

اثر امواج فراآوایی با بسامد دوگانه شدت پایین بر بقاء یاخته ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰

اکبر عادل‌نیا^۱، منیژه مختاری دیزجی^{۲*}، سامان حسینخانی^۲، محسن بخشنده^۳

۱. گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

در این پژوهش، اثر آواهی تک بسامدی و دوگانه- بسامدی بر مرگ یاخته‌های ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰ در دمای ثابت بررسی شد. ۲۰ گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های آزمون شامل پایش و بدل بودند. یک گروه تحت آواهی ۴۰ کیلوهرتز (شدت 0.24 W/cm^2) و ۱ مگاهرتز (شدت 0.5 W/cm^2) بود و گروهی در معرض تابش همزمان دو بسامد ۴۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز قرار گرفت. هر گروه بسامدی متشکل از هفت زیرگروه بر مبنای مدت زمان آواهی ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ ثانیه‌ای است. بقاء (حیات‌پذیرگی) یاخته بوسیله شیوه ارزیابی ام‌تی‌تی اندازه‌گیری شد. نتیجه نشان داد بقاء یاخته در بسامد ۴۰ هرتز با زمان تابش ۳۰ ثانیه، ۹۶ درصد بود که مقدار آن با افزایش زمان آواهی از ۳۰ ثانیه به ۱۲۰۰ ثانیه به ۶ درصد کاهش یافت. در آواهی دو بسامدی، درصد بقاء در همه زیر گروه‌ها از ۹۵ درصد در زمان آواهی ۳۰ ثانیه به ۳ درصد در زمان تابش ۱۲۰۰ ثانیه رسید. درصد بقاء برای بسامد ۱ مگاهرتز با شیب نسبی کم‌تری از پیش (از ۹۷ درصد برای زمان آواهی ۳۰ ثانیه به ۱۵ درصد برای زمان آواهی ۱۲۰۰ ثانیه) حاصل شد. براساس نتایج حاصله، امواج فراصدا سبب مرگ یاخته ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰ در دمای ثابت شد. آواهی دوگانه- بسامدی، احتمالاً به دلیل افزایش حفره‌سازی، موجب مرگ تعداد بیشتری یاخته نسبت به مرگ یاخته تحت آواهی تک بسامدی، خصوصاً در مدت بالاتر آواهی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: امواج فراآوایی، آواهی بسامدی دوگانه، یاخته‌های ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰، مرگ یاخته‌ای، فراصدا.

۱. مقدمه

بافت هدف خواهد شد [۴]. مهم‌ترین محدودیت نوردینامیک درمانی (فوتوداینامیک تراپی) عمق نفوذ کم پرتو لیزر در بافت بدخیم (تومورال) است [۵]. بنابراین آوادینامیک درمانی (سونودینامیک تراپی)^۲ که در واقع کاربرد امواج فراصدا در درمان با تکیه بر خاصیت حفره‌سازی (کاوکیدن)^۳ صوتی نوع گذرا و فروریزش^۴ آن‌ها است، مطرح شد [۶]. اما، مسئله مهم این است که درمان به روش آوادینامیک درمانی (سونودینامیک تراپی) در صورتی موثر خواهد بود که بتوان در شدت‌های پایین امواج و در دماهای زیر آستانه اثر هیپرترمی حفره‌ها (کاوک)^۵ را به اندازه کافی در محیط درمان تولید و عامل فروریزش آن‌ها را نیز فراهم نمود، تا عامل اصلی ایجاد آسیب‌های زیست‌شناختی (بیولوژیک) که همان رادیکال‌های آزاد مختلف هستند، افزایش یابد. تنها تحت این شرایط می‌توان گفت که این روش در درمان تومورها

ملانوما یکی از تومورهای بدخیم پوستی است که در اثر تغییر در ملانوسیت‌ها (یاخته‌های رنگدانه‌ای پوست) ایجاد می‌شود [۱]. ملانوما علاوه بر پوست، به‌صورت اولیه ممکن است در مخاط دهان و چشم نیز ایجاد گردد [۱-۲]. مبتلایان به ملانوم ممکن است تحت جراحی، شیمی‌درمانی، درمان زیست‌شناختی (بیولوژیک) و یا پرتودرمانی و یا درمان ترکیبی قرار گیرند. آسیب بافت سالم اطراف هم‌چنین، ایجاد سوختگی‌های پوستی، هزینه درمانی بالا و زمان‌بر بودن درمان برای درمانگر از محدودیت‌های استفاده از این روش‌های درمانی است [۳]. از جدیدترین روش‌های درمانی کاربرد برای این سرطان می‌توان نوردینامیک درمانی (فوتوداینامیک تراپی)^۱ را نام برد. در نوردینامیک درمانی (فوتوداینامیک تراپی) وجود عوامل حساس‌کننده نوری و سپس تابش نور لیزر با طول موج مناسب باعث تولید عوامل شیمیایی سمی در

² Sonodynamic therapy

³ Cavitation

⁴ Collapse

⁵ Cavity

* نویسنده پاسخگو: mokhtarm@modares.ac.ir

¹ Photodynamic therapy

(ان سی بی آی^۳، موسسه پاستور ایران) تهیه و در فلاسک تی^۴ ۲۵ و در محیط کشت دی ام ای ام^۵ با غلظت ۴/۵ g/l گلوکز و دارای ۱۰ (۷/۷) درصد سرم جنین گاوی همراه با ۲ میلی مولار گلوتامین-L و ۱ درصد آنتی بیوتیک (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) در هوای مرطوب با غلظت CO₂ ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شدند.

