● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هشتم، شمارهٔ ۳، ص ۱۶۸-۱۶۱، ۱۳۸۰

مقالهٔ پژوهشی

اثر سیتوژنتیکی امواج فراصوتی درمانی پیوسته بر لنفوسیت‌های انسان در مرحلهٔ G_0 چرخهٔ سلول

بهرام یوسفیان[۱]، دکتر حسین مزدارانی[۲]، دکتر منیژهٔ مختاری دیزجی[۳]

خلاصه

علی‌رغم تحقیقات گسترده‌ای که در رابطه با آثار بیولوژیک امواج فراصوتی انجام شده است، هنوز در مورد آثار بیولوژیک آن به ویژه اثر بر مولکول DNA تردید وجود دارد. از آنجا که هرگونه تغییر در مولکول DNA می‌تواند موجب آسیب‌های کروموزمی شود، بررسی آثار کلاستوژنیک (آسیب‌های کروموزومی) امواج فراصوتی حایز اهمیت است. در این مطالعه اثر سیتوژنتیک امواج فراصوتی درمانی پیوسته با فرکانس ۱MHz و توان‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات بر لنفوسیت‌های تحریک نشدهٔ انسان مورد بررسی قرار گرفت. لنفوسیت‌های نمونهٔ خون هپارینه با استفاده از محیط جداکنندهٔ «فایکول هایپاک» جداسازی شد و سپس تحت تأثیر امواج فراصوتی قرار گرفت. نمونه‌های تابش دیده در محیط RPMI 1640 کشت داده شد و سلول‌ها با فیتوهماگلوتینین تحریک شدند و با استفاده از سیتوکلازین B سلول‌های دو هسته‌ای در مرحلهٔ سیتوکینز متوقف گردیدند. برای هر نمونه فراوانی میکرونوکلئی در ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های شاهد، Sham و نمونه‌هایی که تحت تابش امواج فراصوتی با توان‌های مختلف از ۰/۵ تا ۱/۵ وات قرار گرفتند، نشان داد که بین گروه Sham و گروه تابش دیده با امواج فراصوتی با توان ۰/۵ وات اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. فراوانی میکرونوکلئی در سلول‌هایی که تحت تابش ۱ و ۱/۵ وات امواج فراصوتی قرار گرفتند، اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و Sham نشان داد ($P<0/05$). در مطالعه حاضر به علت کوتاهی زمان تابش، افزایش دما محسوس نبود، لیکن پدیده‌های مکانیکی امواج فراصوتی شامل آثار شیمیایی که موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد (احتمالاً ناشی از پدیده حفره‌سازی در محیط تابش) می‌گردد و لرزش‌های مکانیکی مولکول‌های بزرگ که ساختمان نسبتاً شکننده‌ای دارند، می‌تواند نقش عمده‌ای در ایجاد آسیب کروموزومی در توان‌های بالاتر امواج فراصوتی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوتی پیوسته، اثر سیتوژنتیک، لنفوسیت انسان، میکرونوکلئی

۱ـ کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، ۲ـ استاد گروه رادیولوژی، ۳ـ استادیار گروه فیزیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مقدمه

