

مقایسه اثر درمانی تابش هم زمان دو بسامد امواج فراصوت و تابش هر یک از بسامد ها به تنهایی بر مدل حیوانی تومور آدنوکارسینوما پستان

محبوبه علم الهدی^۱، منیژه مختاری دیزجی^{۲*}، امیر هوشنگ براتی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

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

۳- استادیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۲۸

چکیده

مقدمه: تولید حباب های گذرا با اعمال تابش امواج فراصوت بسامد پایین در درمان سرطان مؤثر می باشد. مطالعات انجام شده در محیط های آبی نشان می دهد که میزان حباب های ایجاد شده در تابش دو یا چند بسامد امواج فراصوت، بیش از تابش تک بسامد خواهد بود. لذا در مطالعه حاضر اثر درمانی تابش همزمان امواج فراصوت با بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و بسامد ۱ مگاهرتز در مقایسه با تابش هر یک از بسامد ها به تنهایی در شرایط درون تنی بر تومور حیوانی آدنوکارسینوما پستان مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: موش های حامل تومور آدنوکارسینوما در ۵ گروه شامل گروه های شم، کنترل، درمان با بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته به مدت ۳۰ دقیقه، درمان با بسامد ۱ مگاهرتز پالسی به مدت ۳۰ دقیقه و درمان با تابش همزمان دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی، مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از اعمال پروتکل درمانی، حیوانات حامل تومور به مدت ۳۰ روز تحت بررسی قرار گرفت و پارامترهای تأخیر در روند رشد تومور شامل درصد حجم نسبی، درصد توقف در رشد تومور و زمان رسیدن حجم تومور به دو برابر (T2) و پنج برابر (T5) حجم اولیه استخراج شد.

نتایج: نتایج بررسی درصد حجم نسبی تومور در گروه های مورد مطالعه حاکی از تمایز معنی دار میان گروه های با تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی و نیز تابش همزمان دو بسامد با گروه های شم و کنترل در روزهای سوم تا بیستوچهارم پس از درمان است. درصد مهار شدگی رشد تومور در گروه های اکسپوز شده با دو بسامد به طور معنی داری بیش از گروه های تحت تابش تک بسامد در روزهای سوم، تهم و هجدهم پس از درمان است. مقایسه آماری زمان های رسیدن حجم تومور به دو و پنج برابر حجم اولیه نیز تمایز معنی دار میان گروه های تحت درمان با تابش همزمان دو بسامد را نسبت به گروه های درمان تحت تابش تک بسامد (۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز به تنهایی) نشان می دهد. میانگین طول مدت بقا در گروه های تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیبی ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز ۸۵ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد.

نتیجه گیری: اعمال تابش همزمان دو بسامد در مقایسه با تابش تک بسامد در کنترل روند رشد تومور آدنوکارسینوما پستان، مؤثر است. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۷، شماره ۴، پیاپی (۲۹)، زمستان ۸۹، ۴۷-۵۹)

واژگان کلیدی: امواج فراصوت، سطح انرژی کم، حفره سازی گذرا، تابش دو بسامد، آدنوکارسینوما پستان

* نویسنده مسؤول: منیژه مختاری دیزجی

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت

مدرس تهران، تهران، ایران

mokhtarm@modares.ac.ir

تلفن: ۸۲۸۸۳۸۹۳ (۲۱) ۰۹۸+

۱- مقدمه

امروزه روش های کلینیکی بسیاری برای درمان سرطان به کار گرفته می شود. اغلب روش های درمانی، به دلیل هدفمند نبودن در ناحیه تومور و ایجاد آثار جانبی در بافت های سالم، ایده آل نمی باشند. محققان همواره به دنبال یافتن روشی مناسب برای درمان سرطان هستند که علاوه بر تمرکز در ناحیه تومور، حداقل آسیب را در بافت های سالم ایجاد کند [۱-۳]. اخیراً استفاده از امواج فراصوت برای کاربردهای درمانی مطرح شده است. درمان با امواج فراصوت، یک روش غیر تهاجمی بوده و به دلیل امکان قانونی کردن موج به ناحیه هدف و نیز شدت پایین آن طی دهه های اخیر مورد توجه قرار گرفته است [۴-۶]. در کاربرد درمانی امواج فراصوت، دو مکانیسم گرمایی و غیر گرمایی مورد نظر است. هدف از مطالعه حاضر برخورد غیر گرمایی امواج فراصوت با بافت و ایجاد تغییرات بیولوژیکی است. امروزه تحقیقات اندکی پیرامون آثار غیر گرمایی امواج فراصوت بر بافت، که اغلب به شکل حفره سازی و تولید حباب می باشد، در حال انجام است [۷، ۸]. در حفره سازی گذرا، که غالباً در بسامد های پایین رخ می دهد؛ حباب های با عمر کوتاه ایجاد می شود که تحت تأثیر تنها چند سیکل امواج فراصوت، حجم آن ها به شدت تغییر می کند و با رمبش آن ها؛ در مدت نسبتاً کوتاهی نابود می شوند. انرژی متمرکز در حباب های گذرا پس از رمبش کامل آن ها، در محیط تابش آزاد شده و دما و فشار بالایی تولید می کنند. محققین مقدار این دما و فشار را در محدوده ۵۰۰۰ کلوین و ۱۰۰۰ اتمسفر برآورد نموده اند. افزایش فشار و درجه حرارت، موجب تولید رادیکال های آزاد توسط فرآیند هیدرولیز خواهد شد. از طرف دیگر در حفره سازی غیر اینرسی (حفره سازی پایدار) نیز؛ شعاع حباب های موجود در مایع؛ تحت دامنه فشار میدان های اکوستیکی خارجی؛ افزایش و کاهش می یابد [۹-۱۵].

مطالعات اخیر نشان می دهد که ترکیب همزمان تابش دهی با دو یا چند بسامد در محیط های آبی، موجب افزایش

بازده تولید پدیده حفره سازی اکوستیکی و افزایش شدت لومینسانس در مقایسه با به کارگیری هر یک از بسامد ها به تنهایی می شود [۱۶]. براتی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با استفاده از روش دزیمتری شیمیایی نشان دادند در انرژی های یکسان، ترکیب مد تابش دهی با دو بسامد نسبت به تابش تک بسامد در تولید حفره های ناپایدار تأثیر بسزایی دارد (۱/۵ برابر) [۹]. نتایج آزمایش های به دست آمده از مطالعات سونوشیمیایی نیز مشخص می کند که فراوانی حباب های ایجاد شده در تابش چند بسامد امواج فراصوتی، بسیار بیشتر از تابش تک بسامد خواهد بود. چنانچه در مطالعات گسترده پیرامون شدت سونولومینسانس ایجاد شده در به کارگیری همزمان دو بسامد در محدوده های متفاوت کیلوهرتز و مگاهرتز نشان داده شد که شدت لومینسانس حاصل از ترکیب بسامدی در مقایسه با تابش تک بسامد، بیشتر است [۱۷-۲۱].