۲-۲. چیدمان فراصدایی

در این مطالعه دو مولد فراصدا به دو جدار یک مخزن مکعبی پر شده از آب دو بار تقطیر از جنس پرسپکس (با ابعاد ۲۰ × ۲۰ × ۲۰ سانتی متر مکعب) در یک هندسه متعام به طوری قرار گرفتند که امواج فراصدای گسیلی از هر یک آن‌ها در فاصله ۱ سانتی متری از سطح مولدها با یکدیگر تداخل کنند (محل قرارگیری فلاسک محتوی یاخته). مولد اول^۶ (قطر ۳۰ میلی متر و سطح تابش موثر ۵ سانتی متر) با بسامد تابشی یک مگاهرتز، عمق میدان نزدیک ۱۴/۵ سانتی متر و بیشینه شدت ۲ W/cm^۲ بود. دومین مولد در آزمایشگاه فراصدا (دانشگاه تربیت مدرس، آزمایشگاه فراصدا، تهران، ایران) و با همکاری شرکت مهندسی پارس نهند (پردیس پارک فناوری، تهران، ایران) با بسامد مرکزی ۳۹/۵ کیلوهرتز (بسامد اسمی ۴۰ کیلوهرتز)، بیشینه شدت ۱/۳۴ W/cm^۲ و قطر موثر ۶۰ میلی متر و عمق میدان نزدیک حدود ۲/۴ سانتی متر طراحی و ساخته شد. کالیبراسیون دستگاهها با استفاده از هیدروفون^۷ پی وی دی اِف^۸ به قطر ۲۵ میلی متر در فاصله ۵ میلی متر از سطح پروب در محور مرکزی تراگذار و در مخزن آب پر شده از آب بدون گاز انجام شد. برای جلوگیری از بازتاب‌های صوتی از دیوار مقابل مخزن، آن‌ها توسط یک ورقه کربن به عنوان جاذب فراصدا پوشیده شدند. شدت امواج فراصدا برای درمان یاخته‌ها ۰/۵ W/cm^۲ برای ۱ مگاهرتز و ۰/۲۴ W/cm^۲ برای ۴۰

مفید خواهد بود. برای رسیدن به این هدف، محققین از پروتکل‌های مختلف تابش دهی با امواج فراصدا استفاده نموده‌اند، ولی تا کنون توفیق کامل حاصل نشده است [۷-۸]. برای غلبه بر این مشکل ایده اصلی در این تحقیق بکارگیری هم‌زمان ترکیبی از امواج فراصدا^۱ در دو محدوده بسامد کیلوهرتز و مگاهرتز است [۹]. از آن جایی که بسامد در محدوده کیلوهرتز موجب افزایش حفره‌سازی می‌شود و در محدوده مگاهرتز نیز حفره‌ها متمرکز می‌شوند، لذا دو بسامد کیلو و مگاهرتز انتخاب شد. برای افزایش فعالیت حفره‌ها، بسامد ۱ مگاهرتز هارمونیک بسامد ۴۰ کیلوهرتز اختیار شد.

با این کار هم‌زمان با افزایش شدیدتر ارتعاش اجزاء کوچک محیطی توسط امواج بسامد بالا، تولید و فروریزش حفره‌ها نیز بیش‌تر شده و موجب تولید رادیکال آزاد بیش‌تر و مؤثرتر در محیط درمان می‌شود [۱۰-۱۱]. در کاواک‌زایی گذرا پس از فروریزش ریزحباب‌ها به صورت محلی، دما و فشار بسیار بالا ایجاد می‌شود. در اثر این تغییرات عوامل شیمیایی شامل رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل ایجاد می‌شود [۱۲-۱۳]. علاوه بر آثار شیمیایی، آثار دیگری نیز مانند اثرات مکانیکی، امواج شوک و تنش برشی به دنبال تابش امواج فراصدایی در بافت و یاخته ایجاد می‌شود. این اثرات می‌تواند باعث آسیب یاخته و نهایتاً مرگ یاخته‌ای شوند [۱۴-۱۵]. شدت امواج، بسامد تابش و زمان تابش از عوامل و سازنده‌های مؤثر بر میزان مرگ یاخته‌ای به حساب می‌آیند. هدف از مطالعه حاضر، تاثیر مدت زمان تابش امواج فراصدا در حالت تابش تک بسامد ۱ مگاهرتز و ۴۰ کیلوهرتز و تابش با بسامد دوگانه (برای افزایش فعالیت حفره‌سازی و آوادینامیک درمانی) با شدت ثابت بر مرگ یاخته‌های ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰ در شرایط زیر آستانه هایپر ترمی است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. کشت یاخته

