

بررسی تأثیر دوکسوروبیسین با تابش امواج دوگانه فراصدايي کيلوهرتزی و مگاهرتزی بر رشد تومور آدنوکارسینوما

هما سلیمانی^۱، پرویز عبدالمالکی^{*}، طیبه تولیت^۲، منیژه مختاری دیزجی^۳، عباس توسلی^۴

۱. گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳. گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴. گروه علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

تأثیر بسامد امواج دوگانه فراصدا (اولتراساوند) در شدت پایین با تکرار تابش بر روی تومور آدنوکارسینوماي پستان موش Balb/C در حضور داروی شیمی‌درمانی بررسی شد. در این مطالعه موش‌های حامل تومور به پنج گروه تقسیم شدند. دو گروه کنترل و شم و سه گروه تحت تیمار شامل تابش تحت امواج دوگانه (۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز)، امواج دوگانه با تکرار تابش (۳×۳۰ دقیقه) و تحت درمان با تک دوز داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزایش بقای حیوانات در گروه تکرار تابش نسبت به گروه شم معنادار بوده و مشابه گروه تحت تیمار با دارو است. تکرار تابش امواج فراصدايي به حیوانات حامل داروی شیمی‌درمانی نشان داد که زمان رسیدن هر تومور به دو و پنج برابر حجم اولیه کاهش می‌یابد، به طوری که تقلیل زمان رسیدن به پنج برابر حجم اولیه کاهش معنادار است. به نظر می‌رسد با استفاده از تکرار تابش تکرار هم‌زمان دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و یک مگاهرتز در شدت پایین منجر به کاهش رشد تومور و افزایش بقای حیوان در حد استفاده از یک دوز مؤثر داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین در نمونه حیوانی شده است.

کلید واژه‌ها: تکرار تابش، امواج فراصدا (اولتراساوند)، دوکسوروبیسین، تومور آدنوکارسینوما، موش Balb/C

۱. مقدمه

دو نوع گذرا و غیرگذرا طبقه‌بندی شده است. حباب حاصل از پدیده حفره‌سازی غیرگذرا حول و حوش یک شعاع نوسان می‌کند و اغلب برای بسیاری از چرخه‌های صوتی 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 (کاواک-کویتي)^۳ گذرا حباب‌های گازی هستند که تا اندازه نزدیک بازآوایش (تشدید) رشد می‌کنند و ممکن است، قبل از فروریختن به حداکثر گسترش برسند و پس از اندک زمانی سقوط گذرا دچار فروریزش (کولاپس- رمبش)^۴ شده، تولید فشار و درجه حرارت بالایی در آن موضع بکنند (در

قرار گرفتن بافت زیستی در برابر تابش امواج فراصدايي (اولتراساوند)^۱ باعث ایجاد تغییرات ساختاری و یا عملکردی می‌شود. تغییرات ساختمانی شامل آسیب‌های خفیف اما قابل ترمیم تا مرگ فوری است. تغییرات عملکردی شامل تکثیر، مهاجرت، سنتز، ترشح، بیان ژن، نفوذپذیری غشا و غیره است [۱-۴]. تعامل فراصدايي و توده مایع منجر به پدیده‌ای کاملاً منحصر به فرد به نام حفره‌سازی (کاواک‌زایی - کاویتاسیون)^۲ با غلظت بسیار زیاد و تبدیل انرژی منتشره صدا می‌شود. از لحاظ تاریخی، حفره‌سازی به

* نویسنده پاسخگو: parviz@modares.ac.ir

^۳ Cavity
^۴ Collapse

^۱ Ultrasound
^۲ Cavitation

یاخته شود. لازم به ذکر است که تغییر در پارامترهای خاصی در طی سونولیز^۶ مانند دما و فشار محیط، ترکیب گازهای محلول، بسامد و شدت امواج صوتی و لزجت (ویسکوزیته)^۷ محلول منجر به تغییرات معناداری در پدیده حفره‌سازی می‌گردد. اطلاعاتی از لزجت یاخته‌های در حال تخریب در دست نیست اما حرکت شعاعی حباب‌ها و توانایی آن‌ها در آسیب‌رسانی به یاخته‌ها موجب افزایش لزجت مایع می‌شود [۹].

امواج فراصدا با بسامد پایین می‌توانند حفره‌های صوتی بیشتری ایجاد کنند. بنابراین با توجه به نوع هدف، در هنگام استفاده از فراصدا در درمان می‌بایست پارامترهای صوتی به دقت انتخاب شوند.

چندین سازوکار برای تأثیر امواج فراصدا بر یاخته‌های سرطانی ارائه شده‌اند. فراصدا با اثر کلیدی غیر حرارتی‌اش یعنی پدیده حفره‌سازی موجب اثری کارآمد و مؤثر بر روی یاخته‌های سرطانی می‌شود [۷ و ۱۱]. برخلاف کاربردهای حرارتی فراصدا، استفاده درمانی از آثار غیرحرارتی فراصدا، کم‌تر مطالعه شده است.