در مطالعه ای دیگر، ایرنتی و همکارانش [۲۲] با اندازه گیری شدت نور حاصل از پدیده سونولومینسانس و نیز شدت ساب هارمونیک ها در کاربرد همزمان دو بسامد بالا ۷۰۰ کیلوهرتز و پایین ۲۰ کیلوهرتز امواج فراصوت نشان دادند به کارگیری همزمان دو بسامد بالا و پایین، موجب تشدید حفره سازی می شود.

در کاربرد همزمان بسامد های مختلف در محدوده های کیلوهرتز و مگاهرتز، به نظر می رسد بسامد های در محدوده پایین کیلوهرتز در تولید حباب های گذرا مؤثر بوده و بسامد های محدوده مگاهرتز، به عنوان عامل ایجاد اغتشاش در محیط وارد می شود و احتمال رمبش حباب ها را افزایش می دهد. به طور کلی پارامترهای مختلفی مانند فشار اکوستیکی، دما، فشار محیط، ویسکوزیته محیط، ظرفیت گرمایی ویژه گازهای درون حباب، نیروی کشش سطحی و بسامد امواج تابشی در شکل گیری و نابودی حباب ها در محیط مؤثر می باشند. مطالعات انجام شده نشان می دهد ترکیب دو یا چند بسامد در مقایسه با تابش تک بسامد در محیط های آبی برای تولید حفره سازی گذرا

مکعب از تومور به روش کاشت، در زیر پوست موش های گیرنده (در ناحیه راست شکم) و در شرایط بیهوشی پیوند شد. حیوانات با مقدار ۳۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان با مواد بیهوش کننده کتامین و زایلین به نسبت ۱/۵ تا ۲ برابر به وسیله سرنگ های مخصوص انسولین، بیهوش شدند. برای بستن پوست ناحیه برش، از کلیپس های جراحی استفاده گردید. برآورد حجم اولیه تومور، با اندازه گیری قطر بزرگ (b)، قطر کوچک (a) و ضخامت تومور (c) به وسیله کولیس دیجیتالی (Canon, Ks-43, Germany, ±1mm) مطابق با رابطه زیر حاصل شد [۲۴]:

$$V_0 = \frac{1}{2} a_0 \times b_0 \times c_0 \quad (1)$$

غالبا پس از گذشت ۲-۳ هفته از پیوند تومور، زمانی که قطر تومور به ۸-۱۰ میلیمتر رسید، حیوان جهت انجام پروتکل درمانی آماده است.

- تجهیزات و سیستم تابش فراصوتی: در مطالعه حاضر، دو سیستم فراصوت درمانی مورد استفاده قرار گرفت. سیستم اول شامل دستگاه فراصوت Sonopuls462 (Netherland) تأمین کننده امواج فراصوت ۱ مگاهرتز با ترانسدیوسر PZT و سطح مقطع مؤثر تابش ۵ سانتی متر مربع و قطر هندسی ۳۰ میلی متر فعال در مدهای پیوسته و پالسی است. کالیبراسیون شدت و توان دستگاه، در آب دیونیزه و با استفاده از توان سنج (UPM-DT-10 model, Netech Co, USA) انجام شده است. در مطالعه حاضر تابش مد پالسی با سیکل کاری ۸۰ درصد [۹ و ۲۳] به دلیل عدم ایجاد آثار گرمایی و تاثیر بیشتر در کولاس حفره سازی اکوستیکی انتخاب گردید.

سیستم دوم، دستگاه فراصوت مدل SM3678B (SM3678B, Shrewsbury Medical Co., UK) در محدوده بسامدی ۱۵۰ کیلوهرتز با ترانسدیوسر PZT با قطر هندسی ۳۰ میلی متر و سطح مقطع مؤثر تابش ۵

از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۹ و ۱۵-۱۷]. از آنجا که حفره سازی گذرا اغلب عامل ایجاد واکنش های سونوشیمیایی ناشی از تابش امواج فراصوت می باشد و با توجه به اینکه در اغلب تحقیقات انجام شده مقایسه تابش ترکیب چند بسامد و تابش تک بسامد به تنهایی در میزان تولید حفره سازی در محیط آبی بدون در نظر گرفتن تأثیر عوامل محیط تحت تابش از جمله فشار؛ ویسکوزیته محیط و... در بافت هدف انجام شده است. در مطالعه قبلی محققین حاضر [۲۳] تابش همزمان امواج فراصوت با دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز پیوسته-پیوسته با زمان های تابش ۱۵ و ۳۰ دقیقه و نیز ۳۰ دقیقه تابش همزمان دو بسامد پیوسته-پالسی تومور آدنوکارسینوما در شرایط in vivo مقایسه شد نتایج این مطالعه نشان داد که تابش همزمان ۱ مگاهرتز پالسی ۸۰٪ و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته بهتر می تواند روند افزایش رشد تومور را کنترل کند. در این مطالعات انتخاب تابش همزمان دو بسامد به دلیل افزایش حفره سازی در محیط آبی بوده است [۹]. اما این که آیا تابش دو بسامد در محیط درون تینیز می تواند نسبت به تابش تک بسامد اثر هم افزایی داشته باشد؛ هنوز مورد سوال است. لذا در این مطالعه اثر درمانی تابش همزمان امواج فراصوت با بسامد پایین ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و بسامد بالای ۱ مگاهرتز پالسی ۸۰٪ در مقایسه با تابش هر یک از بسامد ها به تنهایی در شرایط in vivo بر تومور حیوانی آدنوکارسینوما پستان مورد ارزیابی و بررسی قرار می گیرد.

۲- مواد و روشها

الف) تومور: موش های مدل Balb/C ماده هم خون از مؤسسه پاستور خریداری شدند. بافت تومور آدنوکارسینوما پستان برای پیوند به موش های Balb/C ماده هم خون، از یک تومور پستان خود به خود که در یک موش Balb/C از همان جنس و نژاد؛ با عمر تقریبی ۶-۸ هفته ایجاد شده بود، برداشت گردید و حدود ۲ میلیمتر

- اجرای پروتکل درمانی: به طور کلی، حیوانات حامل تومور به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند: (A): گروه کنترل، (B): گروه شم، (C): گروه درمان با تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتز پالسی با سیکل کاری ۸۰ درصد با زمان تابش ۳۰ دقیقه، (D): گروه درمان با تابش امواج فراصوت پیوسته ۱۵۰ کیلوهرتز با زمان تابش ۳۰ دقیقه و گروه (E): گروه درمان با تابش همزمان امواج فراصوت ۱ مگاهرتز پالسی با سیکل کاری ۸۰ درصد همراه با تابش ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با زمان تابش همزمان ۳۰ دقیقه. در مطالعه حاضر تومور آدنوکارسینوما به حدود ۷۵ حیوان القا شد که در نهایت با احتساب کاشت موفق و مرگ و میر؛ ۳۵ حیوان وارد مطالعه شدند. پس از انجام عمل زدودن پوست ناحیه تومور و بیهوشی؛ حیوان ها جهت انجام پروتکل تابش دهی آماده شدند (شکل ۱).

