

تحویل انسولین از طریق پوست به خرگوشهای هایپرگلیسمیک توسط یک سامانه فراصوتی

آمنه سازگارنیا^{۱*}، سید محمد حسین بحرینی طوسی^۱، علی شگری قادیکلایی^۲، امیر حسین سازگارنیا^۳، پروین لایق^۴، طیبه کیانوش^۵، ناصر طیبی^۶، سعید ابراهیم زاده^۶

- ۱- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- کارشناس ارشد مهندسی برق گروه حمایت تکنیکی، کمپانی تکنولوژی هیوای، تهران، ایران
- ۴- استادیار گروه داخلی و غدد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم (داخلی)، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۵- مربی و عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۶- استادیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۷- مربی و عضو هیئت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۱۰

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۱۰

چکیده

مقدمه: روش سونوفورزیس با استفاده از فرکانسهای پایین امواج فراصوت در محدوده ۲۰ کیلو هرتز تا ۳ مگاهرتز با ایجاد تراوایی در سلولها موجبات تحویل زیرجلدی داروها را فراهم می آورد. در این تحقیق عملکرد یک سامانه فراصوتی تحویل داروی طراحی شده در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در تحویل انسولین از طریق پوست مشتمل بر ۷ ترانسدیوسر پیزوالکتریک ۴۰ کیلوهرتزی و اتاقک حاوی انسولین، بر روی خرگوشهای هایپرگلیسمیک مورد ارزیابی واقع شده است.

مواد و روشها: ۳۵ خرگوش با تزریق آلوکسان مونوهیدرات هایپرگلیسمیک و در ۵ گروه جهت درمانهای طراحی شده، تقسیم گردیدند. خرگوشها در ۲ گروه اصلی (در حضور انسولین با تابش فراصوت در ۲ زمان تابش)، یک گروه کنترل اصلی و ۲ گروه کنترل (یک گروه با تابش فراصوت در زمان تابش بالاتر در غیاب انسولین و در حضور نرمال سالیین و گروه دیگر بدون تابش فراصوت در حضور انسولین) تحت درمان و بررسی قرار گرفتند. با پرکردن اتاقک سیستم با انسولین و قرار دادن آن روی پوست شکم حیوان و فعال نمودن میدلهای پیزوالکتریک، قبل و پس از آغاز تابش امواج فراصوتی با فواصل زمانی معین، از حیوان خونگیری، و سطح گلوکز آن بوسیله گلوکومتر و انسولین سرم با روش رادیوایمنواسی تعیین گردید.

نتایج: بیشترین کاهش در سطح گلوکز مربوط به تابش ۲۰ دقیقه ای و زمان ۱۸۰ دقیقه و بیشترین افزایش در سطح انسولین در گروه تابش ۱۰ دقیقه ای و زمان ۶۰ دقیقه ثبت شد.

بحث و نتیجه گیری: چون جذب سریع و رسیدن به یک قله در زمان کوتاه و کاهش سریع دوباره آن، طرح مناسبی برای کنترل سطح گلوکز خون بعد از خوردن غذا فراهم می آورد، در نتیجه تابش با زمان ۱۰ دقیقه مناسبتر بنظر می رسد. همچنین پیش بینی می شود زمان تابش در فاصله زمانی بین خوردن غذا و استفاده از دستگاه تعیین کننده باشد. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۷، شماره ۱،

پیاپی (۲۶)، بهار ۸۹: ۴۲-۳۱)

واژگان کلیدی: سونوفورزیس، مولد پیزوالکتریک، امواج فراصوت، تحویل انسولین، تراوایی پوست

۱- مقدمه

دیابت به عنوان یکی از مشکلات پرهزینه سلامتی در اکثر جوامع مطرح می باشد. بیماران دیابتی در آمریکا، هزینه ای بالغ بر ۱۰۰ میلیارد دلار در سال به خود اختصاص داده و این بیماری هفتمین عامل مرگ و میر در ایالات متحده محسوب می شود [۱]. البته در ایران در این زمینه آمار و اطلاعات جامعی وجود ندارد.

در درمان دیابت نوع ۱، تزریق روزانه انسولین با دزهای مختلف مورد نیاز است. تزریق روشی تهاجمی می باشد که علاوه بر درد، عوارض دیگری مانند واکنش‌های حساسیت زای موضعی و سیستمیک و لیپودیستروفی^۱ انسولین را به همراه دارد [۲].

تحقیقات درمانی جاری در مراکز دیابت پیرامون سه محور اصلی پیوند پانکراس، سامانه های تحویل انسولین و روشهای تهیه انسولین دور می زند. سامانه های تحویل انسولین به دو روش تهاجمی و غیر تهاجمی عمل می کنند. دسته اول سامانه های تزریق و پمپ قابل حمل آن را در بر می گیرد و روشهای غیرتهاجمی شامل سونوفورزیس، یونتوفورزیس، تحویل انسولین از طریق تنفس و دیگر حفره های بدن، پمپ های انسولین حلقه باز، پمپهای تحویل انسولین حلقه بسته، تحویل انسولین از طریق خوراکی و پانکراس مصنوعی قابل کاشت در بدن می باشد.

سونوفورزیس به عنوان روشی فیزیکی برای ایجاد تراوایی در بافت به کمک امواج فراصوت، به منظور تحویل دارو از طریق پوست مورد استفاده قرار گرفته است. این روش از فرکانسهای پایین امواج فراصوت در محدوده ۲۰ کیلو تا ۳ مگاهرتز جهت ایجاد تراوایی در سلولها و تحویل دارو بهره برداری می نماید. بررسی های انجام شده در این راستا نشان داده است که امواج فراصوت در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز تقریباً ۱۰۰۰ برابر موثرتر از محدوده فرکانسی (۳-۱) مگاهرتز عمل می کند [۳]. مکانیسم افزایش تراوایی هنوز بطور قطعی مشخص نیست و درباره آن تنها فرضیه هایی پیشنهاد شده است [۴]. برخی تراوایی موقتی

استراتوم کورنیوم^۲ را در فرکانسهای پایین ناشی از کاویتاسیون آکوستیکی و streaming [۴] و در فرکانسهای بالا از مرتبه ۱۰ و ۱۶ مگاهرتز ناشی از گرمای موضعی دانسته اند. البته تحقیقات دیگری در فرکانسهای پایین از مرتبه ۲۰ کیلوهرتز تولید منافذ^۳ موقتی بزرگ در استراتوم کورنیوم را توسط مطالعات میکروسکپ الکترونی پوست تایید و این منافذ را راه دسترسی به عروق سطحی و در نتیجه ورود دارو به جریان خون می دانند [۴]. بدین ترتیب شاید بتوان پیش بینی نمود که ضمن تابش امواج فراصوت، انسولین در اثر پدیده پولوریزاسیون به ذرات بسیار ریز تبدیل شده و گرمای ناشی از تابش امواج نیز منافذ بسیار کوچک و برگشت پذیری را در پوست ایجاد می کند [۵]. در نتیجه ذرات بسیار ریز انسولین از طریق این منافذ از پوست عبور می نمایند.