امواج فراصوتی تشخیصی به طور گسترده‌ای در پزشکی استفاده می‌شود به طوری که میلیون‌ها زن باردار امروزه جهت بررسی وضعیت جنین‌شان تحت تابش امواج فراصوتی قرار می‌گیرند. اگر چه تجربه‌های بالینی مبین بی‌ضرر بودن تابش امواج فراصوتی است (۱۹) اما در مورد ایجاد اثرات ژنتیکی نتایج متناقض است (۳). نشان داده شده که امواج فراصوتی تشخیصی پزشکی آثار کشنده ایجاد نمی‌کند (۱,۲)، اما امواج فراصوتی درمانی که با توان‌های بالای قابل ملاحظه و تا حدی در فرکانس‌های پایین‌تر از امواج فراصوتی تشخیصی استفاده می‌شوند، قادر به ایجاد آثار بیولوژیک می‌باشند. تغییرات در مورفولوژی و افزایش مرگ سلول‌های پستانداران در محیط کشت توسط تابش امواج فراصوتی گزارش شده است (۱۳). از خصوصیات سلول‌های تمامی بافت‌ها استعداد سرطانی شدن است و گرچه این اثر فوری نیست، اما همراه با دیگر عوامل جهش‌زای محیطی اثرات درازمدت ایجاد می‌کند. در حال حاضر فرضیه‌های سرطان‌زایی بر مبنای ایجاد تغییرات ژنتیکی است که باعث شروع زنجیرهٔ وقایعی می‌شود که به سرطانی شدن سلول می‌انجامد (۴). از آنجا که تابش امواج فراصوتی، تغییراتی در مولکول DNA ایجاد می‌کند و نیز نشان داده شده که امواج فراصوتی در سطوح تشخیصی منجر به تحریک ترمیم DNA سلول‌های پستانداران در محیط کشت می‌شود که خود مبین رخداد آسیب DNA است (۱۴)، از این‌رو بررسی اثر موتاژنیک و کلاستوژنیک امواج فراصوتی همواره مورد بحث بوده است.

اثر ژنتیکی شامل تغییرات عددی و ساختاری کروموزم‌ها و همچنین جهش‌های نقطه‌ای و تبادل کروماتیدهای خواهری (Sister chromatid exchange= SCE) است. اگر چه تغییرات ساختاری، عددی و جهش‌های نقطه‌ای از نظر بالینی حائز اهمیت هستند، اما اهمیت بیولوژیک SCE هنوز شناخته شده نیست زیرا ظاهراً تغییری در اطلاعات محتویات DNA ایجاد نمی‌کند. در هر حال، بررسی‌های اولیه نشان می‌دهد که امواج فراصوتی در سلول‌های کشت شده پستانداران، SCE ایجاد می‌کند (۸)، در حالی که دیگر محققان این یافته را تأیید نمی‌نمایند (۱۸). گزارش ایجاد شکست‌های کروموزومی در نتیجهٔ تابش امواج فراصوتی در لنفوسیت‌ها و دیگر سلول‌های انسان در شرایط *In vitro* توسط Macintosh و همکاران نیز با آزمایش‌های دیگر محققان تأیید نشده است (۱۵,۱۶,۱۷).

در هر حال اثرات بیولوژیک حاصل از استفادهٔ همزمان امواج فراصوتی و دیگر عوامل فیزیکی مانند هیپرترمی، اشعه ایکس و گاما نشان می‌دهد که امواج فراصوتی موجب افزایش حساسیت سلول‌ها به یکی از عوامل فیزیکی ذکر شده می‌گردد و بررسی شدت، فرکانس و روش‌های تابش‌دهی مناسب برای افزایش اثر کلاستوژنیک در سلول‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۹,۱۰,۲۲).

گزارش اخیر در زمینهٔ میزان آسیب ژنتیکی حاصل از تابش‌گیری شغلی امواج فراصوتی به تنهایی و تابش‌گیری شغلی توأم امواج فراصوتی و پرتوهای یونیزان مبین آن است که فراوانی میکرونوکلئی در افراد تحت تابش امواج فراصوتی نسبت به گروه شاهد بیشتر است. ایجاد میکرونوکلئی که یک شاخص بیولوژیک برای ایجاد شکست کروموزوم و ناشی از قطعه‌های کروموزومی بدون سانترومر یا کروموزوم کامل می‌باشد، اثر مضر امواج فراصوتی را بر ژنوم انسان نشان می‌دهد. مطالعه آنالیز متافاز و شمارش میکرونوکلئی در افراد تحت تابش‌گیری شغلی پرتوهای یونیزان و امواج فراصوتی نیز حاکی از ایجاد اثر ژنتیکی بیشتر در گروه تابش دیده با هر دو پرتو نسبت به گروهی است که تنها تابش پرتو یونیزان دریافت کرده‌اند (۶,۷).