در آزمایش‌های تجربی، نشان داده شده که پدیده حفره‌سازی قادر به پارگی غشای یاخته‌ای است. با این حال، آستانه حفره‌سازی در داخل بدن بسیار بالاتر از شرایط تجربی است. تحقیقات تومور حیوانات، تأییدی بر کار امواج فراصدا در محیط داخل بدن است. امواج فراصدا منجر به سرکوبی بیش‌تر تومورها در مقایسه با داروها می‌شود. در سال‌های اخیر نیز درمان با امواج فراصدا برای تومورها به طور موفقیت‌آمیزی در حال توسعه است. با وجود این واقعیت که استفاده از فراصدا با تراز شدت پایین در درمان به راحتی قابل اجرا است، اما از نظر کاربردی، امواج فراصدا در تراز انرژی بالا می‌توانند هم به عنوان سرکوب‌کننده تقسیم میتوزی هسته یاخته‌های سرطانی عمل کنند و هم می‌توانند با کشیدن ماشه باعث گسترش بافت بدخیم و در نتیجه کمک به گسترش و متاستاز شوند.

حد ۵۰۰۰ کلوین و ۵۰۰ بار [۵-۷]. این شرایط ممکن است باعث القاء بسیاری از واکنش‌های شیمیایی در داخل و اطراف حباب شود، از جمله تجمع انرژی کافی منجر به تولید نور نشری آوالیانسائی (سونولومینسانس^۱) می‌گردد [۸].

در حالی که هر دو پدیده حفره‌سازی (کاوآک‌زایی - کاویتاسیون) گذرا و غیرگذرا می‌توانند تولید نیروهای مکانیکی کنند، تنها حفره‌سازی غیرگذرا می‌تواند تولید اثرات شیمیایی کند. اثرات تخریب یاخته‌ای (سلولی)^۲ ناشی از تابش امواج فراصدا در غیاب حساس‌کننده‌ها به یکی از دو اثر فشار مکانیکی و یا اثرات آواشیمیایی (سونوشیمیایی)^۳ حاصل از پدیده حفره‌سازی صوتی نسبت داده می‌شود [۹].

حفره‌سازی باعث واکنش آواشیمیایی می‌شود که ممکن است کاربردهای زیستی در داخل بدن داشته باشد. این واکنش‌های آواشیمیایی می‌توانند موجب فروریزش حباب‌های گاز شوند که در آن‌ها دمای بسیار بالا و فشار بالا تولید می‌شوند. تحت این شرایط، واکنش تجزیه در اثر حرارت پیرولیزیس^۴ رخ می‌دهد. در محلول‌های آبی، رادیکال‌های هیدروکسیل، اتم‌های هیدروژن و اکسیژن توسط تجزیه حرارتی تشکیل می‌شوند [۱۰]. بخشی از اثرات بالقوه آواشیمیایی بر روی یاخته‌هایی که در معرض تابش فراصدا بودند، می‌تواند صدماتی را به محیط‌های زیستی وارد کنند که به صورت هیدرودینامیکی (به واسطه وارد آوردن نیرو و جنبش آگونه‌ها) و هم با ایجاد مجراهایی در یاخته است. زمانی که حباب‌ها با حرکات سریع از کنار یاخته‌ها عبور می‌کنند، در سر راهشان با محیط برخورد کرده، ایجاد ریزجریان (میکروجریان) صوتی می‌کنند. با توجه به تپ‌های (پالس‌های)^۵ فشار روی حرکت ارتجاعی یا پیچش حباب‌ها و خروج شدید گاز، فرسایش صورت می‌گیرد. حتی جریان سیال در اطراف حباب‌هایی که در حال نوسان هستند، می‌تواند منجر به تنش و ایجاد شکاف کافی برای تخریب در

¹ Sonoluminescence

² Cell

³ Sonochemical

⁴ Pyrolysis

⁵ Pulse

⁶ Sonolysis

⁷ Viscosity

سپس حجم تومور با اندازه‌گیری اقطار تومور توسط کولیس رقومی (دیجیتالی)، محاسبه شد (شکل ۱):

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



شکل ۱ اندازه‌گیری اقطار تومور.

تومورها هر دو یا سه روز یک بار اندازه‌گیری شدند تا قطر تومورها تقریباً به ۸-۹ میلی‌متر برسد. وزن حیوان‌ها در شروع درمان 19 ± 3 گرم بود. میزان موفقیت پروتکل درمانی را در روزهای متوالی پس از درمان نسبت به گروه شم^۲ با استخراج پارامتر درصد مهار در روند رشد تومور^۳ مطابق رابطه زیر ارزیابی شد:

$$TGI (\%) = \left(1 - \frac{V_{s,day}}{V_{s,day}}\right) \times 100$$

که در آن به ترتیب $V_{s,day}$ و V_{dayx} حجم تومور در روز معین بعد از درمان و حجم تومور در گروه کنترل^۴ در همان روز است. همه مراحل آزمایش مطابق با پروتکل‌های تأیید شده انجام شد. موش‌ها از تمام گروه‌ها (برای درمان) مطابق روش فوق بیهوش شدند. به منظور انتخاب حداقل یک دوز از دوکسوروبیسین و اثر بخشی آن بر حجم تومور، با توجه به مقالات [۱۲ و ۱۳]، زمان تابش در گروه‌های تحت تابش فراصداپی ۳۰ دقیقه و مقدار غلظت دوکسوروبیسین در گروه تزریق دارو، ۲ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن حیوان