سانتی متر مربع امکان تولید مدهای پیوسته و پالسی را فراهم می کند. برای کالیبراسیون شدت و توان اکوستیکی دستگاه فوق، از ترازوی اندازه گیری نیروی تابش (Shrewsbury Medical Co., UK) در آب دیونیزه، استفاده شده است. شدت نرمالایز شده در مقیاس متوسط فضایی - متوسط زمانی (ISATA) سیستم فراصوتی ۱ مگاهرتز برابر با ۲ وات بر سانتی متر مربع و سیستم فراصوتی ۱۵۰ کیلوهرتز برابر با ۰/۲ وات بر سانتی مترمربع برآورد شد. برای تبدیل میزان شدت در میدان آزاد به مقدار *in situ* [۲۵] ضریب *derating* در نظر گرفته شد. این ضرائب، در سیستم فراصوت درمانی با بسامد ۱ مگاهرتز، عدد ۰/۹۹۷۲ و برای سیستم فراصوت درمانی با بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز به دلیل ناچیز بودن میزان تضعیف در فاصله ۱ سانتی متر از سطح پروب، عدد ۱ در نظر گرفته می شود.

شکل ۱. سامانه تابش دهی. محل قرارگیری پروب ها و موقعیت حیوان نمایش داده شده است.

ادامه برای کنترل دمایی ناحیه تومور و محیط اطراف (شرایط زیر حد هایپرترمی)، از ترموکوپل دیجیتالی دو کاناله (CHY, 502A, LUTRON, Taiwan) استفاده شد. پس از کالیبراسیون ترموکوپل، برای اطمینان از تابش در زیر حد هایپرترمی، در طول تابش دهی تغییرات دمایی محیط تابش و تومور در هر دقیقه به وسیله ترمومتر متصل به رایانه شخصی توسط پورت RS232، ثبت گردید. قابل ذکر است میکروترموکوپل ها دارای ابعاد ۰/۱ میلیمتر می

برای اجرای پروتکل تابش دهی، محفظه ای از جنس مواد پلی اکریلیک با ابعاد ۳۰×۲۵×۲۵ سانتی متر مکعب در نظر گرفته شد. درون محفظه از آب دیونیزه پر می شود (با دمای ۳۳-۳۵ درجه سانتیگراد) و برای حلالیت چربی احتمالی موجود در محفظه و یکنواختی مایع اندکی مایع شوینده به آب اضافه شد. برای جلوگیری از انعکاس امواج فراصوت از وجوه مقابل سطح تابش پروب، دیواره های داخلی محفظه از مواد جاذب صوت پوشانده شدند. در

که در این رابطه V و V_0 حجم تومور به ترتیب در روز های پس از تابش و حجم اولیه تومور می باشد. در ارزیابی تأخیر در روند رشد تومور؛ پارامترهای T_2 ؛ T_5 و نیز درصد توقف در رشد تومور محاسبه شد [۲۵]. پارامترهای T_2 و T_5 معادل زمانی هستند که حجم تومور به دو و پنج برابر حجم اولیه خواهد رسید. پارامتر درصد توقف در رشد تومور (IR: Inhibition ratio)؛ میزان موفقیت پروتکل درمانی مورد نظر در روند کاهش رشد تومورها در روزهای متوالی پس از درمان را نسبت به گروه کنترل مطابق رابطه زیر نشان می دهد [۲۵]:

$$IR = \frac{V_{treated} - V_{control}}{V_{control}} \times 100 \quad (3)$$

که در این رابطه حجم $V_{treated}$ ، نشان دهنده حجم نرمالیزه شده تومور مورد نظر در گروه دلخواه و در روز دلخواه پس از درمان است و حجم $V_{control}$ ، حجم نرمالیزه شده تومور در همان روز در گروه کنترل است. قابل ذکر است حجم نرمالایز شده تومور در هر گروه، از تقسیم اندازه حجم تومور هر حیوان در روزهای ۰-۳۰ پس از اعمال پروتکل درمانی بر اندازه حجم همان تومور در روز صفرم در همان گروه، به دست آمد. پس از بررسی حجم تومور در ۳۰ روز اول؛ بقای حیوان تا رسیدن به فاز مرگ بررسی و ثبت گردید.

نتایج با استفاده از آمار توصیفی آنالیز شد و تعداد حیوان های حامل تومور بر اساس پارامترهای T_2 ؛ T_5 و زمان بقا؛ در هر گروه با سطح اطمینان ۹۵ درصد و توان آزمون ۸۵ درصد، ۵ نمونه در هر گروه برآورد شد. با ارزیابی توزیع نمونه ها از آزمون برازندگی کولموگراف- اسمیرنوف (K-S test) توسط نرم افزار آماری (SPSS V.15 SPSS/PC Inc., Chicago, IL)، میانگین و انحراف معیار پارامترهای مختلف تأخیر روند رشد تومور حاصل شد. تمایز بین گروهی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و زوج تی بررسی شد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). مقایسه بقای حیوانات حامل تومور در

باشند و به صورت جداگانه یکی در محل تومور حیوان و دیگری با فاصله از تومور و به صورت تقریبی در محل تقاطع دو وجه عمودی مقابل محل قرارگیری پروب ها، درون آب قرار داده شدند. در دیواره های محفظه تابش دهی پروب های هر دو سیستم امواج فراصوت درمانی، در دو وجه عمود برهم محفظه، تعبیه شدند به گونه ای که محور تابش هریک از سطوح پروب ها بر دیگری عمود خواهد بود. حیوان حامل تومور در قفس ویژه ای که به منظور نگه داشتن حیوان در محیط آبی و در حالت بیهوشی طراحی شده بود، قرار گرفت. محل تومور حیوان در محل تقاطع محور تابش پروب ها و به فاصله ۱ سانتی متر از سطح هر یک از پروب ها (میدان نزدیک تابش) قرار گرفت. با توجه به محدودیت زمان تابش (شرایط زیر آثار بیولوژیکی هایپرترمی)، مدت زمان بهینه تابش در هر گروه ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد [۹]. در گروه (A) حیوان حامل تومور در شرایط بدون تابش دهی و در محیط آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند. گروه (B)، مانند گروه های تحت درمان بیهوش شده و به مدت ۳۰ دقیقه در همان شرایط بدون تابش دهی قرار داده شدند.

