به مجموع روند مهار رشد تومور به 22 درصد افزایش دهد. از طرفی نتایج بیشتر تفاوت قابل ملاحظه ی مقادیر T_1 و T_2 این گروه امواج فراصوت و گروه دارو است، ما تنها در T_2 تفاوت معنی داری بین این دو گروه مشاهده گردید (0/0001). این شواهد حاکی از آن است که تأثیر یک دوز امواج فراصوت در رسیدن حجم تومور به میزان دو برابر، مشابه عملکرد دارو است. چنین به نظر می رسد که میزان اثر بخشی روتارس امواج (تا رسیدن به T_2) در این شرایط بر روی تومور بیش از دارو است ولی پس از آن، در دارو و زمان پاسخ 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

References:

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics in 2010. CA: Cancer J Clin [serial online]. 2010; 60(5): [277-306 screens]. Available at: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610543>. [Cited: Jul 7]
2. Young RC, Ozols RF, Myers CF. The anthracycline antineoplastic drugs. N Engl J Med 1981; 305: 135-137.
3. Bouma J, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM. Anthracycline antitumor agents: A review of physicochemical, analytical and stability properties. Pharm world Sci 1986; 8(2): 106-137.
4. Wang S, Komorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: intermediacy of H2C and p53-dependent pathways. J Biol Chem 2004; 279(24): 25535-25547.
5. Santoro GP, Lynch WT, Bullington WD. Mechanism of action of the anthracycline anti-tumor antibiotics, doxorubicin, daunorubicin and rubidazole: preferential inhibition of DNA polymerase alpha. J Antibiot 1975; 32(10): 1036-1045.
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. Hrazdina L, Korpikova J, Delnikova M. Ultrasonically induced alterations of cultured tumor cells. Eur J Ultrasound 1998; 8(1): 43-46.
9. Alter A, Rozenszajn LA, Miller HL, 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 1992; 53(4): 406-419.
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): 95-107.
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 26 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 26 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 1997; 19(1): 75-82.
15. Yu T, Wang Z, Jiang S. Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line FAO by low-level ultrasound. Ultrasonics 2001; 39(4): 307-309.
16. Sur P, Ghosh P, Ray S, Sur B, Chatterjee S, N. On the inhibitory activities of a new boron compound and ultrasound against the mouse ascites tumor. Chemotherapy 1992; 48(5): 366-369.
17. Harrison GH, Balcer-Kubiczek EK, Eddy HA. Potentiation of chemotherapy by low-level ultrasound. Int J Radiat Biol 1991; 59(6): 1457-1466.
18. Tachibana K, Uchida T, Tamura K, Eguchi H, Yamashita N, Ogawa K. Enhanced cytotoxic effect of AraC by low intensity ultrasound to HL60 cells. Cancer Lett 2000; 149(1-2): 185-194.
19. Takada E, Sonagawa M, Ohtaira 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, Mozdariani H, Bathaie SZ, Hassan ZM. Treatment of murine tumors using dual-frequency ultrasound in an experimental in vivo model. *Ultrasound Med Biol* 2006; 35(5): 756-763.
22. Teicher BA. Tumor models in cancer research. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002: 407-446.
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, Bartossek I, Cusitani A. Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats. *Exp Gerontol* 1985; 24(2): 155-171.
25. Danesi R, Fogli S, Ciemari 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 B, Van Aerschot L, Verhesselt 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* 2006; 30(4): 647-657.
27. Luna JG (ed). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1968.
28. Minchinton AJ, Tannock JF. Drug penetration in solid tumors. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(8): 583-592.
29. Bernard V, Skorpikova J, Morstein V, Stanikova 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, Nyberg 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, Sakamshi A. Ultrasound mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol Adv* 2006; 24(1): 1-16.
32. Ghazmin 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* 2006; 44(6-7): 558-564.
34. Harrison GH, Balcer-Kubiczek TK, Chatterjee PL. In vitro mechanisms of chemopotentiality by tone-burst ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1990; 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 MC. 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, Tayebbeh 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