بنابراین پارامترهای صوتی و روش‌های تابش در تعیین راهبرد درمان بدخیمی‌ها با تراز پایین فراصدا بایستی مشخص شوند تا در این راه بتوان اثرات درمانی را حداکثر کرد و عوارض جانبی را به حداقل رساند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تابش امواج فراصدا با تکرار تابش تحت دو بسامد ۱ مگاهرتز تپی (۸۰ درصد) و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و مقایسه آن با داروی دوکسوروبیسین، بر روی تومور آدنوکارسینوم، در موش‌های ماده نژاد Balb/C است. در این مطالعه با استفاده از مدت زمان بقا و میزان رشد تومور در گروه‌های مورد بررسی، تأثیر تکرار تابش امواج فراصدا با عملکرد داروی دوکسوروبیسین در نمونه حیوانی مقایسه و بررسی می‌گردد.

۲. مواد و روش‌ها

موش ماده نژاد Balb/C با سن ۴-۵ هفته از مؤسسه پاستور تهران خریداری شد. مراقبت از آن‌ها از نظر حمل و نقل، رطوبت، دما، آب و تغذیه در شرایط استاندارد انجام گرفت. پس از یک هفته، آن‌ها تحت پیوند قرار گرفتند. تومور منشاء متعلق به یک موش ماده نژاد Balb/C است که آدنوکارسینوم سرطان پستان خود به خود دارد. این تومور از بخش ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شد. محلول کتامین- گزایلین^۱ (به نسبت ۱:۲) با ۸/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی به حجم ۱۰ سی‌سی رسید و موش منبع با استفاده از این محلول (به صورت داخل صفاقی) بیهوش شد. سپس تومور حیوان تحت عمل جراحی در شرایط استریل جدا و به قطعات کوچک (۲-۳ میلی‌متر مکعب) برش داده شد. هم‌زمان با این عمل موش گیرنده مانند روش فوق بیهوش گردید. پوست سینه پهلو در نزدیکی غدد شیری حیوان باز شد و یک قطعه از تومور استخراجی (عاری از بافت نکروز یا چربی) تحت شرایط استرونی (استریل) پیوند زده شد. پس از گذشت یک هفته از لانه‌گزینی تومور، موهای سطح پوست منطقه حذف و

² Sham

³ Tumor growth inhibition-(TGI %)

⁴ Control

¹ Sigma-Aldrich

- گروه دارو به تنهایی (Drug) (تزریق ۲ میلی گرم داروی دوکسوروبیسین^۱ به ازای هر کیلوگرم وزن موش)،
 - گروه تحت تابش هم‌زمان امواج فراصدا ۱ مگاهرتز تپی (۸۰ درصد) با شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع و بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با شدت ۰/۲ وات بر سانتی‌مترمربع با تزریق دارو (Dual+Drug)،
 - گروه تحت سه بار تکرار تابش هم‌زمان امواج فراصدا ۱ مگاهرتز تپی (۸۰ درصد) با شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع و بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با شدت ۰/۲ وات بر سانتی‌مترمربع بدون تزریق داروی (Dual Rep.) و
 - گروه (آخرین) موش‌هایی که در معرض سه بار تکرار تابش امواج فراصدا با دو بسامد با فواصل تکرار زمانی هر شش روز و هر بار ۳۰ دقیقه در حضور داروی (Drug+Dual (Rep)) قرار گرفتند.
- تصویر دستگاه مورد استفاده در آزمایش‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. یک تراگذار (مبدل) پیزوالکتریک ۱۵۰ کیلوهرتز^۲ با قطر پروب ۳۰ میلی‌متر و به مساحت تابش مؤثر ۵ سانتی‌مترمربع مورد استفاده قرار گرفت. برای کسب اطمینان از اینکه حداکثر انرژی صوتی در ضمن تیمار به موش‌ها می‌رسد، در آغاز شدت دستگاه در محفظه آب عاری از گاز با هیدروفون^۳ در محفظه مکعب شکل سنجیده شد. اطلاعات به دست آمده شامل شاخص نشانگر چگونگی توزیع انرژی در داخل محفظه پرتو دهی از نظر میانگین زمانی و فضایی (شدت میانگین زمانی میانگین فضایی) است. این دستگاه مجهز به یک زمان‌سنج رقومی (دیجیتالی) بود که در تمام آزمایش‌های فراصدا مورد استفاده قرار گرفت. پروب دستگاه در محفظه پر از آب میدان را تحت تابش قرار می‌داد. درجه حرارت در محیط محلول در طول مدت اعمال امواج فراصدا (۳۰ دقیقه) افزایش می‌یافت، اما