- پارامترهای سنجش تومور و آنالیز آماری: پس از درمان، اثر تابش امواج فراصوت با ارزیابی پارامترهای محاسبه میزان تأخیر در روند رشد تومور، هر سه روز یک بار [۲۴] به مدت ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبه پارامترهای مورد نظر، اقطار بزرگ، کوچک و ضخامت تومور (a, b و c) اندازه گیری شد و متوسط حجم تومور در گروه های مختلف (رابطه ۱) محاسبه گردید. برای کاهش خطا؛ اندازه گیری اقطار سه بار انجام شد و میانگین گزارش گردید (خطای زیر ۵ درصد مورد قبول است). با استفاده از حجم تومور در روزهای مورد بررسی؛ تغییر نسبی حجم تومور (R_V) از رابطه زیر به دست آمد:

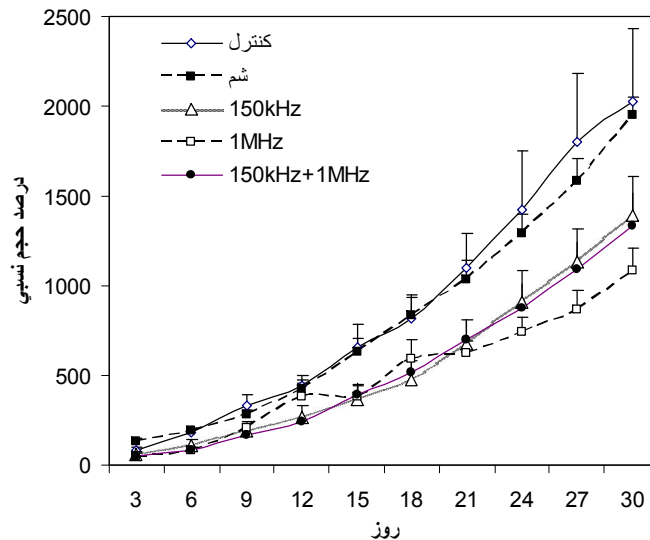
$$R_V = \frac{V - V_0}{V_0} \times 100 \quad (2)$$

گروه های مورد بررسی توسط آنالیز آماری Kaplan-Meier انجام گرفت.

۳- نتایج

نتایج افزایش حجم نسبی تومور در شرایط تابش امواج فراصوت با بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته با شدت ۰/۲ وات بر

سانتیمتر مربع و به مدت ۳۰ دقیقه به همراه تابش امواج فراصوت پالسی با سیکل کاری ۸۰ درصد با بسامد ۱ مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتیمتر مربع به مدت ۳۰ دقیقه همزمان و به صورت انفرادی، همراه با گروه های کنترل و شم در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. میانگین و انحراف معیار روند درصد افزایش حجم نسبی تومور در روزهای صفر تا ۳۰ روز پس از درمان در گروه های کنترل؛ شم؛ تابش ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته؛ تابش ۱ مگاهرتز پالسی و تابش همزمان ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی

همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می شود شیب رشد تغییرات نسبی حجم تومور پس از ۳۰ روز اندازه گیری در گروه های تحت تابش ترکیب امواج فراصوتی؛ ۱ مگاهرتز تنها و ۱۵۰ کیلوهرتز نسبت به گروه های کنترل و شم به ترتیب ۳۴؛ ۸۶ و ۳۱ درصد کاهش یافته است. بررسی درصد حجم نسبی تومور در گروه های تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و تک بسامد ۱ مگاهرتز پالسی و تابش همزمان نشان می دهد که در روزهای اولیه از شروع درمان تفاوت معناداری از نظر آماری با گروه های شم و کنترل مشاهده شد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). اما میان تابش تک بسامد ها و تابش همزمان دو بسامد در هیچ یک از روزهای مورد بررسی تفاوت معنادار دیده نشد (عدد p بیش از ۰/۰۵). بررسی ضریب پراکندگی درصد حجم نسبی تومور؛ حاکی از سطح پراکندگی کم تر گروه تحت تابش با ترکیب بسامدی (۱/۱۷) نسبت به گروه های با تابش های تک بسامده ۱۵۰ کیلوهرتز (۰/۲۴)؛ ۱ مگاهرتز (۰/۱۸) و کنترل (۰/۱۸) است. میانگین و انحراف معیار زمان رسیدن حجم تومور به دو و پنج برابر حجم اولیه آن در نمودار شکل ۳ نمایش داده شده است. مقایسه آماری زمان های T2 و T5 نشان می دهد میان گروه کنترل و گروه شم تمایز معنی داری وجود ندارد (عدد p بیش از ۰/۰۵) اما میان گروه کنترل با گروه های تحت تابش بسامد ۱ مگاهرتز و گروه تحت تابش بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و نیز گروه تحت تابش ترکیب دو بسامد تمایز معنی داری مشاهده شد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). بررسی زمان T5 نیز نشان می دهد که گروه تحت درمان با تابش همزمان دو بسامد با بقیه گروه ها شامل درمان تحت تابش تک بسامد (۱

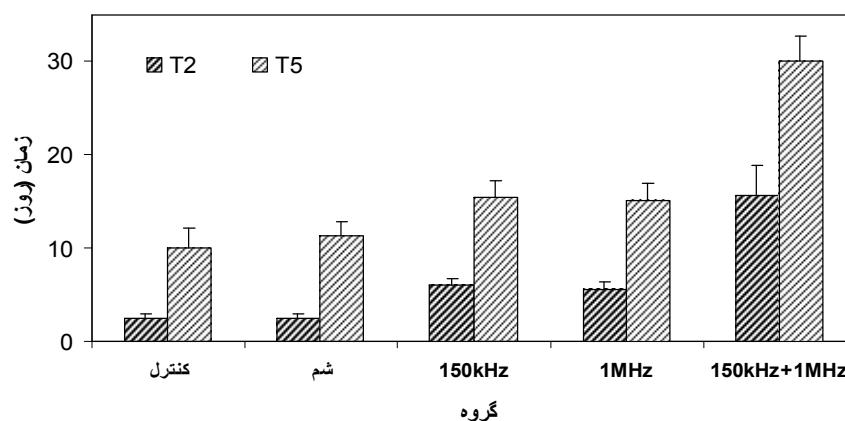
همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می شود شیب رشد تغییرات نسبی حجم تومور پس از ۳۰ روز اندازه گیری در گروه های تحت تابش ترکیب امواج فراصوتی؛ ۱ مگاهرتز تنها و ۱۵۰ کیلوهرتز نسبت به گروه های کنترل و شم به ترتیب ۳۴؛ ۸۶ و ۳۱ درصد کاهش یافته است. بررسی درصد حجم نسبی تومور در گروه های تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و تک بسامد ۱ مگاهرتز پالسی و تابش همزمان نشان می دهد که در روزهای اولیه از شروع درمان تفاوت معناداری از نظر آماری با گروه های شم و کنترل مشاهده شد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). اما میان تابش تک بسامد ها و تابش همزمان دو بسامد در هیچ یک از روزهای مورد بررسی تفاوت معنادار دیده نشد (عدد p بیش از ۰/۰۵). بررسی ضریب پراکندگی درصد حجم نسبی تومور؛ حاکی از

کیلوهرتز تنها؛ شم و کنترل به ترتیب به میزان ۲؛ ۳ و ۳ برابر، افزایش یافته است.