تا کنون به منظور تحویل انسولین به بدن با استفاده از امواج فراصوتی تحقیقات معدودی انجام شده، اما آزمایشهای برون تنی^۴ و درون تنی^۵ نتایج مثبتی را در محدوده فرکانسی (۱۰۵-۲۰) کیلوهرتز نشان داده است [۱]. بسیاری از مطالعات با کمک ابزارهایی نظیر سونیکیتور^۶، حمام فراصوتی یا مبدلهای تجارتنی صورت گرفته است. با توجه به اندازه بزرگ، وزن سنگین و قابل حمل نبودن این دستگاهها، طراحی سامانه های قابل حمل و سبک بر مبنای یک روش غیر تهاجمی و بدون درد مفید بوده [۱] و جایگزینی آن با تزریقهای زیرجلدی مکرر انسولین می تواند از آلام بیماران دیابتی نوع اول بکاهد. سامانه های قابل حمل فراصوتی سونوپرپ^۷ ساخت شرکتهای خارجی که در سالهای اخیر به بازار عرضه شده، حرکتی در صدد رفع این نیاز بوده است. در این سیستم با تولید امواج فراصوتی توسط یک آرایه، انسولین درون استوانه ای به ارتعاش درآمده و پس از انتشار موجبات تراوایی پوست را

²Stratum corneum

³ Large pores

⁴ In vitro

⁵ in vivo

⁶ Sonicator

⁷ Sonoprep

¹ Lipodistrophy



شکل ۱- نمایی از مبدل پیزوالکتریک T-R-140-16B

جدول ۱- مشخصات مولد پیزوالکتریک T-R-140-16B

مشخصات مولد	استاندارد
جنس بدنه	آلومینیوم
فرکانس (کیلوهرتز)	$40 \pm 1/0$
تراز شدت صوتی (دسی بل)	> 105
بیشینه ولتاژ قابل تحمل (ولت)	۱۴۰
دمای عملیاتی (درجه سانتیگراد)	$(+ 80) - (- 40)$

نوسانگر فراصوتی مشتمل بر آرایه ۷ تایی مولدهای پیزوالکتریک، که درون یک قاب دایره‌ای (از جنس تفلون) با شعاع ۳۰ میلی‌متر قرار گرفته‌اند، می‌باشد. برای اینکه قاب حالت ثابت و پایداری داشته باشد و انسولین بتواند در فضای بین پوست و مبدلهای پیزوالکتریک طوری قرار گیرد که بیرون ریخته نشود، طراحی اتاقک انسولین نیز ضروری بود. این محفظه استوانه‌ای با ارتفاع ۳۸، قطر داخلی ۶۰ و قطر خارجی ۷۵ میلی‌متر از جنس تفلون ساخته شد. یک قاب دایره‌ای درون سیلندر انسولین واقع شده‌است. بطوریکه مجموعه قاب و سیلندر روی شکم خرگوش قرار گرفته و نواری آن را دور کمر حیوان ثابت نگه می‌دارد. تصویری از دستگاه و نوسانگر فراصوتی در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

مدار الکترونیکی دستگاه جهت تحریک و درایو کردن آرایه ۷ تایی موازی مولدها طراحی و ساخته شد. بلوک دیاگرام مدار در شکل ۳ آمده‌است. مهمترین اجزای مدار الکترونیکی شامل یک آمپلی فایر توان، شبکه تطبیق دهنده و ریزپردازنده ۸^۲ بیتی برنامه ریزی شده می‌باشد که آرایه را تحریک کرده و سبب تولید امواج فراصوتی تا بیشینه شدت ۵۰۰ میلی وات بر

فراهم می‌آورد و بدین ترتیب انسولین از طریق پوست به بافت می‌رسد [۱].

با توجه به مشکلات و محدودیتهای اقتصادی موجود در ایران و به منظور کاهش خروج ارز و دسترسی آسانتر بیماران، چنین سامانه‌ای در مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در قالب یک مدل طراحی و ساخته شد و مطالعه حاضر به منظور ارزیابی عملکرد آن در تحویل انسولین از طریق پوست انجام گردید. سامانه یاد شده امواج فراصوتی را با قله فرکانسی ۴۰ کیلوهرتز در سیکل کاری^۱ ۲۰ درصد و بیشینه شدت خروجی ۵۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع تولید می‌کند. انتخاب فرکانس ۴۰ کیلوهرتز با توجه به نتایج موثر گزارش شده توسط مطالعه موتی و همکارانش در ایجاد تراوایی در پوست با شدتهای کمتر از ۵۰۰ میلی‌وات بر سانتیمتر مربع انجام گرفته‌است [۶].

از آنجا که برای انجام تحقیقات در زمینه دیابت، حیوانات هاپیرگلاسمیک مدل مناسبی برای تجربه و آزمایش فراهم می‌آورند، این مطالعه بر روی خرگوشهای هاپیرگلاسمیک انجام شده‌است. بدیهی است تعمیم این آزمایشها به انسان نیازمند اصلاح تکنیکها و شیوه‌های بکار رفته خواهد بود [۷].

۲- مواد و روشها

مشخصات سامانه فراصوتی: سامانه فراصوتی از دو بخش اصلی نوسانگر فراصوتی (شامل مولدهای فراصوتی، قاب مجموعه و اتاقک ذخیره انسولین) و مدار الکترونیکی فعال کننده آنها تشکیل شده است. مولدهای پیزوالکتریک تجاری T-R-140-16B ساخت شرکت Alibaba از کشور چین دارای پوشش آلومینیومی و ضد آب، با فرکانس تشدید ۴۰ کیلوهرتز در ساختار آرایه‌ای که در این نوشتار "نوسانگر فراصوتی" نامیده شده، مورد استفاده قرار گرفته‌است. نمایی از مولد در شکل ۱ و اطلاعاتی از آن در جدول ۱ آمده‌است.