انتخاب شد. محلول دارو با حجم مناسبی از محلول نمکی بافر فسفات رقیق شده و تزریق از طریق ورید دم انجام گرفت. سپس گروهی که تحت تابش امواج فراصدايي قرار داشت، در مقابل تراگذار (مبدل) فراصدا (شکل ۲) تحت ۳۰ دقیقه تماس فراصدايي به صورت یکبار تابش در بسامد ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز و ۳ بار تکرار تابش ۳۰ دقیقه‌ای قرار گرفتند. پس از درمان، هر سه روز یک بار حجم تومور با کولیس مطابق روش بالا اندازه‌گیری و هر اندازه‌گیری سه بار تکرار شد. دوره بقای هر موش به دقت بررسی شد و موش‌هایی که از خون‌ریزی مرده یا برای مطالعات آسیب‌شناسی فرستاده شده بودند، حذف گردیدند. در تحقیق حاضر تومور آدنوکارسینوما به ۵۷ موش القا شد که در نهایت با احتساب پیوندهای موفق و مرگ و میر، ۴۹ حیوان وارد مطالعه شد. برای افزایش پدیده حفره‌سازی صوتی از بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و برای افزایش فروریزش ریزحباب‌ها (میکروحباب‌ها) از بسامد ۱ مگاهرتز استفاده شد [۱۴] و [۱۵]. برای کاهش دمای محیط زیر حد هیپرترمی تابش منبع ۱ مگاهرتز به صورت تپی ۸۰ درصد انجام گرفت [۱۶].



شکل ۲ سامانه تابش‌دهی.

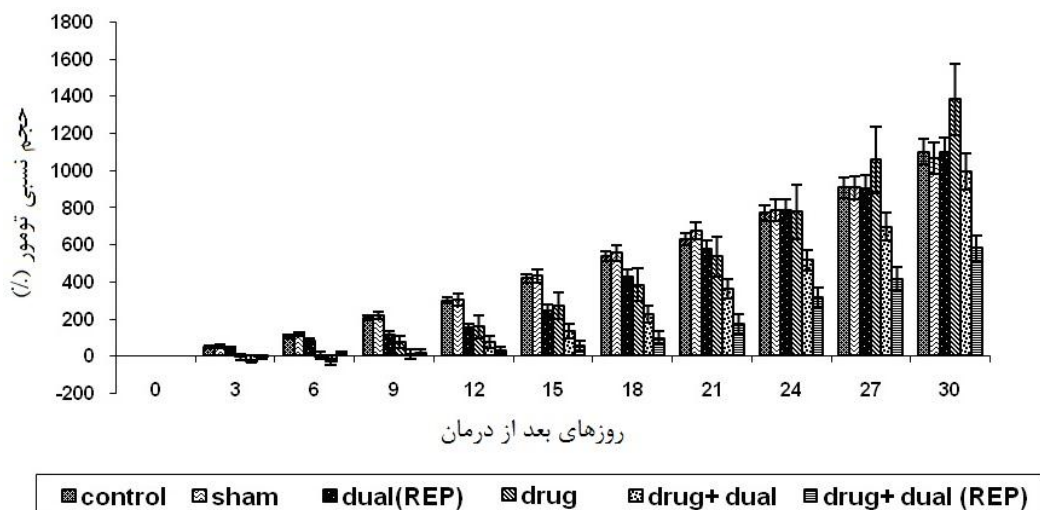
موش‌های ماده نژاد Balb/C به شش گروه تقسیم شدند:

- گروه‌های کنترل و شم (۳۰ دقیقه در آب بدون تابش امواج فراصدا قرار داده شدند)،

¹ EBWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, A-4866, Unterach, Australia

² SM3678B, Shrewsbury Medical Co., UK

³ Bruel & Kjaer model 8103, Denmark



شکل ۳ میانگین و انحراف معیار روند افزایش حجم نسبی تومور برحسب درصد در روزهای صفر تا سی روز پس از تیمار در ۶ گروه مورد مطالعه.

میکرون با میکروتوم برش داده شدند. سپس نمونه‌های بافتی با هماتوگزایلین^۳ و ائوزین مطابق روش لونا [۱۷] رنگ‌آمیزی شدند. نتیجه در هر گروه ۸-۱۰ تایی حیوانات آزمایشگاهی به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. پس از تأیید توزیع نرمال اطلاعات، برای بررسی تمایز بین گروهی با اطمینان ۹۵ درصد تحلیل واریانس یک‌طرفه با نرم‌افزار آماري إس‌پی‌اس^۴ انجام گرفت.

۳. نتایج

در ابتدا برای بررسی اثربخشی و تفاوت تکرار تابش‌دهی بر روی روند رشد تومور، اندازه‌گیری حجم تومور موش‌ها در گروه‌های تحت تابش امواج دوگانه با گروه تحت تکرار تابش دوگانه انجام گرفت و مقادیر با اندازه‌های تومورهای در روزهای مشابه در گروه‌های کنترل و شم مورد مقایسه قرار گرفتند. به منظور به دست آوردن داده‌های نرمال از رشد حجم نسبی (درصد) استفاده شد (شکل ۳). از آنجا که نتایج به دست آمده در گروه شم مشابه گروه کنترل بود، لذا نتایج گروه شم در تمام آزمایش‌ها به عنوان مرجع برای تمام گروه‌های تحت تیمار استفاده شد.