نتایج بررسی درصد توقف رشد تومور (درصد کاهش نسبی رشد تومور نسبت به گروه کنترل) در گروه های درمانی قرار گرفته تحت تابش بسامد ۱ مگاهرتز پالسی، ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و تابش همزمان دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی در روزهای مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- میانگین درصد توقف رشد تومورها در گروه های درمانی تحت تابش با پروتکل های تابش تکی ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته؛ ۱ مگاهرتز پالسی و تابش ترکیبی به مدت ۳۰ دقیقه نسبت به گروه کنترل در روز های پس از تابش دهی. منظور از اعداد منفی درصد افزایش رشد تومور نسبت به گروه کنترل است.

روز پس از تابش	۱۵۰ کیلوهرتز	۱ مگاهرتز	۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز
۳	۳/۸۳	۳۰/۰۵	۳۲/۶۱
۶	۱۲/۵۷	۳۷/۸۰	۴۱/۹۵
۹	۷/۷۵	۲۰/۵۳	۳۸/۲۷
۱۲	۱۱/۶۱	۱۳/۷۵	۳۷/۴۵
۱۵	۹/۳۸	۱۴/۸۸	۳۰/۱۸
۱۸	۶/۱۷	۸/۱۶	۲۵/۰۵
۲۱	-۳/۳۳	۹/۳۰	۲۳/۶۰
۲۴	۱/۶۱	۱۱/۵۱	۱۹/۸۸
۲۷	-۷/۷۳	۸/۵۶	۱۳/۱۶
۳۰	-۱۵/۹۸	-۹/۵۹	۶/۷۸



شکل ۳- میانگین و انحراف معیار زمان های رسیدن حجم تومور به دو (T2) و پنج برابر حجم اولیه (T5) در گروه های مورد بررسی شامل کنترل؛ شم؛ تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها؛ ۱ مگاهرتز تنها و تابش ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز

حاصل از روش های درمان در این مرحله نیز نشان داد که مد تابش ترکیبی با زمان تابش دهی ۳۰ دقیقه، نسبت به مد تابش تک بسامد به طور معنی داری از اثر بخشی بالاتری برخوردار است (عدد p کم تر از ۰/۰۵). چنانچه درصد مهارشدگی

مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز؛ گروه های شم و کنترل تمایز معنی داری وجود دارد (عدد p کم تر از ۰/۰۵).

در گروه درمان ترکیبی با ۳۰ دقیقه تابش؛ زمان های مورد نیاز برای رسیدن حجم تومور به اندازه ۲ برابر حجم اولیه نسبت به گروه های ۱ مگاهرتز تنها، ۱۵۰ کیلوهرتز تنها؛ شم و کنترل به ترتیب ۳؛ ۳؛ ۶ و ۷ برابر افزایش یافته است. همچنین زمان رسیدن حجم تومور به ۵ برابر حجم اولیه در گروه تابش همزمان دو بسامد نسبت به گروه های ۱ مگاهرتز تنها، ۱۵۰

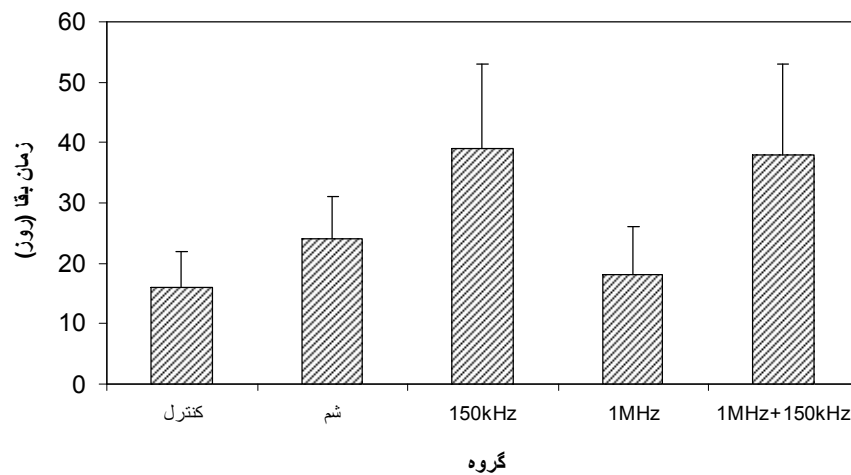
میانگین درصد توقف رشد تومورها در گروه های درمانی تحت تابش با پروتکل های تابش تکی ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته؛ ۱ مگاهرتز پالسی و تابش ترکیبی به مدت ۳۰ دقیقه نسبت به گروه کنترل در روز های پس از تابش دهی. منظور از اعداد منفی درصد افزایش رشد تومور نسبت به گروه کنترل است.

پس از اعمال پروتکل درمانی؛ نسبت درصد مهارشدگی رشد تومور در گروه تابش ترکیبی امواج ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز افزایش معناداری در مقایسه با گروه تابش تک بسامد تمایز معنی داری نشان نداد (عدد p بیشتر از ۰/۰۵). نتایج

آنالیز واریانس یک طرفه؛ تمایز معنی دار میان گروه ها را نشان داد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). هر چند آزمون آماری زوج تی حاکی از عدم تمایز معنی دار میان گروه تحت تابش ۱ مگاهرتز تنها با گروه های کنترل و شم بود (عدد p بیشتر از ۰/۰۵) و تمایز بسیار خوبی میان دو گروه تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیبی با گروه های شم و کنترل برآورد شد (عدد p کم تر از ۰/۰۵). هر چند زمان بقای حیوانات بین دو گروه تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیب دو بسامد تفاوت معنی داری نداشت (عدد p بیشتر از ۰/۰۵).

رشد تومور در گروه با تابش ترکیب دو بسامد همواره روند کاهشی در مقایسه با پروتوکل های تابش تک بسامد را نشان می دهد. به طوری که در انتهای روز ۳۰ام؛ ۷ درصد کاهش رشد تومور نسبت به گروه های تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز با ۱۶ درصد افزایش رشد تومور و ۱ مگاهرتز با حدود ۱۰ درصد افزایش تومور نسبت به گروه کنترل در روز مشابه؛ ملاحظه می شود.