در انجام این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، یاخته‌های ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰ از بانک یاخته‌های ملی ایران

³ NCBI

⁴ T25

⁵ DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium

⁶ Sonopuls 492, Enrof Nonius Co., Rotterdam, Netherland

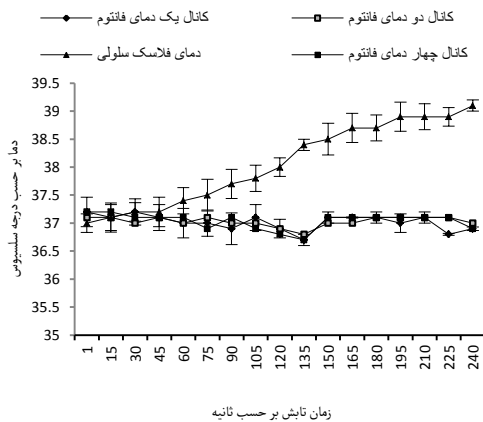
⁷ PA124, Precision Acoustics Ltd., orchester, Dorset, UK.

⁸ PVDF

¹ Ultrasound

² B16-F10

بیش تر است، فلاسک در فاصله ۱ سانتی متری از هر دو مولد و در میدان نزدیک مولدها قرار گرفتند.



شکل ۲ نمودار تغییرات دما در طول مدت تابش امواج فراصدا. ۳ دماسنج در خارج فلاسک قرار داده شد و یک دماسنج در داخل فلاسک قرار گرفت.

۳-۲. سنجش بقا یاخته‌ای

در این مطالعه برای بررسی میزان مرگ یاخته‌ای و ارزیابی فعالیت متابولیک یاخته‌های زنده، از روش ارزیابی (رَوَن)^۲ اِم‌تی‌تی^۳ استفاده شد [۱۶-۱۷]. به منظور سنجش میزان مرگ یاخته‌ای در کم‌ترین فاصله زمانی پس از اعمال هر پروتکل درمانی، یاخته‌های فلاسک درمان شده در یک پلیت ۹۶ خانه مخصوص کشت یاخته قرار گرفتند. برای کاهش خطا برای هر فلاسک یاخته‌ای سنجش (رَوَن) اِم‌تی‌تی در ۳۰ چاهک^۴ از یک پلیت ۹۶ خانه تکرار شد و برای جلوگیری از خطای خوانش از هر سمت پلیت یک ردیف از چاهک‌ها رها شدند و در واقع یک ماتریس ۳×۱۰ از قسمت مرکز پلیت انتخاب گردید. بنابراین پس از خارج کردن محیط کشت و تریپسینه کردن فلاسک به آرامی پیپتاژ انجام داده و یاخته‌های به دست آمده با دور ۱۰۰۰ گرم در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، با رقیق کردن یاخته‌ها توسط بافر در هر چاهک به طور مساوی ۱۰۰۰۰ یاخته قرار داده شد. آزمایش اِم‌تی‌تی برای هر فلاسک ۳۰ بار انجام شد.

کیلوهرتز برای تولید کاواک‌زایی در فلاسک کشت یاخته‌ای انتخاب شد (شکل ۱).



شکل ۱ چیدمان قرارگیری پروب‌های فراصدا و فلاسک محتوی یاخته. دماسنج حیوانی برای اندازه‌گیری دمای محیط و دو ریزدماسنج برای پایش دمای فلاسک در طول تابش قرار داده شده است.

در این مطالعه، ۲۰ گروه تحت مطالعه قرار گرفتند: گروه پایش، بدل، گروه تحت تابش ۴۰ کیلوهرتز (زمان تابش ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ ثانیه). گروه تابش یک مگاهرتز (زمان تابش ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ ثانیه) و گروه تحت تابش دو بسامد هم‌زمان (زمان تابش ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ و ۱۲۰۰ ثانیه) و عمود بر هم ۴۰ کیلوهرتز و یک مگاهرتز است. برای بررسی چگالی انرژی امواج فراصدا در مرگ یاخته‌ای، هر یک از گروه‌های بسامدی بیان شده خود دارای هفت زیرگروه زمانی ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ ثانیه بودند. هر گروه درمانی حداقل ۳ بار تکرار شد. انتخاب زمان تابش براساس پایش دمایی با دماسنج رقمی^۱ (دماسنج ۴ کاناله لوترون ساخت کشور تایوان) انجام شد، به طوری که دمای فلاسک‌های محتوی یاخته زیر آستانه هایپر ترمی در حدود ۳۷ درجه سلسیوس (تغییرات دمایی ± 1 درجه) باشد تا از بروز اثرات دمایی امواج فراصدا بر مرگ یاخته‌ای ممانعت گردد (شکل ۲). هم‌زمان تغییرات دما در خارج فلاسک یاخته‌ای و در محفظه محتوی آب دو بار تقطیر (شبیخ (فانتوم) معادل بافت) اندازه‌گیری شد. برای انتشار امواج فراصدا در فلاسک‌ها، فضای داخل آن‌ها از دی‌ای‌ای‌ام‌پی پر شد. با توجه به این که در میدان نزدیک احتمال تشکیل حباب