هنوز هم در زیر دمای آستانه هیپرترمی برای محیط زیستی بود. درجه حرارت بافت با استفاده از ترموکوپل‌ها^۱ روی صفحه رایانه ثبت گردید. پس از تثبیت ترموکوپل در مجاورت تومور، به منظور اطمینان از ثابت ماندن دما زیر حد آستانه هیپرترمی (کمتر از ۴۲ درجه سلسیوس) ترموکوپل دیگری در مخزن آب و دور از محیط پروب قرار گرفت. داده‌های کنترل دما به واحد کنترل ورودی‌ها ارائه شد که حاوی یک ریز پردازنده متصل به رایانه^۲ است. چگالی انرژی کل تابش‌دهی فراصداپی برای ۳۰ دقیقه تابش ۳۶۹۰ ژول بر سانتی‌متر مربع حاصل شد.

به منظور تأیید نوع تومور و عدم تغییر در بافت توموری، بافت‌های تومور از لحاظ پاتولوژی مورد مطالعه قرار گرفتند. مرگ بدون درد موش‌های گروه شاهد پس از بیهوشی توسط اتر صورت گرفت. لام میکروسکوپی از نمونه بافت تومور تهیه شد. همه نمونه‌های بافتی با ضخامت ۴ میلی‌متر برش داده شدند و در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پردازش نمونه‌های بافتی شامل مراحل مختلف از کاهش آب بافتی با الکل، پاکسازی با گزلیل و اشباع با پارافین ذوب شده، بودند. نمونه بافت در پارافین جاسازی شده و پس از آن در ابعادی به ضخامت ۵

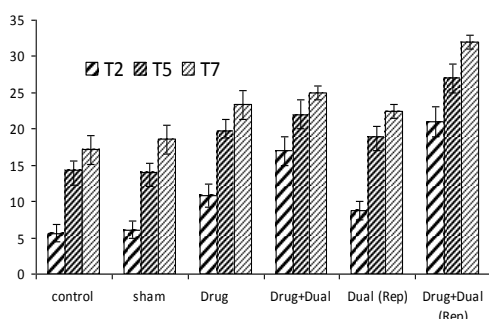
³ Hematoxylin

⁴ SPSS/PC Inc., Chicago, IL SPSS V.13

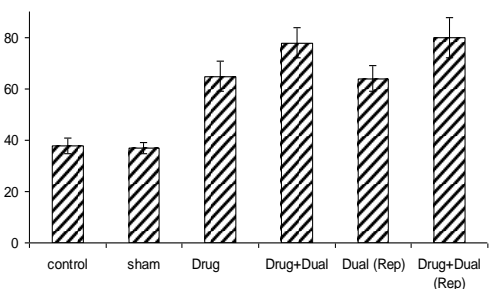
¹ TP-01, Lutron Electronic Enterprise Co., Taiwan

² RS-232 port

۲/۰۴ برابر در مقایسه با گروه "شم" افزایش نشان دادند. اگرچه تفاوت واضح بین گروه "دارو" با گروه‌های "دارو + تابش دوگانه" و "دارو + تکرار تابش دوگانه" مشاهده شد (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵)، ولی هیچ تفاوت روشنی در بین گروه‌های "دارو + تابش دوگانه" و "دارو + تکرار تابش دوگانه" مشاهده نگردید. این روش آماری نشان داد که اختلاف معناداری بین گروه "شم" و "تکرار تابش دوگانه" وجود دارد، در حالی که بین گروه‌های "تکرار تابش دوگانه" و "دارو" تمایز معنادار نبود (عدد p بیش‌تر از ۰/۰۵).



شکل ۴ مقایسه زمان مورد نیاز برای رشد تومورها به دو برابر (T_2)، پنج برابر (T_5) و هفت برابر (T_7) حجم اولیه خود. گروه‌ها عبارتند از کنترل، شم، تحت تیمار با دوکسوروبیسین به تنهایی، تابش دوگانه فراصدا (۱۵۰ کیلوهرتز + تابش امواج تپی فراصداي ۱ مگاهرتز) به مدت ۳۰ دقیقه همراه با دارو، تحت تیمار با تکرار تابش دوگانه به مدت ۳۰ دقیقه، تکرار تابش دوگانه در حضور دارو و هر بار ۳۰ دقیقه.



شکل ۵ میانگین و انحراف معیار زمان بقا بر حسب روز در گروه‌های کنترل، شم، تحت تیمار با دوکسوروبیسین به تنهایی، تابش دوگانه فراصدا (۱۵۰ کیلوهرتز + تابش امواج تپی فراصداي ۱ مگاهرتز) به مدت ۳۰ دقیقه همراه با دارو، تحت تیمار با سه بار تکرار تابش دوگانه به مدت ۳۰ دقیقه، سه بار تکرار تابش دوگانه در حضور دارو سه بار و هر بار ۳۰ دقیقه.