نمودار مقایسه مربوط به بقای حیوانات تحت آزمایش بر حسب روز، در شکل ۴ رسم شده است. بررسی آماری با



شکل ۴- میانگین و انحراف معیار زمان بقای حیوان حامل تومور در گروه های مورد بررسی شامل کنترل؛ شم؛ تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها؛ ۱ مگاهرتز تنها و تابش ترکیبی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز

جدول ۲- نتایج آنالیز آماری بقای حیوانات حامل تومور در گروه های مورد بررسی شامل کنترل، شم و گروه های درمانی تحت تابش با پروتکل های تابش تکی ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی و تابش ترکیبی ۱ مگاهرتز پالسی و ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته

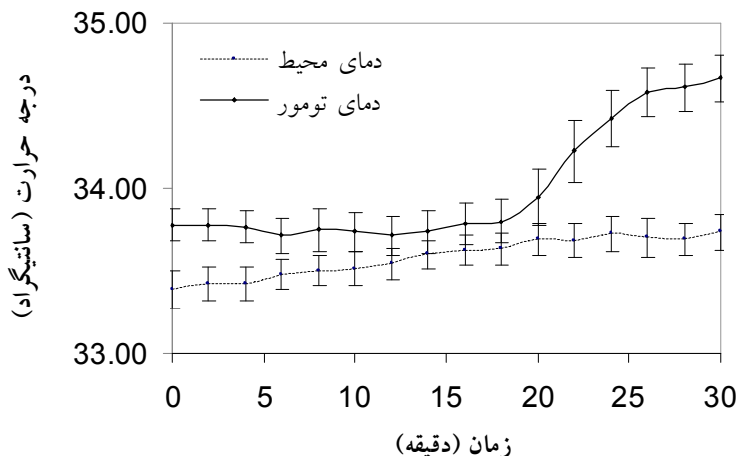
گروه های درمانی	درصد	میانگین زمان بقا (روز) ± انحراف معیار	زمان بقا (روز)
کنترل	۴۰	۲۱ ± ۷	۱۲-۲۹
شم	۴۰	۲۴ ± ۷	۱۵-۳۳
تابش ۱۵۰ کیلوهرتز	۸۳	۳۹ ± ۱۴	۲۱-۵۷
تابش ۱ مگاهرتز	۲۵	۱۸ ± ۸	۶-۳۱
تابش ترکیب دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز	۷۵	۳۸ ± ۱۵	۱۴-۶۲

اطلاعات توصیفی و تحلیلی مقایسه بقای حیوان های حامل تومور بر اساس میانگین گروه های کنترل و شم با روش آماری Kaplan-Meier در جدول ۲ آمده است.

نتایج جدول نشان می دهد که طول مدت بقا در گروه های تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیبی ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز ۸۵ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد. تحلیل آماری تفاوت در بقای گروه های مورد مطالعه از طریق آزمون Log Rank انجام گرفت. نتایج مبین تمایز معنی دار میان گروه تحت درمان با تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیبی با دو بسامد با سه گروه دیگر مورد بررسی است (عدد p کم تر از ۰/۰۵).

زیر حد هایپرمی و کمتر از ۴۲ درجه سانتی گراد است (شکل ۵). هر نقطه حاصل میانگین و انحراف معیار اندازه گیری ۱۰ تومور از ۱۰ حیوان مورد بررسی است (شکل ۵). پایش دمایی از آن جهت اهمیت دارد که اثر هایپرترمی نقشی در فرآیند مرگ سلولی را ندارد.

برای اطمینان از مکانیسم غیرحرارتی تابش امواج فراصوتی بر تومورها؛ پایش دمایی در محل تومور و محیط اطراف حیوان در طول تابش دهی انجام شد. نتایج بررسی دمای تومورها در طول زمان تابش دهی نشان داد که حداکثر دمایی حاصل با تابش مد ترکیبی هم زمان پالسی ۱ مگاهرتز و ۱۵۰ کیلوهرتز،



شکل ۵- پایش دمایی تومورها و محیط اطراف آن در مدت زمان ۳۰ دقیقه تابش همزمان دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی

شرایط آبی را در شرایط مشابه *in vivo* به کار گرفت. در تحقیق انجام شده توسط براتی و همکارانش نشان داده شد به کارگیری هر دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز به صورت همزمان در مقایسه با استفاده از دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز به تنهایی در محیط آبی، به شکل مؤثرتر منجر به تقویت واکنش های سونوشیمیایی در محیط خواهد شد [۹]. به عقیده محققین شکل گیری حباب های ناپایدار و کنترل دقیق پدیده حفره سازی اکوستیکی در محیط، به علت ماهیت این پدیده؛ قدری مشکل به نظر می رسد. ترهار و همکارانش در سال ۱۹۸۱ نشان دادند تحت تابش امواج فراصوت در شرایط درون تنی، اتلاف انرژی اکوستیکی و حفره سازی دو عامل ایجاد آثار بیولوژیک می باشند [۳]. با توجه به بزرگ بودن ابعاد طول موجی؛ امواج فراصوت، قادر به برخورد مستقیم با غشا سلول و از بین بردن سلول نمی باشد. لذا محققان عامل درمان در به کارگیری درمان دینامیکی با امواج فراصوت را پدیده حباب سازی و پدیده های دخیل در تولید حباب می دانند. بر اساس مطالعات انجام شده پس از شکل

۴- بحث

در تولید پدیده حفره سازی گذرا، آنچه مسلم است ترکیب همزمان دو یا چند بسامد در مقایسه با تابش تک بسامد، در محیط های آبی موجب افزایش بهره تولید خواهد شد [۹]. محققین، آثار بیولوژیکی ناشی از تابش امواج فراصوت در سطوح پایین شدت و بسامد را به حباب های تولید شده در محیط تحت تابش نسبت می دهند. با توجه به اینکه تابش امواج فراصوت در بسامد های پایین منجر به تولید حباب خواهد شد؛ با به کارگیری بسامد های بالا، نوسان شعاع حباب های موجود در محیط (کوچک و بزرگ شدن شعاع) بیشتر شده و به دنبال آن عامل نابودی و رمبش حباب افزایش می یابد. نظر به این که در محیط های آبی و آزمایشگاهی؛ ترکیب همزمان تابش دهی با دو یا چند بسامد منجر به افزایش تولید حباب خواهد شد، سؤالی که در اینجا مطرح می شود این است که با توجه به درصد بالای آب موجود در بدن موجودات زنده، آیا می توان نتایج به دست آمده در

گیری حباب ها در فاز آسایش، حباب رشد کرده و بزرگ می شود و پس از اندک زمانی دچار رمبش شده و فشار و درجه حرارت بالایی تولید می کند. رمبش حباب علاوه بر ایجاد دما و فشار بالا منجر به امواج ضربه ای، تحریک مولکولی و در نتیجه اثر لومینسانس و ده ها اثر دیگر خواهد شد که در تخریب سلول و تولید رادیکال های آزاد می توانند مؤثر باشند [۱۴]. در واقع می توان گفت، رفتار یک حباب در یک میدان تابش امواج فراصوتی شبیه یک نوسانگر فیزیکی است که در بسامد خاصی نوسان می کند. بسامد پایه نوسان حباب تابعی از بسامد موج تابشی، ابعاد حباب و خصوصیات محیط در برگیرنده آن است. حال اگر تنها از یک موج فراصوتی با بسامد مشخص استفاده شود، حباب در حال نوسان با بسامد پایه خود به نوسان ادامه می دهد و یا تا مدت نسبتاً طولانی می تواند به حرکت نوسانی خود ادامه دهد. در این حالت عمل حفره سازی بیشتر از نوع پایدار آن خواهد بود. اما اگر به صورت همزمان از دو یا چند بسامد استفاده شود؛ حباب سازی بیشتر و عامل نابودی آن ها نیز فراهم می گردد [۱۵-۱۷]. در به کارگیری دو بسامد، موضوع مهم آرایش بسامدی و اختلاف آن ها و در نهایت اعمال مد و تأثیر سایر پارامترهای امواج ترکیبی، در تولید پدیده حباب سازی است. همچنین میزان تأثیر گذاری آرایش خاص ترکیب انتخابی در شرایط آزمایشگاهی برای مقصود مورد نظر، می تواند از موضوعات مورد توجه باشد [۹]. با وجود مشخص شدن خاصیت حباب سازی امواج فراصوتی در بررسی های سونوشیمی و سونوبیولوژی توسط آپفل^۱، نیپراز^۲ و همکارانش (۱۹۶۹ و ۱۹۸۰) و فلاین^۳ در سال ۱۹۷۵ در محیط های آبی و در شرایط اعمال شدت های پایین، هنوز تولید حباب در سیستم های بیولوژیک و در شرایط درون تنی مورد تردید بود، تا این که در سال ۱۹۸۱، ترهار^۴ و همکارانش آثار درمانی پدیده حباب سازی را در پای عقب خوکچه هندی مشاهده