با توجه به بحث‌های موجود در رابطه با قابلیت ایجاد اثر ژنتیکی امواج فراصوتی، در این مطالعه اثر امواج فراصوتی درمانی پیوسته در فرکانس ۱ MHz و توان‌های متفاوت بر روی لنفوسیت‌های انسان در مرحله Go با روش سنجش میکرونوکلئی در سلول‌های دو هسته‌ای (Cytokinesis blocked micronuclei assay) مورد بررسی قرار گرفت. روش سنجش میکرونوکلئی در سلول‌های دو هسته‌ای روشی حساس، کارآمد و مطمئن برای بررسی اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر ساختار DNA و کروموزوم‌های سلول‌های پستانداران است که به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵,۱۱).

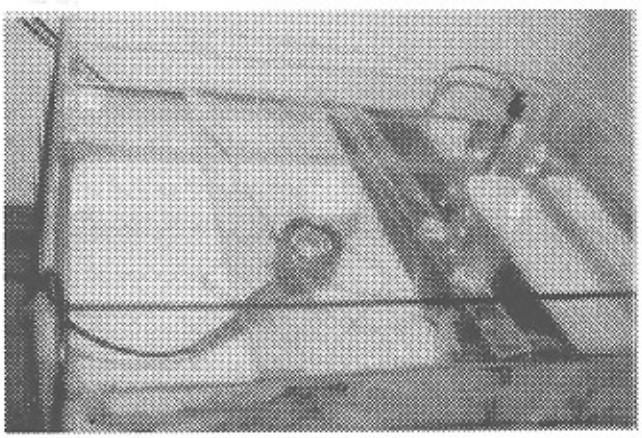
مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر سیتوژنتیکی امواج فراصوتی بر لنفوسیت‌های خون محیطی، نمونهٔ خون محیطی با استفاده از سرنگ هپارینه از ورید ناحیه آرنج تهیه شد. برای جلوگیری از عوامل مخدوش کننده، کلیه نمونه‌ها از یک نفر داوطلب مذکر غیرسیگاری ۳۴ ساله تهیه گردید که طی سه ماه قبل از نمونه گیری، تحت تابش درمانی یا تشخیصی پرتوهای یون‌ساز و درمان با آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته بود و به عفونت‌های ویروسی نیز مبتلا نبوده است. به علت توانایی امواج فراصوتی مورد استفاده در لیز کردن گلبول‌های قرمز و رهاشدن محتویات آن به

درون محیط کشت که موجب تغییر pH محیط کشت، ایجاد سمیّت و نهایتاً اختلال در رشد لنفوسیت‌ها می‌شود، با استفاده از داروی فایکول هایپاک (سازمان انتقال خون ایران) و سانتریفیوژ Free angle (بازوی آزاد) با دور ۲۰۰۰rpm، لکوسیت‌ها جدا شدند. فایکول هایپاک به دلیل دارا بودن چگالی بالا و تمایل اتصال به گلبول‌های قرمز خون، موجب رسوب گلبول‌های قرمز شده و از مابقی مواد جدا می‌شود. محلول سوسپانسیون گلبول‌های سفید به تعداد 5×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر و محیط کشت RPMI-1640 فاقد سرم جنین گاو (FCS) در ظروف پلی‌استیرن تحت تابش امواج فراصوتی قرار گرفت. دو گروه دیگر نمونه به عنوان گروه‌های شاهد (بدون مکانیسم‌های جابجایی و تابش‌دهی) و sham (همراه با مکانیسمهای جابجایی و تابش‌دهی ولی بدون پرتودهی فراصوتی) منظور گردید.