² Microprocessor

¹ Duty cycle

کشور تایوان با معماری پیشرفته RISC و ضرب کننده دو سیکل ساعت با محدوده ولتاژ کاری (۵/۵-۲/۷) ولت و قابلیت سرعت حداکثر ۱۶ مگاهرتز^۱ (دستورالعمل در ثانیه ۱۰۶ × ۱۶) مورد استفاده قرار گرفت. تراشه مذکور مجهز به^۲ RTC داخلی، مولد PWM^۳ و سه تایمر/کانتر داخلی است. بهره مندی از ریزپردازنده مذکور، رابط کاربر قوی و امکان اجرای الگوریتم های پیشرفته جهت افزایش پایداری و خودآزمون^۴ را به ارمغان آورده است. در عین حال انعطاف پذیری سامانه برای تغییرات آبی، امکان اتصال به کامپیوتر، انجام مطالعات آماری پیشرفته وجود دارد.

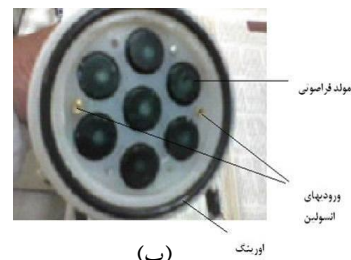
مدلهای حیوانی و گروههای آزمایش: این مطالعه بر روی خرگوشهای سفید نیوزیلندی ۱۶ تا ۲۴ هفته ای نر و ماده با وزن (۲/۹-۱/۶) کیلوگرم تحت تغذیه با غذای مکمل انجام گردید. پس از یک هفته نگهداری خرگوشها در قفسهای مخصوص در شرایط استاندارد و تطبیق شرایط فیزیولوژیک حیوانات با محیط به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت ناشتا نگهداری شدند (فقط آب در اختیار خرگوش بوده است). سپس سطح گلوکز خون آنها تعیین گردید. به منظور هایپرگلاسمیک نمودن پس از بیهوشی حیوان ۱۲۵ mg/kg آلوکسان مونوهیدرات^۵ از طریق رگ حاشیه ای گوش تزریق گردید [۸، ۹ و ۱۰]. جهت بیهوشی دادن به حیوان ۳۰ mg/kg کتامین هیدروکلراید^۶ و ۱۰ mg/kg کلروپرومازین^۷ بصورت عضلانی به حیوان تزریق شد. پس از تزریق آلوکسان مونوهیدرات حیوان به مدت ۴۸ ساعت تحت تغذیه غذای مکمل، آب، ۳۰۰ سی سی سرم دکستروز ۵٪ و ۲۵ گرم گلوکز قرار می گرفت.

بعد از ۶ ساعت ناشتایی مجدد سطح گلوکز خون حیوان اندازه گیری شد. اگر سطح گلوکز خون خرگوش بالاتر از

سانتیمتر مربع، قله فرکانسی ۴۰ کیلوهرتز و سیکل کاری ۲۰ و ۵۰ درصد می گردد. عناصر اصلی در شبکه تطبیق دهنده شامل ثانویه چک، سلف و ترنسدیوسر بوده و از اثرات مقاومتی آنها صرف نظر گردیده است.

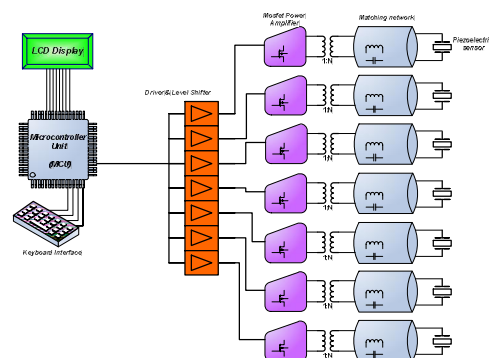


(الف)



(ب)

شکل ۲- الف) نمای از دستگاه فراصوتی تحویل داروی مورد استفاده در این تحقیق. ب) آرایه نوسانگر فراصوتی.



شکل ۳- بلوک دیاگرام مدار الکترونیکی سامانه فراصوتی مورد استفاده در این تحقیق

این شبکه به گونه ای طراحی شد که در فرکانس ۴۰ کیلوهرتز تطبیق امپدانس را انجام داده و انتقال توان بیشینه به ترنسدیوسرها را میسر سازد. همچنین ریزپردازنده ATmega 8535 محصول کمپانی ATMEL ساخت

¹ Million instruction per second

² Real time clock

³ Pulse width modulation

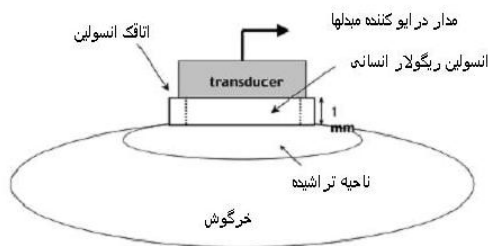
⁴ Self test

^۵ Alloxan Monohydrate (تولیدی شرکت سیگما آلدیج در کشور آمریکا)

^۶ Ketamine Hydrochloride (تولیدی شرکت روتکس مدیکا در کشور آلمان)

^۷ Chlorpromazine (تولیدی شرکت تهران شیمی)

خون به آزمایشگاه هورمون شناسی بیمارستان قائم (عج) تعیین می‌گردید.



شکل ۴- نمای از انجام آزمایشات بر روی خرگوش. فاصله بین مولدها و پوست یک میلی‌متر و فضای بین مولدها و پوست با ۳ میلی-لیتر انسولین یا نرمال سالین پر می‌شود

همچنین بمنظور بررسی ایمنی^۴ روش، پس از اتوپسی، نمونه‌ای از پوست ناحیه تابش دیده از روی شکم خرگوشها در گروههای مختلف جدا شده و در فرمل ۱۰٪ به آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان قائم (عج) ارسال گردید تا از نظر بافت شناسی مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.