کردند. به دنبال آن در سال ۲۰۰۰، کاردتنسن^۵ خطر حباب سازی نوع گذرا را در بافت های بیولوژیک، ناشی از اعمال پالس های کوتاه امواج فراصوتی تشخیصی، مورد توجه قرار داد و مشاهده کرد تولید این نوع حباب ها در برخی بافت ها به خصوص بافت هایی که درصد گاز بیشتری دارند، می تواند قابل توجه باشد [۲۶-۲۸]. براتی و همکارانش تأثیر زمان تابش همزمان امواج فراصوتی ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز پیوسته را در کنترل تومور آدنوکارسینوما بررسی کردند و زمان مناسب تأثیر مثبت تابش همزمان دو بسامد را گزارش نمودند [۲۵]. در مطالعه دیگر؛ برای تعیین مد بهینه تابش دهی، تابش همزمان امواج فراصوت با دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز به ترتیب در مدهای پیوسته-پیوسته و پیوسته-پالسی در زمان های تابش دهی ۱۵ و ۳۰ دقیقه را مورد ارزیابی دادند [۲۳] البته آن ها تأثیر تابش تک بسامد ها و مقایسه آن با شرایط تابش دو بسامد را بر روند افزایش رشد تومور بررسی نکردند. از طرفی با توجه به امکان بروز آثاری متفاوت ناشی از اعمال هر یک از بسامد ها به صورت مجزا در مقایسه با تابش همزمان دو بسامد، به دلیل یکسان نبودن شرایط محیط آبی و بافت تومور در موجود زنده، لذا در تحقیق حاضر، تأثیر تابش هر کدام از مولدهای تک بسامد امواج فراصوتی بر روند رشد تومور آدنوکارسینوما و مقایسه آن با تأثیر تابش همزمان دو بسامد مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تابش دهی ترکیب دو بسامد همزمان ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی در روزهای اولیه پس از درمان در کاهش روند رشد تومور مؤثر می باشد. با اجرای پروتکل تابش دهی هر یک از بسامد های ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز به صورت مجزا و در زمان بهینه تابش دهی ۳۰ دقیقه، مشخص شد در روزهای اولیه پس از درمان مد تابش تک بسامد منجر به کاهش معنادار در روند رشد تومور خواهد شد. بررسی درصد حجم نسبی تومور در گروه های تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و تک بسامد ۱ مگاهرتز پالسی و تابش همزمان نشان می دهد که در روزهای اولیه از شروع درمان

¹ - Apfel

² - Neppiras

³ - Flynn

⁴ - G R ter Haar

⁵ - Cardtensen

مانند فشار اکوستیکی، دما، فشار محیط، ویسکوزیته محیط، ظرفیت گرمایی ویژه گازهای درون حباب، نیروی کشش سطحی و بسامد امواج تابشی در شکل گیری و نابودی حباب ها در بررسی نتایج درمان حائز اهمیت می باشند. لذا با توجه به نمونه های مورد بررسی در نهایت می توان اظهار داشت با بررسی نتایج به دست آمده اگرچه در محاسبه پارامتر درصد حجم نسبی اختلاف معنادار از نظر آماری میان پروتکل اعمال تابش ترکیبی دو بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز پیوسته و ۱ مگاهرتز پالسی در مقایسه با تابش هر بسامد به تنهایی مشاهده نشد؛ اما طی جمع بندی نتایج محاسبه پارامترهای تأخیر در روند رشد تومور مشخص گردید اعمال تابش همزمان دو بسامد در مقایسه با تابش هر بسامد به تنهایی در کنترل روند رشد تومور آدنوکارسینوما پستان، مؤثرتر خواهد بود.

۵- نتیجه گیری

با وجود مؤثر بودن تکنیک تابش دهی دو بسامد در القاء پدیده حفره سازی بیشتر در محیط های آبی [۹] و عدم بررسی تابش تک بسامد و مقایسه آن ها با شرایط تابش همزمان ترکیب دو بسامد در شرایط *in vivo* در این تحقیق با جمع بندی نتایج به دست آمده از محاسبه کلیه پارامترهای تأخیر در روند رشد تومور، تاثیر مثبت شرایط تابش دهی بهینه دو بسامد به طور همزمان؛ نسبت به تابش تک بسامد بر تومور آدنوکارسینوما مدل موش Balb/C نتیجه گیری شد. اثر بخشی موثر تابش دو بسامد در کنترل روند رشد تومور نوید دهنده آن است که در آینده استفاده از تکنیک تابش دهی با دو یا چند بسامد در دو محدوده بسامدی امواج فراصوت مگاهرتز و کیلوهرتز بتواند در درمان نمونه های انسانی نیز مؤثر باشد.

۶- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد است که از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس بخاطر حمایت مالی تشکر و قدردانی می گردد.