برای تابش امواج فراصوتی از دستگاه سونوتراپی پیوسته (ENRAF NANIUS-434) با فرکانس کاری ۱ MHz و توان‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات استفاده شد. برای پرتودهی فراصوتی سلول‌های گروه آزمون در شرایط *in vitro* یک مخزن شیشه‌ای به ابعاد ۲۵×۴۵×۶۷ سانتی‌متر مکعب طراحی و با آب مقطر بدون یون پر شد. پروب مولد امواج فراصوتی توسط نگهدارندهٔ فلزی در کف ظرف ثابت شد. ظرف کشت از جنس پلی‌استیرن محتوی گلبول‌های سفید و محیط کشت (با ضخامت یک میلی‌متر) انتخاب گردید زیرا امپدانس صوتی آن نزدیک به خون و آب قرار دارد. با توجه به قطر پروب (۲۵mm)، میدان دید نزدیک حدود ۱۰۰ میلی‌متر است، نمونه در انتهای میدان دید نزدیک مبدل فراصوتی در فاصله ۹۰ میلی‌متری قرار داده شد زیرا در این ناحیه علاوه بر آنکه فشار صوتی و شدت نسبی حداکثر بوده، یکنواختی نسبتاً بالایی نیز وجود دارد (۲۰). به منظور ثابت نگه‌داشتن دمای آب (۳۷°C) در حین تابش، از یک گرمکن الکتریکی ترموستات‌دار (Rena) استفاده شد و یکنواختی دما در کلیه نقاط مخزن نیز با استفاده از یک همزن (Janke & Kunkel GMBH & Co. KG) ایجاد و دمای محیط داخل مخزن با استفاده از یک دماسنج دیجیتالی (Sigma) با دقت ±۰/۰۱°C کنترل شد. شکل ۱، تصویری از نحوهٔ پرتودهی و چگونگی قرار گرفتن نمونه و مبدل را نشان می‌دهد.

شدت پرتو فراصوتی توسط یک رادیومتر (ENRAF NANIUS) کالیبره شد. با توجه به شدت در سطح مبدل، فاصله نمونه از سر مبدل فراصوتی، ضریب تضعیف و امپدانس صوتی آب، پلی‌استیرن، خون و هوا (۲۰) و بررسی میزان تضعیف و عبور امواج فراصوتی از مرز مشترک دو محیط و انعکاس امواج فراصوتی از مرز مشترک هوا ـ خون، شدت امواج رسیده به گلبول‌های خونی به ترتیب ۰/۱۵، ۰/۲۹ و ۰/۴۴ وات بر سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری شد. محلول معلّق لکوسیت‌ها در RPMI طوری تحت تابش امواج فراصوتی قرار گرفت که مرکز ظرف کشت و مرکز پروب در یک راستا باشند. چون قطر ظرف کشت دو برابر قطر پروب است و بررسی در میدان تخت امواج فراصوتی انجام می‌شود، لذا از روش پرتودهی تقطیعی مشتمل بر ۳۰ ثانیه پرتودهی و هم‌زدن نمونه به مدت ۳۰ ثانیه و تکرار پرتودهی (در مجموع ۱ دقیقه) استفاده شد.



شکل ۱: *سیستم پرتودهی و نحوهٔ قرارگرفتن نمونه و مبدل امواج فراصوتی*

کشت لنفوسیت‌ها و تهیه میکرونوکلئی

لکوسیت‌های تابش دیده به تعداد 5×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر به ظرف کشت استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 حاوی L-گلوتامین، ۱۵٪ FCS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) منتقل شد. برای تحریک لنفوسیت‌ها و ورود آنها به چرخهٔ سلولی و رشد، ۲٪ فیتوهماگلوتینین (PHA) به محیط کشت اضافه شد. سلول‌های کشت شده در انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار گرفتند. ۴۳ ساعت پس از کشت و تحریک لنفوسیت‌ها، ۳μg/ml داروی سیتوکلازین B (Sigma) به محیط اضافه شد تا سلول‌ها در مرحله سیتوکینز متوقف شوند. ۶۷ ساعت پس از شروع کشت، محصول‌برداری انجام شد.

محتویات هر ظرف کشت به لوله سانتریفیوژ منتقل شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۹۰۰rpm به مدت ۷ دقیقه، محیط کشت دور ریخته شد و به سلول‌ها محلول ۰/۰۷۵ مولار KCl اضافه گردید. پس از شوک هیپوتونیک کوتاه مدت، سلول‌ها با فیکساتیو

کارنوی (مخلوطی از اسیداستیک و متانول به نسبت حجمی ۳:۱) تثبیت و سلول‌ها به روی لام تمیز منتقل شدند. لام‌ها با محلول گیمسای ۱۰ درصد (Merck) رنگ‌آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری (Novex) با درشت‌نمایی ۴۰۰ بررسی و فراوانی میکرونوکلئی در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای برای هر نمونه تعیین گردید.

