

درمان تومور آدنوکارسینوما پستان با امواج فراصوت دوفراکانسی

## درمان مدل حیوانی تومور آدنوکارسینوما پستان با استفاده از امواج فراصوت دو فرکانسی پیوسته

امیر هوشنگ براتی<sup>۱\*</sup>، منیژه مختاری دیزجی<sup>۲\*</sup>، حسین مزارانی<sup>۳</sup>، سیده زهرا بطحایی<sup>۴</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۵</sup>، انوشیروان کاظم نژاد<sup>۶</sup>

۱- دکتری فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۵- دانشیار، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۶- دانشیار، گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۴

### چکیده

**مقدمه:** حفره سازی اکوستیکی نوع گذرا عامل ایجاد واکنش های سونوشیمیایی ناشی از تابش امواج کم توان فراصوتی است که می تواند در درمان سرطان ها مؤثر باشد. در مطالعه حاضر، اثر درمانی ترکیب هم زمان تابش فراصوتی دو فرکانس پیوسته با سطح شدت ۵/۳ وات بر سانتی متر مربع، در درمان تومور آدنوکارسینوما پستان موش Balb/c مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روشها:** ۴۰ موش حامل تومور به چهار گروه ده تایی شامل دو گروه تحت درمان با ترکیب فرکانسی پیوسته ۱ مگاهرتز پیوسته و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با ۱۵ و ۳۰ دقیقه زمان تابش و گروه های غیر درمان شامل کنترل و شم تقسیم شدند. پارامترهای تاخیر رشد تومور شامل حجم تومور، حجم نسبی تومور، زمان لازم برای رسیدن تومور به حجم های ۲ و ۵ برابر حجم اولیه، زمان بقا و درصد مهار رشد تومور در روزهای مختلف بعد از شروع درمان برآورد شد.

**نتایج:** رشد تومور در گروه های درمان شده با ترکیب تابش دهی هم زمان ۱ مگاهرتز پیوسته و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته به طور معنی داری نسبت به گروه شم با تاخیر همراه بودند. حجم تومور و حجم نسبی تومورها نیز موید اثر ضد توموری امواج فراصوت ترکیبی به ویژه در گروه تابش دو فرکانس با زمان تابش ۳۰ دقیقه است. تمایز معنی داری میان حجم تومور ۱۲ روز بعد از درمان در گروه درمان با ۳۰ دقیقه زمان تابش دهی با گروه شم وجود دارد (عدد p کمتر از ۰/۰۵). میانگین زمان بقا حیوان ها در گروه درمان با ۳۰ دقیقه تابش ۱۶ درصد بیش از گروه کنترل است. مقایسه پارامتر درصد توقف رشد تومور برای گروه های درمانی با تابش امواج فراصوت دو فرکانسی بهینه با زمان تابش ۳۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب ۲۱ و ۲۳ درصد نسبت به گروه شم، حاکی از وجود اختلاف آماری معنی دار بین گروه های درمانی با امواج فراصوت دو فرکانسی بهینه است.

**نتیجه گیری:** تابش ترکیبی امواج فراصوت دو فرکانس در شدت های پایین می تواند به عنوان گزینه ای مناسب در درمان تومورها به روش سونودینامیکی پیشنهاد شود. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۶، شماره ۱، پیاپی (۲۲)، بهار ۸۸: ۱۲-۱)

**واژگان کلیدی:** سونودینامیک تراپی، کم شدت، حفره سازی گذرا، سرطان پستان

\* نویسنده مسؤل: منیژه مختاری دیزجی

آدرس: تهران، گروه فیزیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

mokhtarm@modares.ac.ir

تلفن: ۸۲۸۸۳۸۹۳-۸۲۸۸۳۸۹۳ (۲۱) +۹۸ نمابر: ۸۸۰۰۶۵۴۴-۸۸۰۰۶۵۴۴ (۲۱) +۹۸

• آدرس فعلی: گروه فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

کردستان، سنندج

## ۱- مقدمه

القاء حفره سازی گذرا با افزایش فرکانس امواج تابشی، افزایش می یابد. به همین دلیل وقوع آن در شدت های تشخیصی اولتراسونیک، مورد تردید است، ولی در شدت های درمانی و بالاتر از آن و نیز در فرکانس های پایین تر به عنوان عامل مؤثری در حوزه درمان مورد توجه قرار دارد [۸-۱۲]. مطابق معیار اندیکس مکانیکی، آستانه شدت مورد نیاز برای شروع حفره سازی ناپایدار در بافت های بیولوژیک ( $M.I = \frac{P}{\sqrt{f}}$ ) در فرکانس های پایین، فشار آکوستیکی کمتری برای حفره سازی نوع گذرا نیازمند است که به دلیل زمان طولانی فاز تراکم و انبساط امواج، فرصت کافی برای تولید و نابودی حفره ها در محیط تابش را فراهم می کند [۳، ۱۳].

پدیده حفره سازی در فرکانس های پایین بیشتر اتفاق می افتد، زیرا طولانی شدن زمان در فازهای تراکم و انبساط فرصت کافی برای تولید و نابودی حفره ها در محیط تابش را فراهم می کند. پدیده حفره سازی در یک میدان امواج ترکیبی تشدید می شود، به ویژه در شرایطی که فرکانس های اعمالی متفاوت باشد، رفتار یک حباب (حفره) در یک میدان تابش امواج فراصوتی شبیه یک نوسانگر فیزیکی است که در فرکانس خاصی نوسان می کند، به طوری که فرکانس پایه آن تابعی است از فرکانس موج تابشی، ابعاد حفره و خصوصیات محیط در برگیرنده آن است. حال اگر تنها از یک موج فراصوتی با فرکانس مشخص استفاده شود، حفره در حال نوسان با فرکانس پایه خود به نوسان ادامه می دهد و یا تا مدت نسبتاً طولانی می تواند به حرکت نوسانی خود ادامه دهد. در این حالت اگر عمل حفره سازی اتفاق بیفتد، بیشتر از نوع پایدار آن خواهد بود. اما اگر بطور همزمان از دو یا چند فرکانس استفاده شود به دلایل زیر عمل تولید حفره سازی بیشتر و عامل نابودی آنها نیز فراهم می گردد [۴، ۱۴]:

- اغتشاش بیشتر در محیط تابش و به نوبه خود تولید حفره بیشتر در محیط تابش

همواره سه مکانیسم شناخته شده و اصلی برای اندرکنش امواج فراصوتی با محیط های مادی مورد توجه بوده است: تابش نیروی آکوستیکی، اندرکنش های گرمایی و حفره سازی آکوستیکی [۱]. در بین این سه مکانیزم حفره سازی آکوستیکی با ابعاد چند صدنانو، بیش از سایر مکانیزم ها در اثرات غیر گرمایی امواج فراصوت مؤثر است. در طول انتشار امواج فراصوتی در محیط های مادی، در نواحی تراکم، فشار آکوستیکی مثبت و در نواحی انبساط فشار آکوستیکی منفی موجب تشکیل حباب های گاز و همچنین رشد آن ها می شود. چنین رفتار دینامیکی خاص در محیط تابش را حفره سازی آکوستیکی گویند [۲]. از نقطه نظر تاریخی پدیده حفره سازی آکوستیکی به دو دسته حفره سازی پایدار و حفره سازی گذرا یا ناپایدار تقسیم می شود [۳-۵]. حفره سازی گذرا و یا اینرسی<sup>۱</sup> معرف دینامیک حباب های چند صد نانومتری با عمر کوتاه است که در آن میکرو حباب ها تحت تاثیر تغییرات زیاد حجم در طول زمانی تنها چند سیکل امواج وجود دارند و در مدت نسبتاً کوتاهی نابود می شوند. انرژی متمرکز در این حباب ها با فرآیند کولاپس شدن کامل آن ها در محیط تابش آزاد و در ابعاد صد نانومتری و در محل کولاپس شدن، دما و فشار زیادی ایجاد می شود. ماکزیمم فشار و دمای داخل یک حفره گذرای آکوستیکی در لحظه انفجار یا کولاپس آن ها از مدل های ریاضی معادلات دیفرانسیل Plesset Rayleigh و Flynn-Nolting محاسبه می شود. با حل معادلات، حداکثر فشار و گرمای داخل یک حفره گذرای آکوستیکی در لحظه انفجار یا کولاپس حاصل می شود [۱، ۴، ۶]. محققین مقدار این دما و فشار را از مرتبه ۵۰۰۰ کلوین و ۱۰۰۰ اتمسفر برآورد نموده اند [۶، ۷]. از طرفی حفره سازی ناپایدار پدیده ای آستانه دار بوده و برای تولید آن نیاز به حداقل شدت امواج فراصوتی است [۸]. آستانه شدت یا فشار آکوستیکی مورد نیاز برای

<sup>1</sup> Transient cavitation

درمان تومور آدنوکارسینوما ی پستان با امواج فراصوت دوفراکانسی

انفرادی و ترکیب همزمان فرکانس های یک مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز در القا فرآیند حفره سازی نوع گذرا مورد بررسی قرار گرفت و روش اجرایی بهینه زیر حد هایپرمی استخراج شد [۱۶]. در این مطالعه روش اجرایی بهینه شامل ترکیب هم زمان دو موج فراصوتی با فرکانس های یک مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز در القاء فرآیند حفره سازی نوع گذرا در غیاب حساس کننده های صوتی در کنترل روند رشد تومور آدنوکارسینوما ی مدل حیوانی پستان در موش نژاد Balb/c مورد بررسی قرار می گیرد. نظر به این که فرآیند درمان به روش سونودینامیک تراپی وابستگی زیادی به حفره های آکوستیکی نوع گذرا دارد، لذا بررسی اثر این ترکیب های فرکانسی بهینه می تواند در انتخاب پروتکل تابش دهی در سونودینامیک تراپی مؤثر باشد.

## ۲- مواد و روشها

بافت تومور آدنوکارسینوما ی پستان برای پیوند به موشهای Balb/c ماده هم خون، از یک تومور پستان خود به خود که در یک موش Balb/c از همان جنس و نژاد و با عمر تقریبی ۴-۵ هفته ایجاد شده بود، برداشت گردید و به روش کاشت، حدود ۲ میلیمتر مکعب از تومور در زیر پوست موش های گیرنده (در ناحیه راست شکم) و در شرایط بیهوشی منتقل شد. حیوانات با مقدار ۳۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان با مواد بیهوش کننده کتامین و زایلین به نسبت ۰/۵ و ۱ سی سی در ۸/۵ سی سی فسفات بافر سالین قابل تزریق با pH برابر ۷/۴ بیهوش شدند. در طول مدت نگهداری حیوانات، تغذیه و آب، فضای نگهداری، دما و هوا، عمل انتقال و سایر پارامترهای نگهداری، بر اساس توصیه ها و روش های مرجع نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد [۱۷].

در مطالعه حاضر، ۴۰ موش حامل تومور به ۴ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل، گروه شم (اعمال کلیه روش های تابش دهی بدون روشن بودن سیستم فراصوتی)، گروه درمان شده با امواج فراصوت دو فرکانسی با ترکیب تابش دهی در مد

- ناپایداری در نوسان حفره های تولیدی توسط یکی از فرکانس ها و ناپایداری محیط در تولید و نابودی حفره ها و تولید حفره های ناپایدار بیشتر  
- افزایش عمل انتقال جرم موجب انتقال و نفوذ عوامل درمانی در محیط های مختلف، تشدید سونوپوریشن و سونوفورزیس توسط امواج فراصوتی  
- افزایش احتمال اندرکنش حفره- حفره و حفره- صوت  
- کاهش فشار شبه استاتیک در فاز انبساط یکی از امواج، به ویژه موج فرکانس پایین، در محیط تابش با محدوده های مختلف فرکانسی، به طوری که منبع دیگر فرکانسی موج تابشی در شدت های پایین تری عمل حفره سازی را آغاز می نماید.

پارامترهای مختلفی مانند فشار آکوستیکی، دما، فشار محیط، ویسکوزیته محیط، ظرفیت گرمایی ویژه گازهای درون حفره ای، نیروی کشش سطحی و فرکانس امواج تابشی در شکل گیری و نابودی حفره های آکوستیکی مؤثرند [۴].