² Assay

³ MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

⁴ well

¹ 947 TM-SD

۲-۵. تحلیل آماری

کمیت درصد زنده ماندن یاخته بقا (حیات پذیرگی)^۴ به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. پس از بررسی توزیع هنجار (نرمال) گروه‌ها، تجزیه و تحلیل آماری با سطح معنی داری ۰/۰۵ به روش تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار اِس پی اِس اِس^۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳. نتایج

۳-۱. قابلیت زنده ماندن یاخته

بقا یاخته‌های ملانوما بی-۱۶-اِف ۱۰ در گروه تحت تابش ۱ مگاهرتز در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهند در زمان‌های تابش بیش از ۱۲۰ ثانیه، کاهش معنی داری در بقای یاخته‌ها وجود دارد (عدد p کم‌تر از ۰/۰۵).

جدول ۱ درصد بقا یاخته مرتبط با ۱۰۰۰۰ یاخته بعد از تیمار در زمان‌های تابش مختلف برای بسامد ۱ مگاهرتز، مُد پیوسته و شدت (W/cm^۲ ۰/۵).

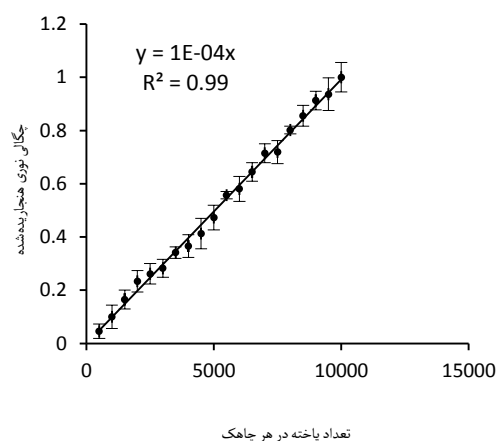
زمان تابش (ثانیه)	میانگین (انحراف معیار) درصد بقا
پایش	۱۰۰ (۶/۰۰)
۳۰	۹۶/۹۴ (۱۰/۶۸)
۶۰	۹۶/۰۸ (۷/۸۸)
۱۲۰	۸۵/۶۱ (۲/۴۹)
۱۵۰	۸۳/۵۱ (۲/۸۵)
۳۰۰	۶۸/۴۵ (۱۱/۵۴)
۶۰۰	۵۲/۴۲ (۶/۲۷)
۱۲۰۰	۱۵/۱۲ (۴/۴۱)

مرگ یاخته‌های ملانوما بی-۱۶-اِف ۱۰ در همه گروه‌ها در مُد بسامدی ۴۰ کیلوهرتز (۰/۲۴ W/cm^۲) با افزایش زمان تابش از ۳۰ ثانیه به ۱۲۰۰ ثانیه افزایش می‌یابد (جدول ۲). از نظر آماری مرگ یاخته‌ای بین همه زمان‌های تابشی به شکل معنی داری متمایز است (عدد p کم‌تر از ۰/۰۵) و این تمایز جز برای زمان تابش ۳۰ ثانیه و گروه پایش برای سایر گروه‌ها وجود دارد.

پس از ۲۰ ساعت، چاهک‌ها با ۱۰۰ μl بافر پی بی اِس^۱ شسته شدند. سپس ۹۰ μl پی بی اِس و ۱۰ μl محلول اِم تی تی به هر چاهک اضافه شد [۱۸]. پلیت برای ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور CO₂ قرار داده شد، سپس محتویات هر چاهک تخلیه شده و به هر چاهک دی اِم اِس^۲ اضافه شد. پس از ده دقیقه، چگالی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش^۳ خوانده شد. چگالی نور بیانگر میزان حیات یاخته است. برای دانستن میزان حیات یاخته و ارتباط آن با چگالی نوری، ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم گردید. برای افزایش دقت کار هر پروتکل درمانی حداقل سه بار تکرار شد.

۲-۴. منحنی کالیبراسیون اِم تی تی

پس از کشت یاخته در فلاسک یاخته‌ای و بدون هیچ درمانی، مقادیر متفاوتی از یاخته‌ها از ۵۰۰ یاخته تا ۱۰۰۰۰ یاخته با فواصل ۵۰۰ تایی داخل هر چاهک قرار گرفت. با توجه به تعداد یاخته در هر چاهک، چگالی نوری عبوری اندازه‌گیری شد و بدین ترتیب منحنی کالیبراسیون رسم گردید (شکل ۳). برای کاهش خطای تکرار پذیری، خوانش حداقل سه بار تکرار گردید.