تفاوت معناداری از نظر آماری با گروه های شم و کنترل مشاهده شد. اما میان تابش تک بسامد ها و تابش همزمان دو بسامد در روزهای انتهایی تفاوت معنادار دیده نشد. بررسی زمان رسیدن حجم تومور به دو برابر حجم اولیه اثر مثبت تابش ترکیبی با دو بسامد را نسبت به گروه های تحت تابش ۱ مگاهرتز تنها، ۱۵۰ کیلوهرتز تنها؛ شم و کنترل نشان داد. همچنین زمان رسیدن حجم تومور به ۵ برابر حجم اولیه در گروه تابش همزمان دو بسامد حدود ۳ برابر بیش تر از گروه های دیگر حاصل شد. به نظر می رسد هر دوی این پارامترها می توانند شاخص مناسبی در ارزیابی روند رشد تومور باشند. درصد مهارشدگی رشد تومور در گروه با تابش ترکیب دو بسامد نسبت به گروه کنترل همواره دارای روند کاهشی در مقایسه با پروتکل های تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و ۱ مگاهرتز را نشان داد. چنانچه در تابش همزمان دو بسامد طور متوسط ۲۸ درصد رشد تومور نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در مقایسه؛ گروه های تابش تک بسامد ۱۵۰ کیلوهرتز و تابش تک بسامد ۱ مگاهرتز به ترتیب ۳ و ۱۵ درصد نسبت به گروه کنترل؛ رشد تومور مهار شد. آزمون آماری زوج تی حاکمی از تمایز بسیار خوب میان دو گروه تحت تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیبی با گروه های شم و کنترل است. هر چند زمان بقای حیوانات بین دو گروه تابش ۱۵۰ کیلوهرتز تنها و تابش ترکیب دو بسامد تفاوت معنی داری نداشت. به نظر می رسد با وجود کاهش حجم نسبی تومور در اثر تابش ۱ مگاهرتز پالسی تنها؛ این محدوده بسامد و شدت تابش تأثیری بر زمان های رسیدن حجم تومور به دو و پنج برابر مقدار اولیه اش و نیز زمان بقا نداشته است. هر چند تابش ترکیب دو بسامد موجب مهار موثر رشد تومور گردید. به نظر می رسد در تابش امواج فراصوت نمی توان تنها عامل ایجاد تخریب سلول را به واسطه ایجاد حفره سازی اکوستیکی دانست بلکه عواملی همچون نیروی برشی، جریان های میکرونی با گرادیان سرعت بالا پیرامون حباب های تولید شده، اثر فوران و بسیاری پدیده های ناشناخته دیگر در این فرآیند نقش آفرین خواهند بود. همچنین اثر عوامل محیطی

منابع

1. Ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*. 1999 Mar;9(1):3-9.
2. Bailey MR, Khokhlova VA, Sapozhnikov OA, Kargl SG, Crum LA. Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound: A review. *Acoust Phys*. 2003; 49(4):369-88.
3. Ter Haar GR, Daniels S. Evidence for ultrasonically induced cavitation in vivo. *Phys Med Biol*. 1981 Nov;26(6):1145-9.
4. Liu HL, Chen WS, Chen JS, Shih TC, Chen YY, Lin WL. Cavitation-enhanced ultrasound thermal therapy by combined low and high frequency ultrasound exposure. *Ultrasound Med Biol*. 2006 May;32(5):759-67.
5. Liu Q, Li X, Xiao L, Wang P, Wang X, Wang Y. Study of the synergistic effect on hepatoma 22 tumor cells by focused ultrasound activation of hematoporphyrin. *J Ultrasound Med*. 2008 Jan;27(1):57-64.
6. Liu Q, Li X, Xiao L, Wang P, Wang X, Tang W. Sonodynamically induced antitumor effect of hematoporphyrin on hepatoma 22. *Ultrason Sonochem*. 2008 Sep;15(6):943-8.
7. Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy: A review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2004 Sep;11(6):349-63.
8. Carstensen EL, Gracewskis S, Dalecki D. The search for cavitation in vivo. *Ultrasound Med Biol*. 2000 Nov;26(9):1377-85.
9. Barati AH, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie SZ, Hassan ZM. Effect of exposure parameters on cavitation induced by low-level dual-frequency ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2007 Sep;14(6):783-9.
10. Ciuti P, Dezhkunov NV, Francescutto A, Kulak AI, Iernetti G. Cavitation activity stimulation by low frequency field pulses. *Ultrason Sonochem*. 2000 Oct;7(4):213-6.
11. Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Jun 30;60(10):1103-16.
12. Tachibana K, Feril Jr LB, Ikeda-Dantsuji Y. Sonodynamic therapy. *Ultrasonics*. 2008 Aug;48(4):253-9.
13. Yumita N, Nishigaki R. Sonodynamically induced antitumor effect of photofrin II on colon 26 carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000 Oct;126(10):601-6.
14. Barnett S. Nonthermal issues: Cavitation- It's nature, detection and measurement. *Ultrasound Med Biol*. 1998;24 Suppl 1:S11-21.
15. Sokka SD, Gauthier TP, Hynynen K. Theoretical and experimental validation of a dual frequency excitation method for spatial control of cavitation. *Phys Med Biol*. 2005 May 7;50(9):2167-79.
16. Feng R, Zhao Y, Zhu C, Mason TJ. Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication. *Ultrason Sonochem*. 2002 Oct;9(5):231-6.
17. Liu H, Hsieh CM. Single-transducer dual-frequency ultrasound generation to enhance acoustic cavitation. *Ultrason Sonochem*. 2009 Mar;16(3):431-8.
18. Daly BJO, Morris E, Gavin GP, Byrne JM, McGuinness GB. High-power low-frequency ultrasound: A review of tissue dissection and ablation in medicine and surgery. *J Mater Process Tech*. 2008; 200: 38-58.
19. Servant G, Laborde JL, Hita A, Caltagirone JP, Gerard A. On the interaction between ultrasound waves and bubble clouds in mono- and dual-frequency sonoreactors. *Ultrason Sonochem*. 2003 Oct;10(6):347-55.
20. Kanthale PM, Brotchie A, Ashokkumar M, Grieser F. Experimental and theoretical investigations on sonoluminescence under dual frequency conditions. *Ultrason Sonochem*. 2008 Apr;15(4):629-35.
21. Kanthale PM, Ashokkumar M, Grieser F. Sonoluminescence, sonochemistry (H₂O₂ yield) and bubble dynamics: Frequency and power effects. *Ultrason Sonochem*. 2008 Feb;15(2):143-50.

22. Iernetti G, Ciuti P, Dezhkunov NV, Reali M, Francescutto A, Johri GK. Enhancement of high-frequency acoustic cavitation effects by a low-frequency stimulation. *Ultrason Sonochem.* 1997 Jul;4(3):263-8.
23. Barati AH, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie SZ, Hassan ZM. Treatment of murine tumors using dual-frequency ultrasound in an experimental in vivo model. *Ultrasound Med Biol.* 2009 May;35(5):756-63.
24. Yumita N, Okuyama N, Sasaki K, Umemura SI. Sonodynamic therapy on chemically induced mammary tumor: Pharmacokinetics, tissue distribution and sonodynamically induced antitumor effect of gallium-porphyrin complex ATX-70. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007 Nov;60(6):891-7.
25. Barati AH, Mokhtari-Dizaji M, Mozdarani H, Bathaie SZ, Hassan ZM. Treatment of murine tumor models of breast adenocarcinoma by continuous dual-frequency ultrasound. *Iran J Med Phys* 2009; 6(1): 1-12.
26. Novichenko NL, Mamchur AA, Lisniak IO, Gamaliya MF. Study of photodynamic efficiency of the hematoporphyrin conjugated with antibody to VEGF in mouse lewis carcinoma. *Exp Oncol.* 2008 Dec;30(4):315-8.
27. Crum LA, Hansen GM. Growth of air bubbles in tissue by rectified diffusion. *Phys Med Biol.* 1982 Mar;27(3):413-7.
28. Miyoshi N, Igarashi T, Riesz P. Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of Hematoporphyrin and Rose Bengal: The mechanism of sonodynamic therapy. *Ultrason Sonochem.* 2000 Jul;7(3):121-4.