حجم اولیه تومور در گروه‌های مختلف مورد مطالعه هیچ اختلاف معناداری را نشان نداد (عدد p بزرگ‌تر از ۰/۰۵). تغییر در حجم نسبی تومور در طی ۳۰ روز بعد از تیمار نشان می‌دهد که تا روز نهم پس از تیمار، تفاوت معناداری بین گروه‌های تیمار شده با دارو (داروی تنها، دارو + تابش دوگانه، تکرار تابش دوگانه و دارو + تکرار تابش دوگانه) نسبت به گروه شم وجود دارد (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵). از روز ۱۲ تا روز ۱۸ پس از تیمار، در حالی که تفاوت بین گروه‌های "دارو" و "شم" بیشتر می‌شود، تفاوت معناداری در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ بین گروه‌های تحت تیمار با "دارو + تابش دوگانه" و "دارو + تکرار تابش دوگانه" با گروه "شم" مشاهده شد. گروه "تکرار تابش دوگانه" نیز تفاوت معناداری با گروه "شم" از روز ششم تا روز پانزدهم نشان داد. از روز بیست و یکم تا روز سی‌ام پس از تیمار تفاوت قابل توجهی میان هیچ‌کدام از گروه‌های مورد مطالعه مشهود نبود، به جز برای گروه "دارو + تکرار تابش دوگانه" که همچنان اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵) تا روز بیست و هفتم نشان داد.

با استفاده از حجم‌های اندازه‌گیری شده، به عنوان یک اندازه‌گیری نسبی از رشد تومور، زمان‌های مورد نیاز برای هر یک از تومور برای رسیدن به ۲، ۵ و ۷ برابر حجم اولیه خود) محاسبه شد (شکل ۴). در این زمان‌ها اختلاف معناداری بین گروه "دارو + تکرار تابش دوگانه" در یک سمت و گروه‌های "شم"، "کنترل"، "تکرار تابش دوگانه" از سوی دیگر مشاهده شد (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵). هم‌چنین تفاوت معناداری نیز بین "دارو + تکرار تابش دوگانه" و "دارو + تابش دوگانه" وجود داشت (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵). زمان‌های مدت بقا (T_2 و T_5 بر حسب روز) در ۶ گروه موش‌های مورد مطالعه نیز اندازه‌گیری شدند. تفاوت در دوره بقا بین گروه‌های "تکرار تابش دوگانه" و "دارو" قابل توجه نبود (شکل ۵). با این حال، مدت زنده ماندن گروه‌های "دارو + تکرار تابش دوگانه"، "دارو + تابش دوگانه"، "تکرار تابش دوگانه" به ترتیب به میزان ۲/۲۱، ۲/۱۶ و

۴. بحث

شدت پایین است. با توجه به مطالعات گذشته [۱۴-۱۶]، در بررسی حاضر زمان تابش امواج فراصدا به مدت ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. براساس مطالعات سایر محققین [۲۲-۲۴]، یک تک دوز با میزان ۲ میلی گرم بر کیلوگرم داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین برای آزمایش‌ها انتخاب شد.

نتایج نشان داد که با استفاده از تکرار تابش با امواج فراصدا در شدت کم و در محدوده کیلوهرتز یا مگاهرتز اثر قابل توجهی در مقایسه با تجویز داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین دارد. با توجه به اثر نسبی امواج دوگانه ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز در مطالعه حاضر سعی شد تا با تکرار پرتودهی در بازه‌های زمانی تابش ۳۰ - دقیقه‌ای کارایی امواج در این دو بسامد بهتر مطالعه شود. لذا با توجه به تفاوت معنادار گروه دارو تا روز نهم نسبت به گروه شم، زمان تکرار تابش دهی هر شش روز یکبار در نظر گرفته شد. لذا تابش در روزهای اول، ششم و دوازدهم تکرار گردید. در این تحقیق تفاوت در رشد تومور (حجم نسبی تومور) در هنگام استفاده از تابش امواج دوگانه فراصدا بی در مقایسه با تک دوز دوکسوروبیسین و تکرار امواج دوگانه فراصدا مشهود بود. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک طرفه روی مجموع نرخ رشد تومور مشخص کرد که بین گروهی که دارو دریافت کرده بودند و گروهی که تحت تیمار تکرار امواج بدون حضور دارو قرار گرفته بودند، تفاوت معناداری وجود نداشت. در مجموع چنین به نظر می‌رسد که اثر تکرار تابش امواج فراصدا موجب افزایش در بازدارندگی تومور در حد یک دوز دارو شده است. مقادیر محاسبه شده برای T_p ، T_h و T_v در هر دو گروه تحت تیمار با امواج فراصدا و گروه دارو نشان‌دهنده تفاوتی معنادار بودند. این تفاوت تنها در زمان T_h میان گروه "دارو" و گروه "تک تابش امواج" معنادار بود (عدد p کوچک‌تر از ۰/۰۵) و میان گروه "دارو" و گروه "تکرار تابش" معنادار نبود (عدد p بیش‌تر از ۰/۰۵) که حکایت از تأثیر بخشی مشابه با دارو است. تحقیقات بیشتر با مطالعه میزان بقا حیوان‌ها که مهم‌ترین عامل در