نظر به اینکه یک حفره به عنوان یک بسته انرژی عمل می کند، می تواند مورد استفاده های متنوعی داشته باشد. لذا پدیده فوق در حوزه های مختلف هم در ابعاد نظری و هم در ابعاد کاربردی مورد توجه محققین قرار گرفته است. موضوع مهم آرایش فرکانسی، اختلاف آن ها و در نهایت اعمال مد و تأثیر سایر پارامترهای امواج ترکیبی در تولید پدیده حفره سازی است. همچنین میزان تأثیر گذاری آرایش خاص ترکیب انتخابی در شرایط آزمایشگاهی برای مقصود مورد نظر می تواند از موضوعات مورد توجه باشد. چون حفره سازی آکوستیکی نوع گذرا عامل ایجاد واکنش های سونوشیمیایی ناشی از تابش امواج فراصوتی است، بنا بر این می تواند در حضور عوامل دارویی در درمان سرطان ها (سونودینامیک تراپی) مؤثر باشد [۱۵،۳]. در مطالعات قبلی گروه حاضر با بررسی پارامترهای مختلف تابش دهی شامل مد تابش دهی، فرکانس، شدت، دیوریشن پالس، فاکتور کار و زمان تابش موج به صورت

مرحله ترکیب های تابش هم زمانی یک مگاهرتز پیوسته و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته، به عنوان پروتکل های تابش دهی بهینه که حداکثر میزان القاء حفره سازی را داشتند، برای تابش دهی در درمان تومورها انتخاب شدند. محفظه ای از جنس مواد پلی اکریلیک و به ابعاد  $25 \times 25 \times 30$  سانتی متر برای تابش دهی تومورها طراحی و ساخته شد. در دو وجه مجاور و عمود بر هم و در ارتفاع ۱۵ سانتی متری از کف این محفظه، دو سوراخ دایره ای به اندازه قطر پروب های ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز ایجاد گردید. پروب ها از طریق این سوراخ ها وارد و در آن محل ثابت شدند. آرایش دو پروب به گونه ای است که محور مرکزی انتشار امواج فراصوتی بر هم عمود و مختصات محل تقاطع این محورها از وجه جلوی هر یک از پروب ها ۱ سانتی متر تنظیم شود. قسمتی از دیواره داخلی وجوه مقابل هر یک از پروب ها با مواد جاذب صوت از جنس لاستیک فشرده پوشانده شد تا از انعکاس امواج فراصوتی و تداخل آن با امواج تابشی جلوگیری نماید. داخل محفظه از آب مقطر فاقد گاز پر شد و قبل از تابش دهی، مقداری ماده شوینده به آن افزوده شد تا از تشکیل حباب جلوگیری شود. قبل از تابش دهی موش های حامل تومور، دمای آب داخل محفظه با یک المنت حرارتی - الکتریکی گرم شده تا در طول تابش دهی حیوان های حامل تومور دچار شوک ناشی از سرما نشوند. برای جلوگیری از شوک سرمایی به حیوان، دمای آب درون محفظه در محدوده ۳۲ تا ۳۴ درجه سانتی گراد ثابت شد. برای قرار گرفتن ناحیه توموری حیوان های حامل تومور درون محفظه بایستی طرحی ارائه شود که امکان دست کاری و داشتن درجه آزادی حرکت در جهات مختلف و در نتیجه تنظیم صحیح تومورها در محل تقاطع انتشار امواج فراصوتی از دو پروب در فاصله یک سانتی متری هر یک از آنها وجود داشته باشد. آرایش این سیستم به گونه ای است که با سه درجه آزادی امکان قرارگیری تومور در میدان تداخل امواج فراصوتی از دو منبع وجود داشته باشد. ضمن نگهداشتن سر حیوان در

پیوسته ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز با مدت زمان تابش دهی ۳۰ دقیقه، گروه درمان شده با امواج فراصوت دو فرکانسی با ترکیب تابش دهی در مد پیوسته ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز با مدت زمان تابش دهی ۱۵ دقیقه تقسیم شدند. قطر کوچک (a) و قطر بزرگ (b) تومور پس از رسیدن قطر متوسط آن ها به قطر تقریبی ۸ تا ۱۰ میلی متر هر دو روز یک بار با کولیس دیجیتالی با دقت  $0.1/0$  میلی متر پایش و در پایان حجم اولیه آنها از رابطه  $Vo(mm^3) = a_0^2 \times b_0 \times 0.5$  محاسبه و به عنوان حجم اولیه آن ها در شروع درمان ثبت شد. برای اطمینان از نوع تومور و انجام درجه بندی، نمونه ای از تومور در هر گروه برای انجام آزمایش های هیستوپاتولوژیکی برداشت و پس از طی مراحل مختلف تهیه لام، بررسی های هیستوپاتولوژیکی به کمک پاتولوژیست حیوانی انجام گردید. منابع امواج شامل الف) منبع موج صوتی ۱۵۰ کیلوهرتز (SM 3670، Shrewsbury Medical Co.، UK)، با حداکثر شدت<sup>۱</sup> (ISATA)، ۱ وات بر سانتی متر مربع. این سیستم دارای قابلیت انتخاب فاکتورهای کار ۱۰۰، ۵۰، ۳۳ و ۲۵ درصد، با سیستم ترانسدیوسر نوع PZT است. ب) منبع موج فراصوت دیگر، سیستم ۱ مگاهرتز (Sonoplus 462، Netherland، Enrof Nonius Co.)، با حداکثر شدت (ISATA)  $4/5$  وات بر سانتی متر مربع و فاکتور کار ۱۰۰، ۸۰، ۵۰ و ۲۵ درصد با سیستم ترانسدیوسر PZT. دو منبع مولد صوت در آرایش عمود بر هم نصب شدند. منابع با استفاده از وات متر (UPM-DT-10، Netech Co.، USA) با دقت  $\pm 1$  میلی وات و در محیط آب فاقد گاز کالیبره شدند.

قبل از تابش دهی حیوان های حامل تومور، ابتدا ترکیب های مختلف تابش دهی با امواج دو فرکانسی فوق را برای دست یابی به القاء بیشتر حفره های نوع گذرا، به روش دزیمتری شیمیایی ترفتالیک اسید<sup>۲</sup>، در محیط آزمایشگاه، مورد بررسی قرار گرفت [۱۶]. با اجرای این

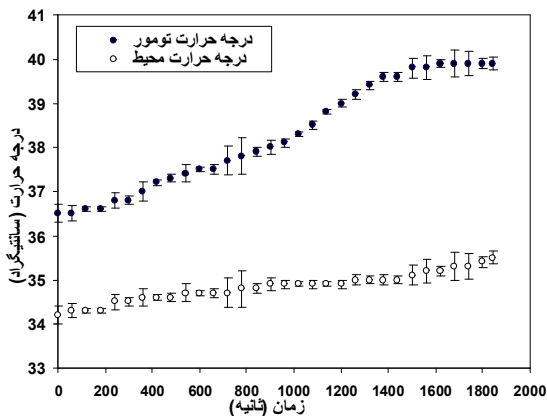
<sup>1</sup> Spatial Average Temporal Average

<sup>2</sup> Terephthalic acid

نرمال بودن توزیع نمونه‌ها از آزمون برازندگی کولموگراف-اسمیرنوف (K-S test) استفاده گردید. میان، میانگین و انحراف معیار پارامترهای مختلف تأخیر روند رشد تومور محاسبه و تمایز بین گروهی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد. بقای حیوانات حامل تومور در گروه‌های مورد بررسی توسط آنالیز آماری Kaplan-Meier و Log Rank مقایسه شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS V.11 (SPSS/PC Inc., SPSS V.11 Chicago, IL) انجام گرفت. در کلیه بررسی‌ها عدد p کمتر از ۰/۰۵ معنا دار در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج

پایش دمایی تومورها در طول زمان تابش دهی نشان داد که حد اکثر دمایی حاصل با تابش مد ترکیب هم زمان پیوسته ۱ مگا هرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز، زیر حد‌های پیری و کمتر از ۴۲ درجه سانتی گراد است. هر نقطه حاصل میانگین و انحراف معیار اندازه‌گیری ۶ تومور است (شکل ۱). پایش دمایی از آن جهت اهمیت دارد که اثر هایپرترمی ناشی در فرآیند مرگ سلولی را ندارد.