ابتدا یک مطالعه مقدماتی روی ۶ خرگوش در گروههای کنترل اصلی و تابش ۱۰ دقیقه‌ای در حضور انسولین انجام شد و در دقیقه صفر و ۹۰ از حیوانات خونگیری و تغییرات سطح گلوکز خون و انسولین سرم تعیین گردید. سپس حجم نمونه در هر گروه با استفاده از فرمول مقایسه میانگین‌ها در دو گروه محاسبه شد. بر اساس نتایج این محاسبات حجم نمونه ۵ حیوان در هر گروه تعیین گردید که برای دقت بیشتر حجم نمونه به ۷ حیوان در هر گروه افزایش داده شد.

پس از اندازه گیری سطح گلوکز خون و انسولین سرم، میزان تغییرات آنها در هر نمونه از تفاضل مقادیر بدست آمده در زمان صفر از نتایج نمونه مشابه مربوط به زمانهای بعدی تعیین گردید. همچنین نسبت گلوکز خون به انسولین سرم به ازای هر نمونه محاسبه و مقادیر بدست‌آمده نسبت به کسر مذکور در زمان صفر نسبی گردید تا حتی‌الامکان تاثیر اختلاف اولیه موجود در نسبت مذکور در حیوانات

۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر بود، حیوان در یکی از گروههای آزمایشی قرار می‌گرفت [۱۱]. بدین ترتیب ۳۵ حیوان پس از هایپرگلاسمیک شدن به صورت تصادفی در ۵ گروه ۷ تایی وارد مطالعه شدند. گروه ۱ بدون درمان (گروه کنترل)، گروه ۲ با حضور انسولین بدون تابش امواج به مدت ۲۰ دقیقه (گروه شم)، گروه ۳ با تابش فراصوت از روی سرم فیزیولوژی به مدت ۲۰ دقیقه و گروههای ۴ و ۵ به ترتیب با ۱۰ و ۲۰ دقیقه تابش امواج فراصوت از روی انسولین موجود در محفظه نوسانگر در نظر گرفته شدند. در کلیه آزمایشات میانگین فضایی - میانگین زمانی شدت امواج فراصوت مورد استفاده ۳۹۲ میلی‌وات بر سانتی-مترمربع و سیکل کاری ۲۰ درصد تعیین گردید.

انجام آزمایشات حیوانی: قبل از اعمال امواج فراصوتی، هنگامی که موهای ناحیه شکم و ران خرگوش با کمک ماشین تراش برقی موزر^۱ تراشیده و تحت بیهوشی قرار می‌گرفت، از رگ فمور حیوان ۰/۸ میلی‌لیتر خونگیری و سطوح گلوکز خون و انسولین سرم آن تعیین و بعنوان مقادیر مرجع در زمان صفر در نظر گرفته می‌شد. سپس محفظه (اتاقت) انسولین را بر روی پوست شکم خرگوش قرار داده، از حفره موجود در قاب آرایه‌ها و اتاقت انسولین ۳ میلی‌لیتر انسولین ریگولار انسانی^۲ یا فیزیولوژی به درون محفظه ریخته می‌شد و به مدت ۱۰ یا ۲۰ دقیقه، قاب و اتاقت بر روی بدن حیوان نگهداشته شده و مولدها فعال می‌گردید (شکل ۴). از ابتدای تابش فراصوت، در زمانهای صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه خون گیریهای پی در پی از خرگوش بعمل می‌آمد. سطح گلوکز خون بلافاصله توسط گلوکومتر (مدل اکیوچک اکتیو ساخت شرکت روش^۳) [۱۲] و سطح انسولین سرم به روش رادیوایمنواسی، پس از انتقال سرم

^۱ ساخت کشور آلمان
^۲ Human Insulin Regular (ساخت شرکت داروسازی اکسیر در تهران)
^۳ ACCU-CHEKTM Instant () Diagnostics Co., Indianapolis, IN Roche

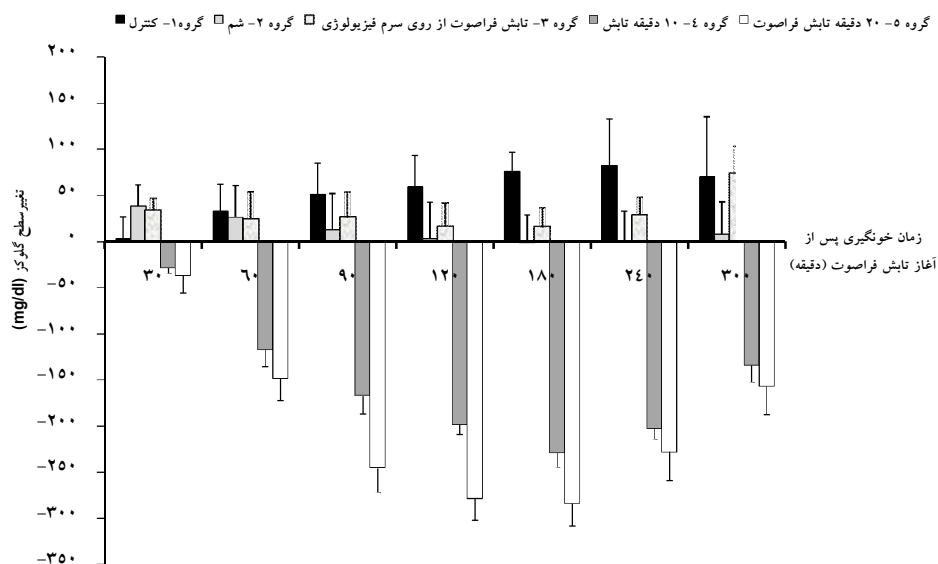
⁴ Safety

با گروههای کنترل معنی دار بوده است ($p \leq 0/037$). تغییرات سطح گلوکز خون از دقیقه ۹۰ و تغییرات سطح انسولین سرم خون از دقیقه ۶۰ در مقایسه با گروه کنترل اصلی معنی دار ثبت شده است. این تفاوت معنی دار در مورد تغییرات انسولین در گروه ۴ تا دقیقه ۹۰ ($p \leq 0/004$) و در گروه ۵ تا دقیقه ۱۸۰ ($p \leq 0/048$)، حفظ و تغییرات سطح گلوکز خون در هر دو گروه تا دقیقه ۳۰۰ معنی دار مانده است ($p \leq 0/004$). مقایسه گروههای ۴ و ۵ با گروه ۲ (شم) نشانگر تفاوت معنی دار از دقیقه ۳۰ تا ۳۰۰ در تغییرات سطح گلوکز خون بین گروه ۲ و ۴ ($p \leq 0/005$) و گروه ۲ با ۵ ($p \leq 0/004$) بوده است. همچنین تفاوت معنی دار در تغییرات انسولین بین گروه ۲ و ۴ تا دقیقه ۹۰ ($p \leq 0/004$) و بین گروه ۲ و ۵ تا دقیقه ۱۸۰ ($p \leq 0/026$)، حفظ شده است.