مطالعات در سطح یاخته‌ای (سلولی) نشان داده‌اند که امواج فراصدا به طور مستقیم با لیز کردن یاخته‌ای موجب القا مرگ یاخته‌ای، نکروز و یا آپوپتوز یاخته می‌شوند [۱۸]. سازوکار غیر گرمایی مربوط به امواج فراصدا شامل حفره‌سازی، جریان صوتی، میکروجت، و نیروی تشعشعی است که سازوکار مورد استفاده برای هدف قرارگیری بافت‌ها و یا فعال کردن شیمیایی مواد است [۱۹]. بسامد امواج فراصدا پارامتر مهمی در ارائه پروتکل‌های درمانی مطلوب است. به ویژه هنگامی که ترکیبی از دو بسامد مورد استفاده قرار گیرد. سازوکار اثرات مشاهده شده نشان داده است که تراگذار (مبدل) فراصدا با بسامدی در محدوده کیلوهرتز ایجاد اثرات اصلی در تولید حفره‌سازی را در روش فراصدا می‌کند، در حالی که مبدل دوم که در محدوده مگاهرتز عمل می‌کند به عنوان کمکی برای سرعت بخشیدن به انتقال ذرات است. که در نتیجه افزایش پدیده حفره‌سازی را موجب می‌شود [۲۰]. اگر میدان بسامد پایین^۱ به طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از میدان بسامد بالا^۲ باشد، در این شرایط میدان بسامد پایین می‌تواند به طور شبه استاتیک، آستانه حفره‌سازی را کاهش دهد به طوری که تعداد حباب‌های حاصل از پدیده حفره‌سازی افزایش یابد [۸]. داروهای شیمی درمانی می‌توانند اثرات سمی مؤثری بر روی تومورهای جامد بگذارند ضمن اینکه در عین حال عوارض جانبی آن‌ها به شدت به بافت‌ها و ارگان‌های سالم آسیب می‌رساند [۱۹]. در این راستا یکی از مؤثرترین داروهای ضد تومور داروی دوکسوروبیسین است. اثر سمی دارو به تولید گونه‌های اکسیژن فعال نسبت داده شده است [۲۱]. در مطالعه حاضر هدف بررسی مقایسه اثر هم‌افزایی بین امواج فراصدا با دوکسوروبیسین در یک شرایط محیطی درون تنی^۳ است. این تحقیق شامل مجموعه‌ای از آزمایش‌ها در محیط درون تنی با استفاده از پروتکلی شامل درمان با تک دوز دوکسوروبیسین و فراصدا با دو بسامد در

¹ Low frequency

² High frequency

³ In vivo

- [9] I. Rosenthal et al, "Review sonodynamic therapy: A review of the synergistic effects of drugs and ultrasound," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 11, p. 349-363, 2004.
- [10] P. Riesz, D. Berdahl, C.L. Christman, "Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions," *Environmental Health Perspectives*, vol. 64, p. 233-252, 1985.
- [11] R. Feng et al, "Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 9, p. 231-236, 2002.
- [12] Jr. Feril et al, "Sound waves and antineoplastic drugs: the possibility of an enhanced combined anticancer therapy," *Journal of Ultrasound Medicine*, vol. 29, p. 173-187, 2002.
- [13] S. Samuel, D.L. Miller, J.B. Fowlke, "The relationship of acoustic emission and pulse-repetition frequency in the detection of gas body stability and cell death," *Ultrasound in Medicine and Biology (UMB)*, vol. 32, p. 439-447, 2006.
- [14] H. Hasanzadeh et al, "Enhancement and control of acoustic cavitation yield by low level dual frequency sonication: A subharmonic analysis," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, p. 394-400, 2011.
- [15] A.H. Barati et al, "Free hydroxyl radical dosimetry by using 1MHz low level ultrasound waves," *Iranian Journal of Radiation Research (IJRR)*, vol. 3, p. 163-169, 2006.
- [16] A.H. Barati et al, "Effect of exposure parameters on cavitation induced by low-level dual-frequency ultrasound," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 14, no. 6, p. 783-789, 2007.
- [17] L.G. Luna, HT (ASCP), "Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology," New York, McGraw-Hill, 1968.
- [18] T. Kondo, Y. Fukushima, H. Kon, P. Riesz, "Effect of shear stress and free radicals induced by ultrasound on erythrocytes," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 269, no. 2, p. 381-389, 1989.
- [19] K. Tachibana, Jr.L.B. Feril, Y. Ikeda-Dantsuji, "Sonodynamic therapy," *Ultrasonics*, vol. 48, p. 253-259.
- [20] L. Carpendo et al, "Space time interaction of two ultrasonic fields and sonoluminescence during transient cavitation in distilled water," *Acoustics Research Letters*, vol. 10, p. 178-181.
- [21] J.L. Zweier, L. Gianni, J. Muindi, C.E. Myers, "Differences in O₂ reduction by the iron complexes of adriamycin and daunomycin: The importance of the side chain hydroxyl group," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 884, p. 326-336, 1986.
- [22] T. Colombo et al, "Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats," *Experimental Gerontology*, vol. 24, p. 159-171, 1989.
- [23] K.V. Calsteren et al, "Vinblastine and doxorubicin administration to pregnant mice affects brain development and behaviour in the offspring," *Neuro Toxicology*, vol. 30, p. 647-657, 2009.
- [24] A.H. Saad, G.M. Hahn, "Ultrasound-enhanced effects of adriamycin against murine tumors," *Ultrasound in Medicine and Biology (UMB)*, vol. 18, p. 715-723, 1992.