شکل ۱- تغییرات دمایی تومورها و محیط آن‌ها در طول زمان تابش دهی

قبل از شروع تابش دهی تومورها در پروتکل‌های درمانی مختلف، مدهای تابش هم زمان ترکیبی با منابع فراصوتی به روش دزیمتری شیمیایی ترفتالیک اسید [۱۸] بررسی شد تا مؤثرترین ترکیب و مدت تابش دهی در القاء حفره سازی

خارج از آب، تومور مستقیماً در مسیر تابش قرار می‌گیرد. حیوان‌های حامل تومور پس از بیهوشی و زدودن موی ناحیه تومورال، در قفس تابش دهی قرار می‌گیرد. برای اطمینان از تابش در زیر حد‌های پیری، در طول تابش دهی تغییرات دمایی محیط تابش و تومور در هر دقیقه به وسیله ترمومتری با دو میکرو ترموکوپل (LUTRON, CHY,502A, تایوان) متصل به رایانه شخصی، ثبت گردید. پارامترهای تأخیر در روند رشد تومور شامل حجم اولیه تومور در آغاز درمان ( $V_0$ )، حجم تومور در روزهای متوالی پس از درمان ( $V$ )، درصد حجم نسبی تومور و نیز مدت زمان بقای حیوان‌های حامل تومور در گروه‌های مورد بررسی حاصل شد. پارامتر دیگر درصد بازدارندگی نسبی در روند رشد<sup>۱</sup> تومور است. با محاسبه این پارامتر امکان محاسبه میزان موفقیت پروتکل درمانی مورد نظر در روند کاهش رشد تومورها در روزهای متوالی پس از درمان فراهم می‌شود. این پارامتر نیز برای گروه‌های درمانی، گروه کنترل و گروه شم از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۷]:

$$Inhibition\ ratio\ (\%) = (V_{dayX} / V_{S,dayX}) \times 100$$

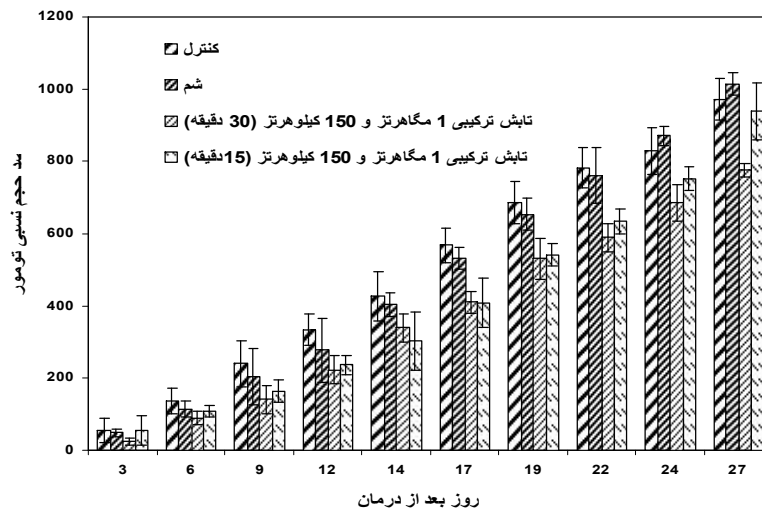
در این رابطه حجم  $V_{dayX}$ ، نشان دهنده حجم تومور مورد نظر در گروه دلخواه و در روز دلخواه پس از درمان است و حجم  $V_{S,dayX}$ ، حجم تومور در همان روز در گروه شم است. پس از رسیدن قطر متوسط تومورها به حدود ۸ تا ۱۰ میلی‌متر، حیوان‌های حامل تومور به گروه‌های درمانی تقسیم شدند و مطابق پروتکل درمانی ارائه شده، تحت تابش قرار گرفتند. پس از اعمال پروتکل درمانی، چگونگی رشد تومورها هر دو روز یک بار تا ۳۰ روز با اندازه‌گیری اقطار بزرگ و کوچک تومور توسط کولیس دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر انجام گرفت. برای کاهش خطا، اندازه‌گیری سه بار تکرار شد. نتایج با استفاده از آمار توصیفی آنالیز شد و تعداد حیوان‌های حامل تومور در هر گروه با سطح اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۵ درصد، ۱۰ نمونه در هر گروه برآورد شد. برای بررسی

<sup>۱</sup> Inhibition Ratio%

حاضر، آثار درمانی مد تابش دهی ترکیبی یک مگاهرتز پیوسته و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته حاصل از دو منبع ۵/۳ وات بر سانتی متر مربع و با زمان تابش ۳۰ و ۱۵ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج افزایش حجم نسبی تومور که برای چگونگی رشد تومورها در گروه های کنترل، شم، گروه درمان مد ترکیبی فراصوتی با ۳۰ دقیقه تابش و گروه درمان مد ترکیبی فراصوتی با ۱۵ دقیقه تابش در شکل ۲ آمده است.