شکل ۳ منحنی کالیبراسیون، محور افقی تعداد یاخته زنده و محور عمودی چگالی نوری هنجاریده شده است.

¹ PBS; Phosphate Buffered Saline

² DMSO; Dimethylsulfoxide

³ ELISA, ELX800, Bio-Tec USA

⁴ viability%

⁵ SPSS v.16

نبودن مرگ یاخته‌ای در این بازه زمانی است. در زمان تابش ۱۲۰۰ ثانیه، درصد بقا یاخته برای گروه تابشی یک مگاهرتز تقریباً ۵ برابر گروه تابشی دو بسامد و ۳ برابر گروه تابشی ۴۰ کیلو هرتز است. در طول درمان با تابش امواج فراصدا ۱ مگاهرتز، درجه حرارت به سرعت به بالاتر از ۳۷ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد، در نتیجه، برای جلوگیری از افزایش دما بیش از ۱ درجه سلسیوس، براساس نمودار ارائه شده، دستگاه بعد از ۱۲۰ ثانیه تابش، با گام‌های ۱۲۰ ثانیه خاموش می‌شد و سپس تابش دهی ادامه می‌یافت.

۴. بحث

هم‌زمان با عبور امواج فراصدایی از داخل محیط، بخشی از انرژی این امواج به محیط منتقل می‌شود که این انرژی منجر به اثرات گرمایی و غیرگرمایی می‌گردد. در محیط زنده این آثار باعث ایجاد تغییرات زیست‌شناختی (بیولوژیکی) در یاخته و نهایتاً مرگ یاخته‌ای می‌گردد. در بافت زنده علاوه بر این که هر یک از این عوامل به تنهایی می‌توانند باعث مرگ یاخته‌ای شوند می‌توانند با کمک به تحویل دارو یا ژن درمانی نیز باعث مرگ هدفمند در بافت بدخیم موجود زنده شوند. از مهم‌ترین اثرات غیرگرمایی فراصدا می‌توان به، تشکیل ریزفوران (ریزجت)، تنش برشی و تاثیرات مکانیکی هم‌چنین ایجاد کاواک‌زایی اشاره کرد. در پدیده کاواک‌زایی با فروریزش میکرو حباب‌ها به صورت محدود و موضعی دما و فشار شدیداً افزایش می‌یابد. خود این امر سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و یون‌های رادیکال می‌گردد که برای یاخته ایجاد سمیت می‌نماید. در این مقاله اثرات غیرحرارتی امواج فراصدا به خصوص استفاده از کاواک‌زایی مورد نظر بوده است. براتی و همکاران نشان دادند که استفاده از امواج فراصدا با بسامد پایین در محدوده کیلوهرتز، باعث کاواک‌زایی بیش‌تری نسبت به امواج فراصدا با بسامد بالا در محدوده مگاهرتز می‌شود. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند حداکثر فروپاشی حباب زمانی اتفاق می‌افتد که از امواج فراصدا دوگانه یا چند-بسامد استفاده شود [۱۱]. از مقایسه مندرجات ارائه شده در جداول ۱ تا ۳ می‌توان دریافت میزان مرگ یاخته‌ای با افزایش زمان تابش برای هر ۳ مُد

جدول ۲ درصد بقا یاخته مرتبط با ۱۰۰۰۰ یاخته بعد از تیمار در زمان‌های تابش مختلف برای بسامد ۴۰ کیلوهرتز، مد پیوسته و شدت $(W/cm^2 \cdot 0.24)$.

زمان تابش (ثانیه)	میانگین (انحراف معیار) درصد بقا
پایش	۱۰۰ (۶,۰۰)
۳۰	۹۵,۹۰ (۷,۱۶)
۶۰	۸۹,۱۵ (۸,۴۴)
۱۲۰	۷۴,۴۳ (۷,۹۳)
۱۵۰	۶۴,۸۶ (۲,۱۱)
۳۰۰	۴۷,۱۱ (۲,۲۸)
۶۰۰	۲۷,۸۵ (۷,۴۹)
۱۲۰۰	۵,۸۲ (۱,۹۰)

همانند پروتکل بسامد ۴۰ کیلوهرتز، برای حالت دوگانه تابش ۴۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز، بقا یاخته بی ۱۶-اِف ۱۰ در همه زیرگروه‌ها با شیب تند و به‌طور معنی‌داری (عدد p کم‌تر از ۰,۰۵) کاهش می‌یابد (جدول ۳) و این تمایز حتی برای زمان تابش ۳۰ ثانیه و گروه پیش نیز وجود دارد.

جدول ۳ درصد بقا یاخته مرتبط با ۱۰۰۰۰ یاخته بعد از تیمار در زمان‌های تابش مختلف برای بسامد ۱ مگاهرتز $(W/cm^2 \cdot 0.5)$ در مد پیوسته و بسامد ۴۰ کیلوهرتز در مُد پیوسته $(W/cm^2 \cdot 0.24)$.