مطالعه بود، بیانگر عدم تفاوت معنادار میان دو گروه "دارو" و گروه "تکرار تابش" است.

۵. نتیجه گیری

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد تکرار تابش با امواج دوگانه فراصدا با شدت کم می تواند اثربخشی مشابه تک دوز دوکسوروبیسین را داشته باشد. مؤلفین بر این عقیده هستند که افزایش اثر بخشی به واسطه اعمال تکرار تابش امواج فراصدا می تواند نویدبخش کاهش دوز مؤثر دارو و به تبع آن کاهش عوارض جانبی دوکسوروبیسین باشد. در نتیجه تحمل بیمار در برابر شیمی درمانی افزایش می یابد و شاید کاربرد تلفیقی تکرار تابش امواج فراصدا و دارو در آینده نتایج بسیار رضایت بخشی را بوجود آورد.

۶. تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از بخشی از رساله دکتری رشته بیوفیزیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس می باشد.

۷. مراجع

- [1] A. Alter et al, "Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro," *Ultrasound in Medicine and Biology (UMB)*, vol. 24, p. 711-721, 1998.
- [2] I. Hrazdira, J. Skorikova, M. Dolnikova, "Ultrasonically induced alterations of cultured tumor cells," *European Journal of Ultrasound*, vol. 8, p. 43-49, 1999.
- [3] F. Lejbkovicz, S. Salzberg, "Distinct sensitivity of normal and malignant cells to ultrasound in vitro," *Environmental Health Perspectives*, vol. 105, p. 1575-1578, 1997.
- [4] N. Doan, P. Reher, S. Meghji, M. Harris, "In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokin production by human fibroblasts, osteroblasts, and monocytes," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 57, p. 409-419, 1999.
- [5] S.R. Young, M. Dyson, "Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound," *Ultrasound in Medicine and Biology (UMB)*, vol. 16, p. 809-816, 1990.
- [6] R. Danesi et al, "Pharmacokinetic relationships of the anthracycline anticancer drugs," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 41, p. 431-444, 2002.
- [7] V.S. Moholkar, "Mechanistic optimization of a dual frequency sonochemical reactor," *Chemical Engineering Science*, vol. 64, p. 5255-5267, 2009.
- [8] P. Ciuti et al, "Study into mechanisms of the enhancement of multibubble sonoluminescence emission in interacting fields of different frequencies," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 10, p. 337-341, 2003.

Effect of doxorubicin and dual frequency (kHz-MHz) ultrasound waves exposure on the adenocarcinoma tumor growth

H. Soleimani¹, P. Abdolmaleki^{*1}, T. Toliyat², M. Mokhtari-Dizaji³, A. Tavasoli⁴

1. Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University
2. Pharmacology, Faculty of Pharmacology, Tehran of Medical Sciences University
3. Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
4. Histology, Faculty of Veterinary, Tehran University

Abstract

The effect of dual-frequency low-intensity ultrasound waves with repeated radiation on the breast tumor of Balb/c mice was investigated in the presence of a chemotherapy drug. In this study, the tumor-bearing mice were divided into five groups, two untreated groups (control and sham) and three experimental groups. Experimental groups were: a dual-frequency ultrasound (US) radiation (1 MHz and 150 kHz), a dual-frequency ultrasound with triple exposure (3 x 30 min), and one treated with a dose of doxorubicin alone. The results clearly demonstrate the significant effect of triple exposures of dual-frequency US [dual (REP)] on the increase of survival period of the studied mice. The dual (REP) group, with results similar to the drug-treated group, shows a significant difference from the sham group. With the repeated exposure of dual-frequency ultrasound radiation on mice carrying the chemotherapy drug, the T_2 and T_5 times (times needed by the tumor to grow to 2 and 5 times its initial volume, respectively) decrease. This decrease in T_5 time is significant. It seems that repeated simultaneous exposure to low-intensity dual-frequency (1 MHz and 150 kHz) US can retard the growth of the adenocarcinoma tumor and increase the survival period in mice.

Keywords: Repetition Exposure, Ultrasound waves, Doxorubicin, Adenocarcinoma tumor, Balb/c

pp. 43-50 (In Persian)

* Corresponding author E-mail: parviz@modares.ac.ir