ناپایدار به دست آید. نتایج نشان داد که میزان لومینسانس همواره در مد تابش دهی ترکیبی بیش از جمع جبری آنها و به صورت هم افزایی است. آنالیز آماری آنوا نشان می دهد که در بین مدهای مختلف تابش ترکیبی، مدهای تابش دهی هم زمانی ۱ مگاهرتز پیوسته و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و یک مگاهرتز پالسی با دیوریشن ۸۰ درصد و ۱۵۰ کیلوهرتز پالسی پیوسته بیش از سایر مدها در ایجاد لومینسانس مؤثرند (عدد p کمتر از ۰/۰۵). در مطالعه



شکل ۲- میانگین و انحراف معیار روند افزایش حجم نسبی تومور در روزهای ۰ تا ۲۷ روز پس از درمان در گروه های کنترل، شم، درمان با امواج ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با ۳۰ دقیقه تابش و درمان با امواج ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با ۱۵ دقیقه تابش

آن است که در گروه درمان ترکیبی با ۳۰ دقیقه تابش، این زمانها به ترتیب ۲۳ و ۲۱ درصد افزایش داشته است.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار زمان های مورد نیاز برای رسیدن حجم تومورها به اندازه ۲ (T<sub>2</sub>) و ۵ (T<sub>5</sub>) برابر حجم اولیه آن ها در شروع درمان حیوانات حامل تومور بر حسب روز

گروه های درمانی	T <sub>2</sub> (روز)	T <sub>5</sub> (روز)
کنترل	۵/۵۰ ± ۱/۹۷	۱۳/۳۲ ± ۱/۳۵
شم	۵/۱۰ ± ۲/۵۱	۱۴/۲۶ ± ۱/۱۴
درمان با ۳۰ دقیقه تابش	۶/۳۰ ± ۲/۰۵	۱۷/۲۱ ± ۰/۶۲
درمان با ۱۵ دقیقه تابش	۵/۵۰ ± ۱/۶۹	۱۷/۵۰ ± ۰/۹۷

آنالیز آزمون زوج تی تمایز معنی داری را میان زمان T<sub>2</sub> گروه درمانی با ۳۰ دقیقه تابش و گروه شام نشان نداد (P>۰/۰۵). در

بررسی درصد حجم نسبی نشان می دهد که تمایز معنی داری میان گروه های درمان با گروه های کنترل و شم در روزهای اولیه از آغاز درمان تا روز ۱۸ ام مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، لکن از روز ۱۸ام به بعد این اختلاف برای گروه های با تابش ۳۰ دقیقه و شم معنی دار است (P<۰/۰۵). زمان های مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به ۲ و ۵ برابر حجم اولیه از شروع درمان در جدول ۱ آمده است.

آنالیز آزمون زوج تی تمایز معنی داری را میان زمان T<sub>2</sub> گروه درمانی با ۳۰ دقیقه تابش و گروه شام نشان نداد (P>۰/۰۵). در صورتی که این مقایسه برای زمان T<sub>5</sub> بین این دو گروه معنی دار است (P<۰/۰۵). همچنین نتایج زمان های مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به اندازه ۲ و ۵ برابر حجم اولیه، حاکی از

درمان تومور آدنوکارسینومای پستان با امواج فراصوت دوفراکانسی

کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در روزهای سوم (T<sub>3</sub>)، نهم (T<sub>9</sub>)، هجدهم (T<sub>18</sub>)، بیست هفتم (T<sub>27</sub>) پس از درمان و زمان کل ارزیابی (T<sub>total</sub>) و یا در واقع اثر توقف رشد تومور برآیند در طول فرآیند درمان نشان می دهد که مد تابش ترکیبی فراصوتی پیوسته به مدت ۳۰ دقیقه، بیش از مد تابش ۱۵ دقیقه در درصد روند توقف رشد تومورها مؤثر بوده است. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲ آمده است.

صورتی که این مقایسه برای زمان T<sub>s</sub> بین این دو گروه معنی دار است (P<۰/۰۵). همچنین نتایج زمان های مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به اندازه ۲ و ۵ برابر حجم اولیه، حاکی از آن است که در گروه درمان ترکیبی با ۳۰ دقیقه تابش، این زمان ها به ترتیب ۲۳ و ۲۱ درصد افزایش داشته است. نتایج بررسی درصد توقف رشد تومورها در گروه های درمانی اکسپوز شده با پروتکل تابش ترکیبی پیوسته ۱ مگاهرتز و ۱۵۰

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار درصد توقف رشد تومورها در گروه های درمانی اکسپوز شده با پروتکل های تابش ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته به مدت ۳۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه نسبت به گروه شم در روز های سوم، نهم، هجدهم، بیست و هفتم و زمان کل ارزیابی

T <sub>total</sub>	T <sub>27</sub>	T <sub>18</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>3</sub>	درصد توقف رشد تومور در گروه های درمانی
۲۳/۰±۱/۲	۲۸/۲±۰/۶	۱۹/۱±۰/۵	۲۳/۰±۰/۱	۲۱/۰±۰/۷	درمان با ۳۰ دقیقه تابش
۲۰/۰±۲/۴	۴/۳±۱/۵	۵/۰±۱/۰	۷/۱±۰/۵	۱۳/۰±۰/۹	درمان با ۱۵ دقیقه تابش

تابش و درمان با ۱۵ دقیقه تابش با روش آماری Kaplan-Meier در جدول ۳ آمده است. بر اساس میانه گروه شم زمان ۳۷ روز به عنوان ختم مطالعه گرفته شد و کلیه موش های زنده مانده بعد از این زمان به عنوان سانسور شده تلقی شدند.

نتایج حاصل از روش های اجرایی درمانی در این مرحله نیز نشان داد که مد تابش ترکیبی با زمان تابش دهی ۳۰ دقیقه، نسبت به مد تابش ترکیبی با زمان ۱۵ دقیقه، به طور معنی داری از اثر بخشی بالاتری برخوردار است.

اطلاعات توصیفی و تحلیلی مقایسه بقای حیوان های حامل تومور در گروه های مورد بررسی شامل کنترل، شم، درمان با ۳۰ دقیقه

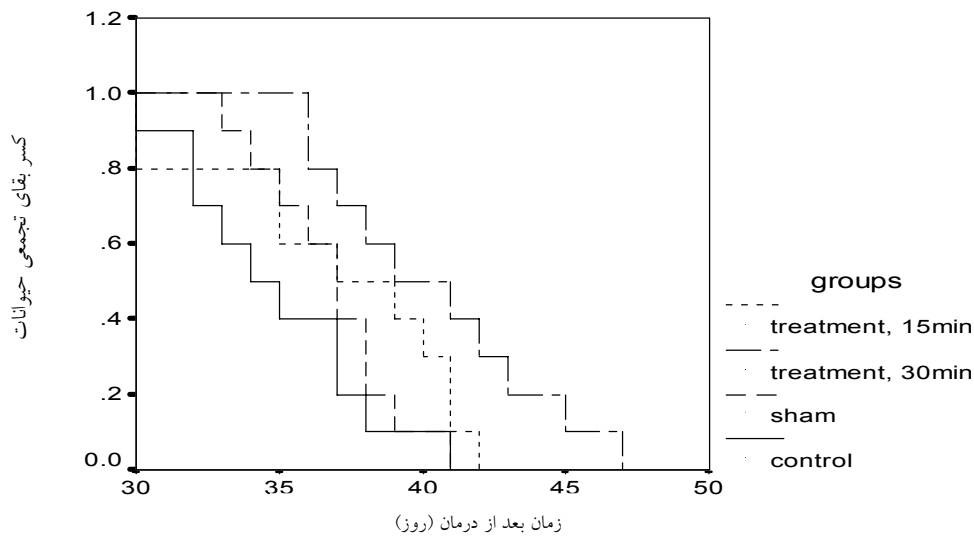
جدول ۳- نتایج آنالیز آماری بقای حیوانات حامل تومور در گروه های مورد بررسی شامل کنترل، شم و گروه های درمانی اکسپوز شده با پروتکل های تابش ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته به مدت ۳۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه

گروه های درمانی	درصد موش های زنده	درصد مرگ	میانگین زمان بقا (روز) ± خطای استاندارد	میانه (روز)	زمان بقا بازه اطمینان ۹۵ درصد (روز)
کنترل	۴۰	۶۰	۳۴/۹ ± ۱/۱	۳۴	۳۲/۸ - ۳۷/۰
شم	۶۰	۴۰	۳۶/۸ ± ۰/۸	۳۷	۳۵/۳ - ۳۸/۳
درمان با ۳۰ دقیقه تابش	۶۰	۴۰	۴۰/۴ ± ۱/۲	۳۹	۳۸/۰ - ۴۲/۸
درمان با ۱۵ دقیقه تابش	۸۰	۲۰	۳۷/۰ ± ۱/۴	۳۸	۳۴/۳ - ۳۹/۷

آمارتی تفاوت در بقای گروه های مورد مطالعه از طریق آزمون Log Rank انجام گرفت. نتایج مبین تمایز معنی دار میان گروه

نتایج جدول نشان می دهد که طول مدت بقا در گروه تحت تابش ۳۰ دقیقه ۱۶ درصد نسبت به کنترل افزایش یافت. تحلیل

درمان با ۳۰ دقیقه تابش با گروه های کنترل ( $P=0/001$ )، گروه شم ( $P=0/031$ ) و گروه درمان با ۱۵ دقیقه تابش ( $P=0/041$ ) است. نمودار مقایسه مربوط به گروه های مورد مطالعه در شکل ۳ آمده است.



شکل ۳- نمودار مقایسه ای مربوط به درصد بقای حیوانات حامل تومور در روزهای مورد بررسی به تفکیک برای گروه های کنترل، شم، درمان با امواج ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با ۳۰ دقیقه تابش و درمان با امواج ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با ۱۵ دقیقه تابش

#### ۴- بحث

برای تولید پدیده حفره سازی اکوستیکی به ویژه نوع ناپایدار، پارامترهای فراصوتی شدت و فشار آکوستیکی بیش از سایر عوامل مؤثرند. سؤال اساسی این است که چگونه می توان با پایین نگه داشتن شدت یا فشار آکوستیکی و یا در ترازهای پایین توان امواج فراصوتی، حفره سازی اکوستیکی به ویژه نوع ناپایدار آن را در محیط تابش ایجاد نمود؟ محققین در حوزه کاربرد های سونوشیمیایی دریافته اند که استفاده از امواج توانی فرکانس پایین در پیشرفت واکنش ها سونوشیمیایی می تواند مؤثر باشد [۴، ۱۴]. از سوی دیگر ترکیب همزمان تابش دهی با دو یا چند فرکانس در محیط های آبی موجب افزایش بهره تولید پدیده حفره سازی اکوستیکی می شود [۱۹].

با توجه به شیب منحنی گروه های مورد بررسی در شکل ۳ ملاحظه می شود که میزان بروز مرگ و میر در گروه درمان با ۳۰ دقیقه به طور معنی داری کمتر از گروه های دیگر است ( $P<0/05$ ). از طرفی مدت بقای حیوان های حامل تومور درمان شده با ۳۰ دقیقه تابش، نسبت به گروه شم نیز نشان می دهد که میانه مدت بقای حیوان ها در این گروه ۳۹ روز است. به بیان دیگر در گروه درمان با ۳۰ دقیقه تابش امواج فراصوتی با پروتکل تابش همزمان ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته، میانه بقای حیوان ها نسبت به گروه کنترل ۵ روز افزایش یافته است. لذا کاربرد این ترکیب تابش دهی در فرآیند درمان تومورها می تواند از ایجاد اثر های پیرترمی جلوگیری نماید. بنابر این در ادامه کار و جهت درمان سونودینامیکی تومورها می توان از مد تابش ترکیبی بهینه با زمان تابش ۳۰ دقیقه استفاده نمود.



بنابراین هیچ گاه خود موج قادر به اندرکنش مستقیم با اجزاء کوچک در ابعاد مولکولی نخواهد بود. لذا ایجاد آسیب در ابعاد مولکولی و سلولی نیازمند فرآیندی است که بتواند انرژی موج فراصوتی را به این ابعاد کوچک منتقل و موجب پارگی غشای سلول ها گردد. به عقیده محققین، این وظیفه بر عهده حفره های آکوستیکی از نوع ناپایدار گذاشته شده است. با وجود موافقان زیاد این فرضیه، برخی معتقدند که نمی توان عامل ایجاد آسیب را تنها به واسطه ی پدیده حفره سازی آکوستیکی دانست، بلکه پدیده های دیگری از جمله جریان های میکرونی با گردان سرعت بالا در اطراف حفره ها، اثر فوران<sup>۳</sup>، نیروی برشی<sup>۴</sup> و بسیاری از پدیده های ناشناخته دیگری نیز می توانند در این فرآیند ایفای نقش نمایند. با این وجود، عامل اصلی درمان در روش درمان دینامیکی با امواج فراصوتی را به اثرات غیر گرمایی و غیر تخریبی آن ها و در رأس آن پدیده حفره سازی آکوستیکی ناپایدار می دانند [۱۵]. در خصوص این که چرا حفره های ناپایدار در سونودینامیک تراپی از اهمیت خاصی برخوردارند، تئوری های فیزیکی مختلفی وجود دارد. یکی از مهم ترین و پر طرفدارترین این تئوری ها، تئوری لکه های داغ است [۶]. این تئوری که در سال ۱۹۱۷ در مباحث ستاره شناسی و در محیط های پلاسمایی مورد توجه فیزیک دانان قرار گرفت، در زمینه حفره های ناپایدار آکوستیکی نیز طرفداران زیادی دارد. طبق این تئوری یک حفره آکوستیکی مانند یک لکه داغ عمل می کند. به این مفهوم که حفره آکوستیکی به محض تشکیل شدن، مقدار زیادی انرژی به شکل پتانسیل در خود ذخیره و محبوس می کند به طوری که در حضور میدان امواج فراصوتی در هر سیکل از تابش امواج، انرژی بیشتری از میدان فراصوتی دریافت می کند. فرآیند رشد حفره به گونه ای است که در هر سیکل اندازه آن افزایش می یابد. اختلاف فشار گازهای داخل و خارج حفره و