نتایج گروه شاهد، Sham و تابش دیده با امواج فراصوتی با توان‌های ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ وات با استفاده از آزمون غیرپارامتری کروسکال - والیس (Kruskal-Wallis) از نظر آماری مقایسه شد.

نتایج

در مطالعهٔ حاضر اثر توان‌های، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات امواج فراصوتی درمانی پیوسته بر روی لنفوسیت‌های خون محیطی انسان برای ایجاد آسیب بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. شمارش فراوانی میکرونوکلئی در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای به عمل آمد. نتایج حاصل از بررسی سیتوژنتیکی سه سری نمونه خونی که تحت تابش امواج فراصوتی پیوسته با توان‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات در فرکانس ۱MHz قرار گرفته‌اند، با گروه شاهد و Sham مقایسه شده و در جدول ۱ آمده است.

بررسی نتایج حاصل از فراوانی میکرونوکلئی به ازای ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده حاصل از پرتودهی فراصوتی با توان ۰/۵ وات در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) را نشان می‌دهد، لکن در مقایسه با گروه Sham اختلاف شمارش میکرونوکلئی معنی‌دار نیست.

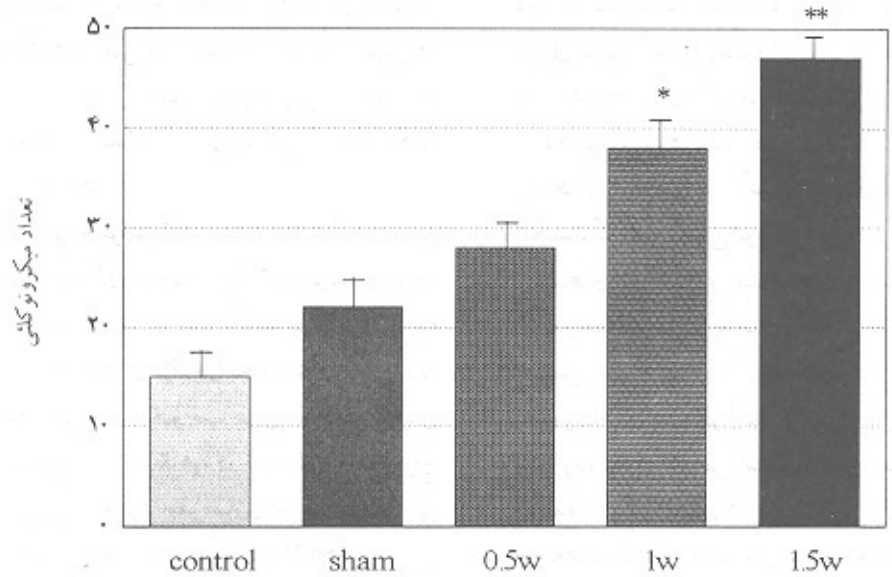
مقایسهٔ گروه تابش دیده با توان ۱ وات امواج فراصوتی و گروه شاهد نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار با سطح $P<0/05$ می‌باشد که این اختلاف با گروه Sham نیز به طور ضعیفی معنی‌دار بود.

سلول‌هایی که با توان ۱/۵ وات امواج فراصوتی تحت تابش واقع شدند، در مقایسه با هر دو گروه شاهد و Sham اختلاف معنی‌دار با سطح $P<0/01$ نشان دادند.

میانگین و خطای استاندارد فراوانی میکرونوکلئی حاصل از شمارش ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای حاصل از دو گروه شاهد و Sham در مقایسه با سلول‌هایی که تابش فراصوتی با توان‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات داشته‌اند، در شکل ۲ ملاحظه می‌شود. مقایسهٔ سه گروه تحت تابش امواج فراصوتی با یکدیگر (بدون مقایسه با شاهد و Sham) اختلاف معنی‌داری را در شمارش میکرونوکلئی ($P<0/05$) نشان می‌دهد و در واقع نشان‌دهندهٔ وابستگی فراوانی میکرونوکلئی به توان امواج فراصوتی در محدودهٔ بکار رفته در این تحقیق می‌باشد.