زمان تابش (ثانیه)	میانگین (انحراف معیار) درصد بقا
پایش	۱۰۰ (۶,۰۰)
۳۰	۹۵,۴۰ (۷,۴۰)
۶۰	۸۸,۸۶ (۶,۲۳)
۱۲۰	۶۳,۰۰ (۷,۲۰)
۱۵۰	۵۸,۷۰ (۲,۹۷)
۳۰۰	۳۹,۱۶ (۵,۳۲)
۶۰۰	۱۷,۵۴ (۴,۶۸)
۱۲۰۰	۳,۳۷ (۰,۱۴)

درصد بقا با شیب کم‌تری برای ۱ مگاهرتز تکرار می‌شود (جدول ۱). ولی با این تفاوت که میزان کاهش بقا بین گروه پیش و گروه بسامدی یک مگاهرتز با زمان تابش ۳۰ ثانیه و هم‌چنین گروه تابشی با زمان تابش ۳۰ ثانیه و ۶۰ ثانیه از نظر آماری معنی‌دار نیست که بیانگر قابل توجه

اختلاف مرگ یاخته‌ای بین تابش با بسامد یک مگاهرتز نسبت به تابش با دو بسامد هم‌زمان به شکل معنی‌داری بیش‌تر شد، اما بین مُد بسامدی ۴۰ کیلوهرتز و بسامد دو-گانه تفاوت معنی‌داری میان مرگ یاخته‌ای برای زمان تابش ۶۰ ثانیه حاصل نشد. با افزایش زمان تابش از ۶۰ ثانیه به ۱۲۰ ثانیه، تفاوت مرگ یاخته‌ای بین این دو نیز از نظر آماری معنی دار گردید. جداول نشان می‌دهند با افزایش زمان تابش این اختلاف باز هم بیش‌تر شده است. در زمان تابش ۳۰۰ ثانیه استفاده از امواج با بسامد دو-گانه می‌تواند تقریباً ۱/۶ برابر نسبت به بسامد ۴۰ کیلوهرتز تنها و ۳ برابر نسبت به بسامد یک مگاهرتز تنها مرگ بیش‌تری ایجاد کند. به نظر می‌رسد شدت مرگ یاخته‌ای در گروه‌های بسامدی مختلف در یک زیرگروه زمانی خاص مثلاً زیرگروه زمانی ۳۰۰ ثانیه با شدت کاواک‌زایی در محیط در ارتباط باشد. از آنجا که امواج فراصدایی دو بسامده کاواک‌زایی بیش‌تر دارند مرگ یاخته‌ای آن‌ها در همه ریزگروه‌های زمانی بیش‌تر از سایر حالات بسامدی بوده است. چنانچه زمان تابش ۱۲۰۰ ثانیه اعمال گردد این مقادیر به‌ترتیب ۲ و ۵ برابر می‌شود. شیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای بر روی یاخته‌های اِچ-۱-۸۹۱۰^۵ از سول‌های رده سرطان تخمدان نشان دادند که تابش امواج فراصدایی با بسامد ۱/۷ مگاهرتز و شدت 0.46 W/cm^2 به مدت ۵ ثانیه تنهایی باعث ایجاد 7.8 ± 2 سمیت در محیط یاخته‌ای می‌شود [۲۰]. اگر چه شیانگ و همکاران اثر شدت و زمان تابش امواج فراصدا در میزان سمیت محیط را بررسی نکردند، ولی آن‌ها دلیل مرگ یاخته‌ای را آپاپتوز دانستند. در مطالعه‌ای دیگر هیو و همکاران بر روی رده یاخته‌ای ملانوما در شرایط در جان^۶ (درون‌تنی) نشان دادند که آوادهی توده یاخته‌ای با بسامد ۱/۱ مگاهرتز و شدت ۱ مگاهرتز منجر به کاهش ۵۰ درصدی حجم تومور می‌شود [۲۱].

میزان مرگ یاخته با افزایش زمان تابش امواج فراصدا بیش‌تر می‌شود ولی حتی زمان تابش ۱۲۰۰ ثانیه هم باعث مرگ یاخته‌ای صددرصدی نشد که می‌تواند به دلیل تابش غیریکنواخت یاخته‌ها و در نتیجه دریافت شدت