نیبورگ<sup>۱</sup> در سال ۱۹۷۷ و ترهار<sup>۲</sup> در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که اتلاف انرژی آکوستیکی و حفره سازی آکوستیکی دو دلیل عمده ایجاد اثرات بیولوژیکی هستند. هنگام عبور امواج فراصوتی از درون بافت ها، اختلاف امپدانس لایه های مختلف بافتی موجب پراکندگی امواج و جذب انرژی آن ها به صورت موضعی از طریق فرآیند های ویسکوزیته عرضی و پدیده آسایش می شود [۲۰]. به عقیده محققین، اثر بیولوژیکی بیشتر به شکل گیری حفره سازی ناپایدار وابسته است که در آن حفره ها بعد از تشکیل شدن در فاز آسایش امواج، بزرگ می شوند و بعد از مدت کوتاهی به شدت منفجر می گردند. حاصل این عمل وقوع پدیده های متعددی است مانند: تولید دما و فشارهای موضعی زیاد، امواج ضربه ای، اثر فواره ای سیال در مرز حفره های نابود شده، تحریک مولکولی و در نتیجه ایجاد اثر سونولومینسانس و ده ها اثر دیگر که همه آنها در تولید رادیکال های آزاد و تخریب سلولی می توانند مؤثر باشند [۱۳].

کنترل دقیق پدیده حفره سازی آکوستیکی در محیط تابش امواج به علت ماهیت این پدیده قدری مشکل به نظر می رسد. زیرا فرآیند تولید این پدیده بهمن وار و همواره میزان تولید آن، حتی در محیط های کنترل پذیر مانند محیط های آبی با عدم قطعیت همراه است [۱۵]. امواج فراصوتی توانی، امواجی هستند با فرکانس کیلوهرتز پایین (۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز) و شدت های بالاتر از ۱۰ وات بر سانتی متر مربع، و امواج غیرتوانی امواجی با فرکانس های بالا (در ناحیه مگاهرتز) و شدت های کمتر از ۳ وات بر سانتی متر مربع هستند.

در واقع نظر به این که ابعاد طول موجی امواج فراصوتی مورد استفاده در درمان، همواره کسری از میلی متر است (در این مطالعه از فرکانس های ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز استفاده شده است)،

<sup>3</sup> Jetting effect

<sup>4</sup> Shearing force

<sup>1</sup> Nyborg

<sup>2</sup> Ter Haar

بررسی های انجام شده توسط ماتسوموتو<sup>۱</sup> و همکارانش نشان می دهد که بیشترین احتمال القاء پدیده حفره سازی با شعاع حفره های بزرگتر، در گستره فرکانسی امواج فرکانس پایین در محیط های آبی وقتی حاصل می شود که موج فرکانس پایین در گستره فرکانسی ۶۰ تا ۱۴۰ کیلوهرتز استفاده شود [۹].

نتایج تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف از جمله یومیتا<sup>۲</sup> و همکارانش در سال های ۲۰۰۰، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ [۲۱-۲۳]، نیز گویای آن است که تابش امواج فراصوت تک فرکانسی (۱/۹۳ مگاهرتز) با شدت های معادل ۵ وات بر سانتی مترمربع و در مد موج ایستا، کمتر از تابش دهی با تکنیک دو فرکانسی با فرکانس های ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز [۱۶] در روند کنترل رشد تومورها مؤثر بوده است. بنابراین، ایده استفاده از موج فرکانس پایین ۱۵۰ کیلوهرتز در این تحقیق در القاء پدیده حفره سازی، حتی در شدت های پایین تر، تقویت می گردد. در این تحقیق مشخص شد که روش اجرایی بهینه تابش دهی از نظر میزان القاء پدیده حفره سازی، در مد ترکیب تابش دهی هم زمان با منابع فراصوت ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز حاصل می شود. اثر افزایش دمای محیط تابش نیز در حداکثر شدت تابش (۵/۳ وات بر سانتی متر مربع) و برای زمان های نسبتاً طولانی تابش از ۱۵ تا ۶۰ دقیقه حاکی از کنترل افزایش دما در محدوده کمتر از آستانه مورد قبول برای ایجاد اثر هایپرترمی است. نتایج بررسی آماری نشان داد که اثر درمانی با ترکیب تابش دهی، تمایز معنی داری در روند کاهش رشد تومورها نشان داد (مقدار p کمتر از ۰/۰۵). از طرفی با پایش دمایی بافت تومورال در طول تابش ترکیبی بهینه در مد پیوسته - پیوسته و مدت زمان تابش ۳۰ دقیقه ملاحظه گردید که میانگین و انحراف معیار دمای بافت تومورال  $0/4 \pm 39/6$  درجه سانتیگراد است که از آستانه دمای

میزان گسترش سطح حفره و همچنین جنس لایه مرزی تشکیل دهنده آن، از جمله عوامل بسیار مهمی هستند که فرآیند نقل و انتقال گاز از محیط به داخل حفره و یا بالعکس را تحت تأثیر قرار می دهند. میزان گاز ورودی به داخل حفره نسبت به خروج از آن در طی آلترنانس های فشار منفی و فشار مثبت از طول موج، طبق پدیده انتشار یک سویه در محیط تابش به گونه ای است، که در هر سیکل تابش امواج، رشد حفره افزایش می یابد. حفره در حال رشد، مانند یک سیستم ترمودینامیکی بی دررو عمل می کند و انرژی کسب شده در هر سیکل افزایش می یابد. رفته رفته حفره به سمت یک سیستم ناپایدار سوق پیدا کرده و در نهایت بعد از رسیدن به یک اندازه بحرانی، ناگهان منفجر می شود و در محل انفجار، دما و فشار بسیار زیادی تولید می شود. این دما از مرتبه ۴۰۰۰ تا ۶۰۰۰ درجه کلوین و فشار ایجاد شده در محل انفجار از مرتبه ۱۰۰۰ اتمسفر برآورد شده است [۶]. این دما و فشار زیاد قادر است، هر نوع مولکول را در محیط اطراف خود دچار تجزیه گرمایی و یا تخریب مکانیکی نماید. چون ابعاد این لکه داغ بسیار موضعی است، بنابراین گرما و فشار واگذار شده از این طریق نیز موضعی خواهد بود. از طرفی آهنگ سرد شدن این لکه داغ از مرتبه  $10^{11}$  کلوین بر ثانیه تخمین زده شده است [۶] به طوری که نهایت امر موجب افزایش دمای محسوسی در محیط تابش نخواهد شد.