جدول ۱: *فراوانی میکرونوکلئی به ازای ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در هر نمونه*

گروه / آزمایش	شاهد	Sham	پرتو دهی فراصوت (1 MHz)		
			۰/۵ وات	۱ وات	۱/۵ وات
آزمایش اول	۱۲	۲۲	۲۸	۳۷	۴۶
آزمایش دوم	۱۸	۲۱	۲۴	۴۰	۴۴
آزمایش سوم	۱۵	۲۰	۳۰	۳۵	۴۹
میانگین	۱۵	۲۰/۳	۲۷/۳	۳۷/۳	۴۶/۳



شکل ۲: *میانگین فراوانی میکرونوکلئی در ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای در گروه‌های تابش دیده فراصوتی (۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات) و مقایسه با گروه‌های شاهد و Sham در نمودار فوق خطای استاندارد (SEM) به صورت دوطرفه رسم شده است (P<۰/۰۱**، P<۰/۰۵*)*

بحث و نتیجه‌گیری

امواج فراصوتی از اواخر دههٔ ۴۰ میلادی در پزشکی کاربرد موفقیت‌آمیز پیدا کردند و تاکنون هیچ مدرک علمی معتبری دال بر مضر بودن این امواج در شدت‌های تشخیصی و درمانی ارائه نشده است. امواج فراصوتی در مقایسه با اشعه یونیزان می‌توانند به طور نسبتاً دقیق‌تر بر روی محل ضایعه سرطانی متمرکز شوند لذا اثر آن‌ها تا حد زیادی به محل ضایعه محدود می‌شود. یکی از معتبرترین و حساس‌ترین روش‌ها برای بررسی آثار کلاستوژنیک عوامل مختلف، آزمون میکرونوکلئی است. لیکن در بین سلول‌ها، سلول‌های لنفوسیت به علت حساسیت بالا نسبت به عوامل کلاستوژن از ویژگی خاصی برخوردارند. در مطالعهٔ حاضر، امواج فراصوتی ۱MHz با توان‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ وات به مدت یک دقیقه بر روی لنفوسیت‌های جدا شده متمرکز گردید. بررسی نتایج حاصل از فراوانی میکرونوکلئی وجود اختلاف آماری معنی‌داری را بین گروه ۰/۵ وات و گروه Sham نشان نداد($p>0/05$)، هر چند این گروه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار دارد. گروه‌های ۱ و ۱/۵ وات نیز اختلاف معنی‌دار آماری با گروه شاهد و Sham نشان دادند.

در بررسی‌های انجام شده، مرگ سلولی در آستانه شدت ۱/۱ وات بر سانتی‌متر مربع امواج فراصوتی درمانی گزارش شده است (۱۲). در مطالعه دیگری ملاحظه شده که شرایط منجر به بروز آسیب ژنتیکی دارای بیشترین شدت، کمترین فرکانس و نوع موج پیوسته با حفره‌سازی موقت است (۱۸). وابستگی توانایی امواج فراصوتی در ایجاد آسیب ژنتیکی به شرایط تابش‌دهی و نوع سلول مورد تابش اثبات شده است. لیکن در این میان ظاهراً فرکانس امواج فراصوتی نقش عمده‌ای دارد زیرا بروز پدیدهٔ حفره‌سازی که عامل ایجاد رادیکال‌های آزاد در محیط مورد تابش است، کاملاً به فرکانس امواج فراصوتی بستگی دارد (۲,۲۱).

در روش‌های تشخیصی و درمانی امواج فراصوتی، افزایش فرکانس موجب لطمه‌های جدی به تشخیص و یا اهداف درمانی می‌شود لذا از تغییر دو عامل دیگر یعنی شدت و زمان تابش امواج در جهت تغییر اثر حفره‌سازی و ایجاد رادیکال آزاد و در نتیجه آسیب ژنتیکی استفاده می‌گردد. از این رو برای رسیدن به آسیب ژنتیکی کمتر در روش‌های درمانی و تشخیصی بایستی از فرکانس بالا، شدت کم و زمان تابش‌دهی کم استفاده کرد.