بسامدی (۴۰ کیلوهرتز تنها، یک مگاهرتز تنها و تابش هم‌زمان امواج ۴۰ کیلوهرتز و یک مگاهرتز) افزایش یافته است. البته این افزایش مرگ یاخته‌ای برای همه گروه‌ها معنی‌دار نبود؛ مرگ یاخته‌ای که با تابش امواج فراصدا با بسامد یک مگاهرتز تنها به مدت ۳۰ ثانیه اتفاق افتاد از نظر آماری معنی‌دار نیست. به عبارت دیگر، نمی‌توان تمایزی بین این گروه تابشی و گروه پایش قائل شد. این موضوع ($P > 0.05$) صرفاً در امواج فراصدا با بسامد یک مگاهرتز رخ داده و در تابش با مدت زمان برابر (۳۰ ثانیه) برای گروه تابشی ۴۰ کیلوهرتز و بسامد دو-گانه مرگ یاخته‌ای به شکل معنی‌داری نسبت به گروه پایش اتفاق می‌افتد. میزان مرگ یاخته‌ای هنگامی که بسامد دو-گانه استفاده شد به مراتب بیش‌تر بوده است با افزایش زمان تابش مرگ یاخته‌ای در همه گروه‌ها افزایش می‌یابد. این تفاوت در همه گروه‌ها معنی‌دار بوده است تنها در بسامد تابش یک مگاهرتز بین زمان تابش ۱۲۰ ثانیه و ۱۵۰ ثانیه تفاوت معنی‌داری در مرگ یاخته‌ای رخ نداد. از مقایسه نتایج روشن است که تابش امواج با بسامد پایین در محدوده کیلوهرتز با زمان تابش برابر نسبت به امواج با بسامد بالاتر در محدوده مگاهرتز باعث مرگ یاخته‌ای شدیدتری می‌شود، شاید بتوان دلیل این امر را به تشکیل بیش‌تر ریزحباب‌ها در این محدوده بسامدی مرتبط دانست. نتایج ما هم‌خوانی خوبی با نتایج لاگنو و همکاران که به بررسی تابش امواج فراصدایی با بسامد ۱/۸ مگاهرتز در زمان‌های تابش متفاوت بر روی رده‌های یاخته‌ای کی ۵۶۲^۱، اِچ-۱-۶۰^۲، کی جی ال^۳ و اِن‌اِی‌اِلم-۶^۴ مربوط به لوسمی انسان است، دارد [۱۹]. هم‌چنین، نتایج نشان داد در استفاده از تابش با دو بسامد (با زمان تابش برابر) میزان مرگ یاخته‌ای بیش‌تری نسبت به امواج فراصدایی ۴۰ کیلوهرتز رخ می‌دهد. از جداول مشخص است در زمان‌های تابش کوتاه (۳۰ ثانیه) بین مُدهای بسامدی مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. اگرچه میزان مرگ یاخته‌ای برای حالت بسامد دو-گانه از سایرین بیش‌تر است. با افزایش زمان تابش از ۳۰ ثانیه به ۶۰ ثانیه

¹ K562² HL-60³ KG1a⁴ Nalm-6⁵ HO-8910⁶ In vivo

- melanoma: A review," the American Journal of Dermatopathology, vol. 36, no. 7, pp. 578-587, 2014.
- [3] T. AlMahmoud, S. Quinlan-Davidson, G.R. Pond, J. Deschênes, "Outcome analysis of visual acuity and side effect after ruthenium-106 plaque brachytherapy for medium-sized choroidal melanoma," Middle East African Journal of Ophthalmology, vol. 25, no. 2, pp. 103-106, 2018.
- [4] D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain "Photodynamic therapy for cancer," Nature Reviews Cancer; vol. 3, no. 5, pp. 380-387, 2003.
- [5] C. Morton "A synthesis of the world's guidelines on photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer," G Ital Dermatol Venereol, vol.153, no. 6, pp. 783-792. 2018.
- [6] W.K. Bai, E. Shen, B. Hu, "Induction of the apoptosis of cancer cell by sonodynamic therapy: A review," Chinese Journal of Cancer Research, vol. 24, no. 4, pp. 368-373, 2012.
- [7] K. Tachibana, J. Feril LB, Y. Ikeda-Dantsuji "Sonodynamic therapy," Ultrasonics, vol. 48, no. 4, pp. 253-259, 2008.
- [8] D. Costley, C. Mc Ewan, C. Fowley, A.P. McHale, J. Atchison, N. Nomikou, J.F. Callan, "Treating cancer with sonodynamic therapy: A review," International Journal of Hyperthermia, vol. 31, no. 2, pp. 107-117, 2015.
- [9] A. Ebrahiminia, M. Mokhtari-Dizaji, T. Toliyat, "Correlation between iodide dosimetry and terephthalic acid dosimetry to evaluate the reactive radical production due to the acoustic cavitation activity," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 20, no. 1, pp. 366-372, 2013.
- [10] H. Hasanzadeh, M. Mokhtari-Dizaji, S.Z. Bathaie, Z.M. Hassan, V. Nilchiani, H. Goudarzi, "Enhancement and control of acoustic cavitation yield by low-level dual frequency sonication: A subharmonic analysis," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 18, no. 1, pp. 394-400, 2011.
- [11] A.H. Barati, M. Mokhtari-Dizaji, H. Mozdarani, S.Z. Bathaie, Z.M. Hassan, "Effect of exposure parameters on cavitation induced by low-level dual-frequency ultrasound," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 14, no. 6, pp. 783-789, 2007.
- [12] P. Riesz, T. Kondo, "Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications," Free Radical Biology and Medicine, vol. 13, no. 3, pp. 247-270, 1992.
- [13] P. Riesz, D. Berdahl, C. Christman, "Free radical generation by ultrasound in aqueous

تابشی متفاوت نسبت به فاصله از سطح پروب و یا حتی خطای رخ داده در سنجش اِم-تی تی به عنوان یک روش رنگ‌سنجی باشد. علاوه بر اثرات سمیت امواج فراصدا به تنهایی، می‌توان با استفاده هم‌زمان از امواج فراصدا و داروهای شیمی درمانی حساس به صدا اثرات سمیتی داروهای ضدسرطان را نیز بهبود بخشید.