در بحث ترکیب تابش دهی با دو منبع فراصوت ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز، با توجه به مبانی نظری آن، نشان داده شد که تابش در مد ترکیبی، موجب افزایش القاء پدیده حفره سازی ناپایدار آکوستیکی می شود. این افزایش به گونه ای است که در انرژی های تابشی یکسان، تولید حفره و کولاپس شدن آن در مد تابش دهی ترکیبی، حدود ۱/۵ برابر بیش از جمع جبری منابع تک فرکانس، آن هم در بیشترین حالت تولید پدیده حفره سازی، انجام می شود. میزان القاء این پدیده در مقایسه با تابش های انفرادی به ۳/۵ برابر افزایش می یابد [۱۶].

<sup>1</sup> Matsumoto

<sup>2</sup> Yumita

### ۵- نتیجه گیری

با وجود مؤثر بودن تکنیک تابش دهی تک فرکانس در القاء پدیده حفره سازی بیشتر [۲۱-۲۳]، نتایج این تحقیق در شرایط تابش دهی بهینه دو فرکانسی، نوید دهنده آن است که در آینده استفاده از تکنیک تابش دهی با دو یا چند فرکانس در دو محدوده فرکانسی امواج فراصوت مگاهرتز و کیلوهرتز بتواند در درمان نمونه های انسانی نیز مؤثر باشد.

### ۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت مالی تحقیق کمال تشکر را دارند.

مورد نیاز برای ایجاد اثر هایپرترمی کم تر است. با این حال نتایج این تحقیق نشان می دهد که روش درمان فراصوتی با بکارگیری امواج فراصوت دو فرکانسی در ناحیه ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز، در فرآیند کند کردن روند رشد تومورها در مدل تومور حیوانی آدنوکارسینوما مؤثر بوده است. زیرا نتایج پارامترهای تأخیر در روند رشد، در تمایز گروه های درمان شده با امواج فراصوت دو فرکانسی ترکیبی بهینه، نسبت به گروه شم، از نظر آماری معنی دار است (مقدار  $p$  کمتر از ۰/۰۵)، به طوری که حتی این اختلاف در روزهای اولیه رشد تومور نیز خود را نشان می دهد.

### منابع

1. Barnett S. Cavitation: Detection and measurement. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: S11-S21.
2. Miller MW, Miller DL, Brayman AA. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasound cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol* 1996; 22: 1131-54.
3. Yu T, Wang Z, Mason TJ. A review of research into the uses of low-level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason Sonochem* 2004; 11: 95-103.
4. Mason TJ, Lorimor J. *Applied Sonochemistry: The uses of power ultrasound in chemistry and processing* 2002; Wiley-VCH: Darmstadt, Germany, 2002, pp. 35-68.
5. Miyoshi N, Sostaric JZ, Riesz P. Correlation between sonochemistry of surfactant solution and human leukemia cell killing by ultrasound and porphyrins. *Free radical Biol Med* 2003; 34:710-19.
6. Suslick KS, McNamara III WB, Didenko Y. Hot spot condition during multi-bubble cavitation in sonochemistry and sonoluminescence, Crum La, Mason TJ, Reisse J. Suslick KS., eds. Kluwer publisher: Dordrecht , Netherland, 1999, pp.191-204.
7. Misik V, Miyshi N, Reisz P. Probbing the temperatures of the hot spot. *J Phys Chem* 1995; 99: 3605-11.
8. Holland CK, Deng CX, Apfel RE, Alderman JL, Fernandez LA, Taylor KJW. Direct evidence of cavitation in vivo from diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1996; 22: 917-925.
9. Matsumoto Y, Allen JS, Yoshizawa S, Kaneko Y. Medical ultrasound with microbubbles. *Experimental Thermal Fluid Sci.* 2005; 29: 255-265.
10. Keyhani K, Guzman HR, Parsons A, Lewis TN, Prausnitz MR. Intracellular drug delivery using low-frequency ultrasound: Quantification of molecular uptake and cell viability. *Pharm Res* 221; 18: 1514-1520.
11. Tang H, Joanne C C J, Blankeshtein D, Langer R. An investigation of the role of cavitation in low frequency ultrasound-mediated transdermal drug delivery. *Pharma Res* 2002; 8: 1160-1169.
12. Carstensen EL, Gracewski S, Dalecki D. The search for cavitation in vivo. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26: 1377-1385.
13. AUIM/NEMA. Standard for real time display of thermal and mechanical acoustic indices on diagnostic ultrasound devices. (Bethesda, MD: American Institute of Ultrasound in Medicine and National Electrical Manufacturers Association Layrel, 1992, pp. 10-17.
14. Mason TJ. *Sonochemistry*. First edi, Great Britain: Oxford University Press; 1999, 35-56.

15. Rosenthal I, Sostaric JZ, Rieze P. Sonodynamic therapy– A review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason Sonochem* 2004; 11: 349-363.
16. Barati A H, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie S Z, Hassan Z. Effect of exposure parameters on cavitation induced by low level dual-frequency ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 2007; 14: 783-9.
17. Teicher B. Tumor model in cancer reseach. Humana Press, New Jersey; 2001.1-19.
18. Barati, A H, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie S Z, Hassan Z. Free hydroxyl radical dosimetry due to 1 MHz low level ultrasound waves. *Iran J Radiat Res*, 2006; 3: 163-9.
19. Feng R, Zhao Y, Zhu C, Mason TJ. Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication. *Ultrason Sonochem* 2002; 9: 231-6.
20. Hill CR, Bamber JC, Ter Haar GR. Physical principles of medical ultrasonics. 2<sup>th</sup> ed, John Wily & Sons, Chichester, England, 2004. Chpter12 and 13. pp. 56-78.
21. Yumita N, Nishigaki R, Umemura SI. Sonodynamically induced antitumor effect of Photofrin II, on colon 26 carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 601-6.
22. Yumita N, Umemura S. Sonodynamic therapy with Photofrin II on AH130 solid tumor. 2003; 51: 174-8.
23. Yumita N, Umemura SI. Ultrasonically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by photofrin II: mechanism of sonodynamic activation. *J Med Ultrasonics* 2004; 31: 35-40.