مطالعات نشان داده که آستانهٔ متلاشی شدن سلول‌ها در شدت ۱ وات بر سانتی‌متر مربع و حداکثر آن در ۱۰ وات بر سانتی‌متر

مربع است. در شدت ۱۰ وات بر سانتی‌متر مربع، به علت بروز آثار گرمایی امواج فراصوتی و ایجاد حفره گازی، آثار تخریبی امواج فراصوتی کاهش می‌یابد زیرا امواج فراصوتی در شدت‌های بیش از ۱۰ وات بر سانتی‌متر مربع پس از رسیدن به حباب گاز به دلیل اختلاف شدید امپدانس صوتی، کاملاً منعکس شده و از حباب عبور نمی‌کنند.

با توجه به اینکه امواج فراصوتی به علت پدیدهٔ جذب در هنگام عبور از محیط، دمای محیط را بالا می‌برند، چنانچه هسته‌های حفره‌سازی در محیط موجود باشند، با وقوع پدیده حفره‌سازی موقت، رادیکال‌های آزاد در محیط تشکیل می‌شوند که هر دو عامل فوق می‌توانند موجب بروز ناهنجاری‌های کروموزومی و مرگ سلولی شوند. ظاهراً در توان ۰/۵ وات امواج فراصوتی انرژی کافی برای وقوع حفره‌سازی موقت در مایعی مانند سوسپانسیون لکوسیت‌ها در محیط کشت RPMI ندارند ولی امکان وقوع حفره‌سازی پایدار وجود دارد که موجب پدیدهٔ برشی (Shearing) و جریان‌های میکرونی می‌شود که به نوبهٔ خود سلول‌ها را متأثر می‌سازند و همچنین افزایش دمای محیط نیز موجب تشدید این آثار شده است. در توان‌های ۱ و ۱/۵ وات انرژی پرتو به حدی رسیده است که تمام مکانیزم‌های آسیب‌زا را فعال کند و سلول‌ها را مورد تأثیر قرار دهد که نتایج نیز مبین وجود این آسیب‌هاست. تصور می‌شود در این توان‌ها پدیدهٔ تولید رادیکال آزاد موجب آسیب مولکول DNA و نهایتاً ایجاد شکست کروموزوم می‌شود که اثر آن بر سیکل میکرونوکلئی در سلول‌های دو هسته‌ای مشاهده شده است.

در مطالعه حاضر به منظور کاهش تأثیر متغیرهایی مانند سن، جنس، نوع تغذیه، استفاده از دارو و پرتوگیری قبلی، از لنفوسیت‌های یک نفر استفاده شد که کاری مشابه تحقیق بر روی یک رده سلولی خاص است. واضح است برای تعمیم نتایج مطالعه به استفاده‌های کاربردی بالینی، لازم است مطالعه بر روی نمونه‌های افراد از جنس‌ها و سنین مختلف و مراحل دیگر تقسیم سلولی تکرار گردد.

Summary

Cytogenetic Effects of Continuous Therapeutic Ultrasound Waves on Human Lymphocytes in G_0 Phase of Cell Cycle

B. Yoosefian, MSc[1]., H. Mozdarani, PhD[2]., M. Mokhtari-Dizaji, PhD[3].

1. MSc. of Medical Physics, 2. Professor of Radiobiology, 3. Assistant Professor of Medical Physics; School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

In spite of wide spread investigations performed, the biological effects of ultrasound waves, specially on DNA molecule has not been fully understood. Since any alteration in DNA molecule can lead to chromosome abnormality, the study of clastogenic effects of ultrasound is important. In this study, the effect of 1MHz frequency continuous waves with the power of 0.5, 1 and 1.5 Watts on G_0-human lymphocytes was investigated. Lymphocytes were separated from heparinized peripheral blood by using lymphocyte separation medium and then were exposed to ultrasound waves. Exposed samples were cultured in RPMI-1640 treated with phytohaemaglutinin (PHA) and then binuclei cells were harvested using cytochalasin B. For each sample 1000 binculei were examined for the presence of micronuclei. Results obtained from control, sham control and samples exposed to various ultrasound waves with different powers from 0.5 to 1.5 W showed that there is no statistical difference between the frequency of micronuclei observed for sham, control and samples exposed to 0.5 W. However cells exposed to 1 and 1.5 W ultrasound waves showed significantly higher micronuclei frequency compared to control and sham groups ($P<0.05$). In the present study, because of short exposure duration, temperature rise and hence thermal effect on cells was negligible. Therefore, mechanical process of ultrasound waves including chemical effects which lead to free radical formation (probably due to cavitation in exposure field) and

mechanical vibration of large molecules which are fragile structures may play a role in chromosomal aberration and micronuclei formation.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2001; 8(3): 161-168
Key words: *Therapeutic ultrasound, Cytogenetic effects, Human lymphocytes, Micronuclei*