مختلف که می توانسته ناشی از تفاوت اثر تخریبی متفاوت آلوکسان مونوهیدرات بر پانکراس آنان بوده باشد، حذف گردد. سپس داده ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بدین منظور ابتدا آزمون نرمالیتی روی داده ها انجام شد و با توجه به نرمال نبودن توزیع داده ها مقایسه آنها توسط آزمون ناپارامتریک "من-ویتنی" در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت پذیرفت.

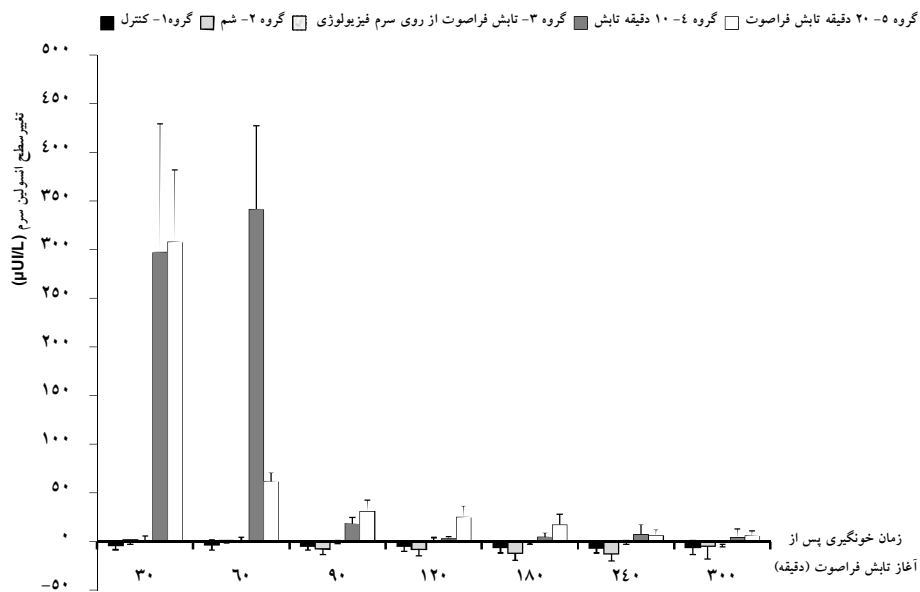
۳- نتایج

در اشکال ۵ و ۶ میانگین تغییرات سطح گلوکز خون و تغییرات سطح انسولین سرم خون گروههای مختلف نشان داده شده است. نتایج نشان می دهند که در گروههای ۱، ۲ و ۳ پس از ۱۸۰ دقیقه، تغییرات قابل ملاحظه ای در سطح گلوکز خون روی نداده است. در حالیکه برای گروههای اصلی درمانی (۴ و ۵)، این تغییرات قابل توجه و در مقایسه

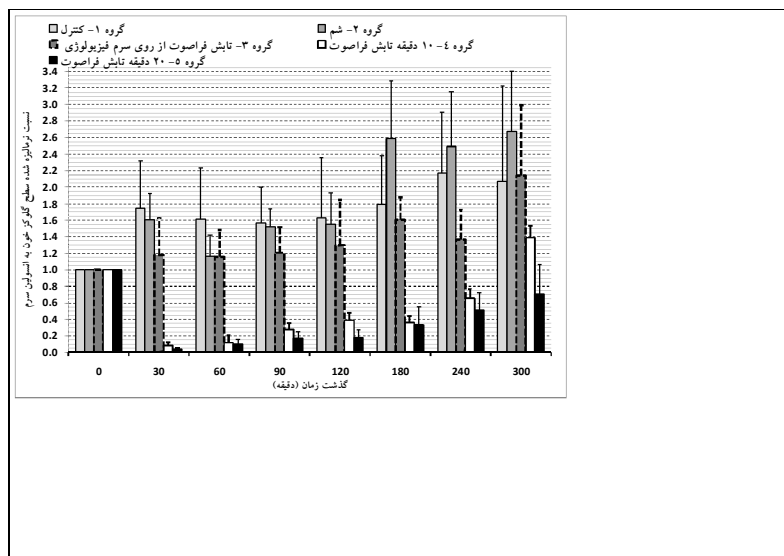


شکل ۵- تغییرات سطح گلوکز خون در گروهها و زمانهای مختلف. زمان آغاز تابش امواج فراصوت زمان صفر در نظر گرفته شده است. داده ها بیانگر میانگین تغییرات سطح گلوکز خون \pm خطای استاندارد روی میانگین تغییرات گلوکز ۷ خرگوش می باشد.

تحویل انسولین از طریق پوست



شکل ۶- تغییرات سطح انسولین در گروهها و زمانهای مختلف. زمان آغاز تابش امواج فراصوت زمان صفر در نظر گرفته شده است. داده ها بیانگر میانگین تغییرات سطح انسولین سرم ± خطای استاندارد روی میانگین تغییرات انسولین ۷ خرگوش می باشد.



شکل ۷- نسبت نرمالیزه شده تغییر سطح گلوکز خون به انسولین سرم در گروهها و زمانهای مختلف. نرمالیزاسیون بر اساس نسبت تغییر سطح گلوکز خون به تغییر انسولین سرم در لحظه صفر در هر گروه انجام و زمان آغاز تابش امواج فراصوت، زمان صفر در نظر گرفته شده است. هر گروه شامل ۷ خرگوش بوده است.

۴- بحث

در تحقیقات انجام شده پروتئین‌هایی مانند انسولین، ایتروفرون گاما و اریتروپوئیتین با کمک امواج فراصوت و از طریق پوست به بدن تحویل شده است [۱]. دستگاه‌های استفاده شده در این تحقیقات بزرگ، سنگین (کاوشگری با وزن تقریبی یک کیلوگرم و وزن دستگاه ۹۰ کیلوگرم) و گران قیمت می‌باشند. این مطالعه بر اساس تحقیقاتی که تا کنون در زمینه ساخت و بهره‌گیری از سامانه‌ای ارزاتر و کوچک و قابل حمل در جهان صورت گرفته است، پایه ریزی شد [۱، ۳، ۱۲-۱۹]. با این تفاوت که در اغلب تحقیقات انجام شده، تنها سطح گلوکز خون در حیوانات غیرهایپرگلیسمیک یا هایپرگلیسمیک موقت مورد ارزیابی قرار گرفته است اما در این تحقیق علاوه بر انجام مطالعه بر روی خرگوش‌های هایپرگلیسمیک، بررسی سطح انسولین نیز صورت گرفته و آرایه مولدهای فراصوتی از مدل‌های ارزان قیمت موجود در بازارهای جهانی استفاده شده است.