۵. نتیجه‌گیری

امواج فراصدا قادرند باعث مرگ یاخته‌های ملانوما بی ۱۶-اِف ۱۰ شوند. با توجه به این‌که در طول مدت تابش امواج فراصدا مرتبط با در این تحقیق سعی شده است که تغییرات دمایی در محیط رخ ندهد، مرگ یاخته‌ای رخ داده مربوط به اثرات غیرگرمایی تابش امواج فراصدایی به ویژه پدیده کاواک‌زایی است. با توجه به این‌که امواج پربسامد کاواک‌زایی کم‌تری ایجاد می‌کنند مرگ یاخته‌ای برای بسامد یک مگاهرتز از سایر گروه‌های بسامدی کم‌تر رخ می‌دهد که با توجه به این‌که از امواج پربسامد (در محدوده مگاهرتز) در آوانگاری (سونوگرافی) تشخیصی استفاده می‌شود مطلوب است. میزان مرگ یاخته با افزایش زمان تابش امواج فراصدا بیشتر می‌شود ولی حتی زمان تابش ۱۲۰۰ ثانیه هم باعث مرگ یاخته‌ای صددرصدی نشد که می‌تواند به دلیل تابش غیریکنواخت یاخته‌ها باشد. از نتایج حاصل مشخص است تابش دو-بسامد به شکل مشخص‌تری باعث ایجاد مرگ یاخته‌ای می‌شود و این اختلاف در زمان‌های تابش بالاتر بهتر خود را نشان می‌دهد.

۶. تقدیر و تشکر

این تحقیق قسمتی از رساله دکتری رشته فیزیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است.

۷. مراجع

- [1] E.A. Merkel, P. Gerami "Malignant melanoma of sun-protected sites: A review of clinical, histological, and molecular features," Lab Invest, vol. 97, no. 6, pp. 630-634, 2017.
- [2] S.V. Lourenço, J.D. Fernandes, R. Hsieh, C.M. Coutinho-Camillo, S. Bologna, M. Sanguenza, "Head and neck mucosal

- and nonaqueous solutions,” *Environ Health Perspect*, vol. 64, pp. 233-252, 1985.
- [14] J. Li, L. Ma, X. Liao, D. Liu, X. Lu, S. Chen, X. Ye, T. Ding, “Ultrasound-induced *Escherichia coli* O157: H7 cell death exhibits physical disruption and biochemical apoptosis,” *Front Microbiol*, vol. 9, pp. 2486-2496, 2018.
- [15] P.E. Huber, J. Jenne, J. Debus, M.F. Wannemacher, P. Pfisterer, “A comparison of shock wave and sinusoidal-focused ultrasound-induced localized transfection of HeLa cells,” *Ultrasound in Medicin and Biology*, vol. 25, no. 9, pp. 1451-1457, 1999.
- [16] F. Angius, A. Floris, “Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair,” *Toxicology in Vitro*, vol. 29, no. 2, pp. 314-319, 2015.
- [17] R. Requena, M. Vargas, A. Chiralt, “Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay,” *LWT*, vol. 101, pp. 183-190, 2019.
- [18] S. Rekha, E. Anila, “In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay,” *Materials Letters*, vol. 236, pp. 637-639, 2019.
- [19] L. Lagneaux, E.C. de Meulenaer, A. Delforge, M. Dejeneffe, M. Massy, C. Moerman, B. Hannecart, Y. Canivet, M.F. Lepeltier, D. Bron, “Ultrasonic low-energy treatment: A novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells,” *Experimental Hematology*, vol. 30, no. 11, pp. 1293-1301, 2002.
- [20] J. Xiang, X. Xia, Y. Jiang, A.W. Leung, X. Wang, J. Xu, P. Wang, H. Yu, D. Bai, X. Chuanshan “Apoptosis of ovarian cancer cells induced by methylene blue-mediated sonodynamic action,” *Ultrasonics*, vol. 51, no. 3, pp. 390-395, 2011,
- [21] Z. Hu, H. Fan, G. Lv, Q. Zhou, B. Yang, J. Zheng, W. Cao, “5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy induces anti-tumor effects in malignant melanoma via p53-miR-34a-Sirt1 axis,” *Journal of Dermatological Science*, vol. 79, no. 2, pp. 155-162, 2015.