References

1. Barnett SB, Rott HD, Ter Haar GR, Ziskin MC and Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23(6): 805-812.
2. Chandraratna PAN, Gallet J, Jones GB, Do Y, Gunawardana R, Narang Y. An investigation of possible effects of high frequency ultrasound on cellular integrity of cultured fibroblasts. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 911-914.
3. Doida Y, Miller MW, Cox C and Church CC. Confirmation of an ultrasound-induced mutation in two *in vitro* mammalian cell lines. *Ultrasound Med Biol* 1990; 16(7): 699-705.
4. Farber E and Cameron R. The sequential analysis of cancer development. *Adv Cancer Res* 1980; 31: 125-226.
5. Fenech M. The cytokinesis blocked micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Prespect* 1993; 101 supple 3: 101-7.
6. Garaj-Vrhovac V, Fucic A, Kubelka D, Hebrang A, Assessment of genome damage in occupational exposure to ionising radiation and ultrasound. *Mutat Res* 1997; 395: 101-105.
7. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N, Besendorfer V and Papes D. Induction of micronuclei in human lymphocytes after occupational exposure to ultrasound. *Chemosphere* 1999; 38(15): 3541-3553.
8. Goss SA. Sister chromatid exchange and ultrasound. *J Ultrasound Med* 1984; 3(10): 463-470.
9. Harrison GH and Blacer-Kubiczek EK. Continous wave ultrasound and neoplastic transformation *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 1989; 15: 335-340.
10. Harrison GH, Blacer-Kubiczek EK, Gutierrez PL. *In vitro* action of continous-wave ultrasound combined with adriamycin, X-rays or hyperthermia. *Radiat Res* 1996; 145: 98-101.
11. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, *et al.* Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4): 277-291.
12. Hedges MJ and Leeman S. 1.5 MHz ultrasound irradiation of human lymphocytes. *Int J Radiat Biol Relat stud Phys Chem Med* 1979; 35(4): 301-311.
13. Kaufman GE, Mutagenicity of ultrasound in cultured mammalian cells. *Ultrasound Med Biol* 1985; 11: 497-501.
14. Liebeskind D, Bases R, Elequin F, *et al.* Diagnostic ultrasound: effects on the DNA and growth patterns of animal cells. *Radiology* 1979; 131(1): 177-184.
15. Macintosh IJ, and Davey DA. Chromsome aberrations induced by an ultrasonic fetal pulse detector. *Br Med J* 1970; 4(727): 92-93.
16. Macintosh IJ and Davey DA. Relationship between intensity of ultrasound and induction of chromsome aberrations. *Br J Radiol* 1972; 45(532): 320-327.
17. Macintosh IJ, Brown RC and Conkley

WT. Ultrasound and *in vitro* chromosome aberrations. *Br J Radiol* 1975; 48(567): 230-232.

18. Miller MW, Azadniv M, Pettit SE, Church CC, Carstensen EL and Hoffman D. Sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells exposed to high intensity pulsed ultrasound: inability to confirm previous positive results. *Ultrasound Med Biol* 1989; 15(3): 255-262.
19. National Council on Radiation Protection and Measurements. Biological effects of ultrasound: mechanisms and clinical implications-NCRP Report No. 74: 1983.
20. Ramalho A, Sunjevaric I and Natarajan AT. Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of x-ray induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res* 1988; 207(3-4): 141-146.
21. Riesz P, Berdahl D and Christman CL. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 233-258.
22. Ter Harr G, Walling J, Loverock P and Townsend S. The effect of combined heat and ultrasound on multicellular tumor spheroids. *Int J Radiat Biol* 1988; 53(5): 813-887.