بیشینه سطح انسولین پس از ۶۰ دقیقه در تابش ۱۰ دقیقه‌ای فراصوت و پس از ۳۰ دقیقه در تابش ۲۰ دقیقه‌ای مشاهده شد، در حالیکه رسیدن به کمینه سطح گلوکز تا دقیقه‌ی ۱۸۰، تاخیر داشته است. این مشاهده می‌تواند مربوط به آن باشد که انسولین یک ملکول هگزومر است و برای اینکه در بدن جذب گردد و تاثیر خود را بر کاهش سطح گلوکز بگذارد، باید تبدیل به یک ملکول مونومر گردد. بهمین علت مدت زمانی لازم است تا این تبدیل در بدن صورت گیرد. این زمان برای بدن انسان حدود یک ساعت [۲۰] و برای بدن خرگوش طبق نتایج این تحقیق حدود ۲ ساعت است.

حفظ طولانی‌تر نسبت نرمالیزه‌شده تغییر سطح گلوکز خون به انسولین سرم روی مفادیر کمتر از یک در گروه ۵ (با میانگین ۰/۲۹) در مقایسه با گروه ۴ (با میانگین ۰/۴۷) نیز بیانگر تداوم بیشتر اثر کنترل کننده انسولین در مهار سطح گلوکز در تابش ۲۰ دقیقه‌ای در مقایسه با تابش ۱۰ دقیقه‌ای می‌باشد. بنظر می‌رسد معرفی نسبت اخیر بتواند به عنوان

تحلیل آماری داده‌ها بین گروه ۳ با گروه‌های ۴ و ۵ نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار از دقیقه‌ی ۳۰ تا ۳۰۰ در تغییرات سطح گلوکز خون بین گروه ۳ و ۴ ($p \leq 0/01$) و گروه ۳ با ۵ ($p \leq 0/026$)، همچنین حفظ تفاوت معنی‌دار در تغییرات انسولین بین گروه ۳ با گروه‌های ۴ و ۵ تا دقیقه‌ی ۹۰ ($0/007 < p \leq$) می‌باشد. این نتایج در حالی بدست آمده که بین گروه‌های ۴ و ۵ تغییرات سطح گلوکز خون از دقیقه‌ی ۶۰ تا ۱۲۰ و تغییرات سطح انسولین سرم خون در دقیقه‌ی ۶۰ معنی‌دار ثبت شده است ($p \leq 0/038$).

در گروه ۴ (گروه دریافت کننده انسولین با تابش ۱۰ دقیقه‌ای فراصوت) میانگین سطح انسولین پس از ۶۰ دقیقه $341/9 \mu U/L$ افزایش و میانگین سطح گلوکز تا دقیقه‌ی ۱۸۰ $229/0 \text{ mg/dl}$ کاهش داشته است. همچنین در گروه ۵ (گروه دریافت کننده انسولین با تابش ۲۰ دقیقه‌ای فراصوت) میانگین سطح انسولین در دقیقه‌ی ۳۰ $30 \mu U/L$ افزایش و میانگین سطح گلوکز در دقیقه‌ی ۱۸۰ $283/9 \text{ mg/dl}$ کاهش نشان داده است.

نسبت نرمالیزه شده تغییر سطح گلوکز خون به انسولین سرم در گروه‌های مختلف که در شکل ۷ آمده است، کسر مذکور برای گروه‌های ۱، ۲ و ۳ همواره بیشتر از یک ولی در گروه ۴ تا دقیقه ۲۴۰ و در گروه ۵ تا دقیقه ۳۰۰ مقادیر کمتر از یک را به خود اختصاص داده است.

بررسی ظاهری پوست خرگوشها در کلیه حیواناتی که در معرض تابش امواج فراصوت قرار گرفته بودند، بیانگر قرمزیهایی بسیار خفیفی بود که بر روی پوست ایجاد و پس از گذشت چند دقیقه ناپدید می‌گردید. بر اساس یافته‌های مطالعه آسیب شناسی بر روی پوست تابش دیده حیوانات با تابش ۱۰ دقیقه‌ای فراصوت، اتساع بسیار خفیف عروق خونی تایید شده است، در حالی که در نمونه‌هایی که تحت تابش ۲۰ دقیقه‌ای فراصوت قرار گرفته بودند، اتساع عروق خونی گزارش شده است.

تحویل انسولین از طریق پوست

با رسم منحنی مربوطه (شکل ۸)، در تابش ۲۰ دقیقه ای مقدار انسولین تحویل شده به بافت با توجه به معادله منطبق بر داده های نمودار در حدود ۴/۶ میلی لیتر بدست آمد:

$$V = 0.0033t^2 + 0.1667t, \quad R^2=1 \quad (1)$$

V و t به ترتیب بیانگر حجم انسولین تحویلی به میلی لیتر و زمان فعال بودن سستم بر حسب دقیقه می باشد.

بدین ترتیب با توجه به معادله (۱) تقریباً پس از فعال بودن دستگاه به مدت ۱۴ دقیقه تمام حجم انسولین درون محفظه (۳ میلی لیتر) تحویل بافت می گردد و در زمان باقیمانده امواج فراصوت به پوستی تابش می شود که تراوا بوده است. با توجه به گزارشات موجود [۳] در اثر تابش امواج فراصوت به پوست تراوا شده احتمال برگشت انسولین به سطح پوست وجود دارد که می تواند دلیلی برای نرسیدن انسولین به قله در نمودارهای مربوط به این گروه باشد.

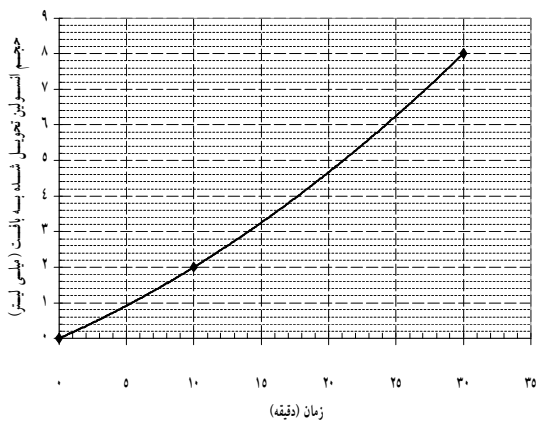
فرضیه دوم مبنی بر آنست که زمان دقیق ورود انسولین به درون خون مشخص نیست؛ در نتیجه ممکن است در تابش ۱۰ دقیقه ای امواج فراصوت، زمان لازم برای رسیدن به قله انسولین در سرم خون، ۶۰ دقیقه باشد؛ اما در تابش ۲۰ دقیقه ای امواج فراصوت، زمان مورد نیاز برای رسیدن به اوج غلظت انسولین در سرم خون بین ۳۰ تا ۶۰ دقیقه باشد. از آنجا که در این زمان سطح گلوکز و سطح انسولین مشخص نشده است، نمی توان در این باره اظهار نظر نمود.

از طرف دیگر در تجویز انسولین برای اینکه قله انسولین نداشته باشیم، روش تزریق انفوزیون (داخل سرمی) سبب می شود سطح انسولین با شیبی ملایم کاهش یابد اما در تزریق سریع زیر پوستی همان حجم از انسولین در یک تزریق وارد و این بیشینه ظاهر می شود [۲۱]. شاید این سامانه نیز به همین صورت عمل کند، یعنی در تابش امواج فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه، انسولین زیادی در زمان کمی وارد می شود (بیشتر از ۲ میلی لیتر) در نتیجه همه انسولین در یک زمان جذب نشده و پس از ۶۰ دقیقه بیشینه ای برای سطح انسولین به چشم می خورد. در تابش امواج فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه، انسولین به آرامی (۳ میلی لیتر

یک شاخص مناسب مقایسه ای در تحلیل چنین مطالعاتی مدنظر قرار گیرد و محقق را در حذف اثر اولیه سطح گلوکز و انسولین حیوانات مختلف که می تواند ناشی از تفاوت در مشخصات فیزیکی و تخریب ناکامل پانکراس باشد، یاری دهد.

با توجه به نمودارهای تغییرات سطح گلوکز، بیشترین کاهش مربوط به تابش امواج فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه بوده است، در حالی که نمودارهای تغییرات سطح انسولین نشان داده اند که تابش امواج فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه، دارای قله ای بزرگتر برای ورود انسولین به داخل بافت و در نتیجه خون می باشد و افزایش بیشتری را در سطح انسولین نیز نشان داده است. در زمینه علت مشاهده اخیر دو فرضیه قابل طرح بنظر می رسد:

فرضیه اول کافی نبودن حجم انسولین طی تابش ۲۰ دقیقه ای امواج فراصوت است. احتمالاً اگر حجم بیشتری از انسولین درون محفظه وجود می داشت، شاید تغییراتی مشابه یا حتی بیشتر از آنچه که در نمودارهای مربوط به تابش امواج فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه ثبت شده است، مشاهده می شد. در پاسخ به این سوال بررسی دیگری صورت گرفت و معلوم شد که در تابش ۱۰ دقیقه ای مقدار ۲ میلی لیتر و در تابش ۳۰ دقیقه ای تقریباً ۸ میلی-لیتر انسولین می تواند وارد بدن شود.



شکل ۸- حجم انسولین تحویلی به بافت بر حسب زمان فعال بودن دستگاه

پس از تابش ۲۰ دقیقه‌ای، ۲۸۳/۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر کاهش در دقیقه‌ی ۱۸۰ بوده‌است. (۲۴۵ میلی‌گرم بر دسی-لیتر کاهش در دقیقه‌ی ۹۰ در تابش ۲۰ دقیقه‌ای).
مطالعه دیگر لی و همکارانش در ۲۰۰۴ پس از ۱۰ دقیقه تابش فراصوت در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و شدت ۱۰۰ میلی‌وات بر سانتیمتر مربع مویید کاهش تقریبی گلوکز بترتیب به میزان ۲۲۴/۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در دقیقه‌ی ۹۰ بوده [۱۲]، که تغییر قابل مقایسه با آن در مطالعه حاضر پس از تابش ۱۰ دقیقه‌ای، ۲۲۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در دقیقه‌ی ۱۸۰ ثبت شده‌است.

انسولین در زمان ۲۰ دقیقه) وارد بافت شده و به آرامی جذب می‌شود و قله ای برای سطح انسولین نیست؛ اما زمان تداوم اثر طولانی تر است. بطوریکه در زمان ۲۴۰ دقیقه سطح انسولین گروه‌های ۴ و ۵ با هم برابر می‌شود. مطالعه لی و همکارانش که با هدف طراحی یک سیستم فراصوتی قابل حمل و با وزن کم در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و شدت ۱۰۰ میلی‌وات بر سانتیمتر مربع در سال ۲۰۰۳ انجام شد، ۲۰ دقیقه تابش فراصوت موجب کاهش تقریبی گلوکز به میزان ۲۴۹/۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در دقیقه‌ی ۹۰ گردید [۱] که تغییر قابل مقایسه با آن در مطالعه حاضر

جدول ۲- شرایط و نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه

مرجع	مطالعه حاضر			
	۱	۱۳	۱۲	۱۶
شدت خروجی (W/cm ²)	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۳۹۲
فرکانس (kHz)	۲۰	۲۰	۲۰	۴۰
سیکل کاری	نا مشخص	نا مشخص	نا مشخص	۲۰٪
زمانهای تابش (دقیقه)	۲۰	۶۰	۵	۱۰
بیشینه کاهش در سطح گلوکز خون (mg/dl)	۲۴۹/۳	۲۰۸/۱	۲۳۳/۳	۲۲۹/۰
بیشینه افزایش در سطح انسولین سرم (μUI/L)	نا مشخص	نا مشخص	نا مشخص	۳۰۷/۹
زمان ثبت قله سطح انسولین (دقیقه)	نا مشخص	نا مشخص	نا مشخص	۳۰
زمان ثبت پیک کاهش سطح گلوکز (دقیقه)	۹۰	۹۰	۹۰	۱۸۰
زمان پایش تغییرات سطح گلوکز و انسولین (ساعت)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۵
حجم انسولین در محفظه دستگاه (میلی لیتر)	نا مشخص	نا مشخص	نا مشخص	۳
حیوان	موشهای هایپر گلا یسمیک	خرگوشهای هایپر گلا یسمیک	موشهای هایپر گلا یسمیک	خوک نرمال (غیر هایپر گلا یسمیک)

پیش‌بینی می‌شود با توجه به کیفیت کاهش سطح گلوکز خون، زمان تابش امواج فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه موثرتر باشد؛ چون سطح گلوکز را به مقدار بیشتری نسبت به تابش ۱۰ دقیقه‌ای کاهش داده است، اما با توجه به اینکه جذب سریع انسولین و رسیدن به یک قله در زمان کوتاه و کاهش سریع دوباره آن طرح مناسبی برای کنترل سطح گلوکز خون بعد از خوردن غذا فراهم می‌آورد، در نتیجه تابش با زمان ۱۰ دقیقه مناسبتر بنظر می‌رسد. از طرف دیگر در تابش ۱۰ دقیقه‌ای سطح انسولین سریعتر تا حد بیشینه خود افزایش و در مدت کوتاهی بسرعت کاهش یافته است، در حالیکه در تابش ۲۰ دقیقه‌ای افزایش سریع مشابهی مشاهده شده، اما کاهش سریع بعد از آن دیده نمی‌شود. این امر می‌تواند در تخمین فاصله زمانی مناسب بین خوردن غذا و استفاده از دستگاه تعیین کننده باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت مالی تحقیق، ریاست و مدیریت محترم پژوهشکده بوعلی بخاطر هماهنگیهای اداری، کارکنان آزمایشگاههای رادیوایمنواسی بیمارستان قائم (عج) و آسیب شناسی بیمارستان امام رضا (ع)، آقایان دکتر امیر علی آریان جهت راهنماییهای ایشان در زمینه کار با حیوانات و علی بخشی کاخکی که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

لازم به ذکر است که مطالعات مذکور بر روی موشهایی انجام شده که بطور موقتی (به مدت ۱۲ ساعت) توسط زایلازین هایپرگلاسیمیک شده بودند و تغییرات سطح انسولین آنها نیز تعیین نگردیده است، ضمناً حجم انسولین وارد شده به بدن حیوان نامعلوم است. بدین ترتیب امکان تحلیل و مقایسه دقیق‌تر نتایج وجود ندارد [۱۲، ۱]. از طرفی فرکانس و شدت امواج فراصوت و نیز سطح پوست مورد تابش مشابه نبوده است. همچنین تداوم خون‌گیری برای دو مطالعه فوق سه ساعت بوده در حالیکه در این مطالعه ۵ ساعت می‌باشد. در عین حال در جدول ۲ مقایسه‌ای میان شرایط و نتایج مطالعات مشابه و مطالعه حاضر صورت گرفته است. عدم ایجاد صدمه و آسیب بافتی ناشی از تابش امواج فراصوتی به پوست در این مطالعه با مشاهدات بروس و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در محدوده فرکانسی ۳۰-۲۰ کیلوهرتز مطابقت داشته است [۱۸].

۴- نتیجه گیری

زمان اوج اثر سامانه فراصوتی مورد استفاده در این تحقیق به منظور کاهش سطح گلوکز خون، ۱۸۰ دقیقه پس از تابش دهی ۱۰ و ۲۰ دقیقه‌ای پیش‌بینی می‌شود. همچنین سطح انسولین، ۶۰ دقیقه پس از آغاز تابش ۱۰ دقیقه‌ای و ۳۰ دقیقه پس از آغاز تابش ۲۰ دقیقه‌ای امواج فراصوت به بیشینه خود رسیده است.

منابع

1. Smith NB, Lee S, SHUNG KK. Ultrasound mediated transdermal in vivo transport of insulin with low profile cymbal arrays. J Ultrasound in Med. & Biol. 2003 Aug; 29(8):1205-10.
2. Browner and Sodars, Nursing of diabetes, translation by Pouran Sami, Tehran, Boshra, 2001. [In Persian]
3. Smith NB, Lee S, Maione E, Roy RB, McElligott S, Shung KK. Ultrasound mediated transdermal transport of insulin through in vitro human skin using novel transducer designs. Ultrasound in Med. & Biol., 2002 Sep; 26(3): 111-7.
4. Kimmel E., Krasovitski B. On therapeutic use of microbubbles generated by laser-heated nanoparticles. Progress in Biophysics and Molecular Biology 93 (2007) 111-129.
5. Azizi ZA, Moghad G. Medical physics of light, eye sound and ultrasound, Tehran, Chehr, 1985. [In Persian]

6. Comparison of the effect of ultrasound and of chemical enhancers on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro-40khz; D. Monti , R. Giannelli, P. Chetoni, S. Burgalassi. *International Journal of Pharmaceutics* :229 (2001) 131-137.
7. Small-Wood M., Familiarity with diabet, translation by M H Khazaii, Mashhad, Mashhad university of medical sciences, 1996. [In Persian]
8. Nammi S, Boini MK, Lodagala SD, Behara R. The juice of fresh leaves of catharanthus roseus linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. *BMC Complement Altern Med*. 2003 Sep 2; 3:4. Epub 2003 Sep 2.
9. Jorns A, Munday R, Tiedge M, Lenzen S. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol*. 1997 Nov; 155(2):283-93.
10. Kang F, Singh J. Preparation, in vitro release, in vivo absorption and biocompatibility studies of insulin-loaded microspheres in rabbits. *PharmSciTech*, 2005, 6(3): 487-494.
11. Eluk U, Yeuun E, Odabapoulu F. Effect of experimental diabetes mellitus on plasma lactate dehydrogenase and glutamic oxaloacetic transaminase levels in rabbits. *Turk J Biol*, 2002, 26(3): 151-4.
12. Lee S, Newnham RE, Smith NB. Short ultrasound exposure times for noninvasive insulin delivery in rats using the lightweight cymbal array. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2004 Feb, 51(2): 176-180.
13. Lee S, Snyder B, Newnham RE, Smith NB. Noninvasive ultrasonic transdermal insulin delivery in rabbits using the light-weight cymbal array. *Diabetes Technol Ther*, 2004, 6(6): 808-815.
14. Boucaud A, Tessier L, Machet L, Vaillant L, Patat F. Transdermal delivery of insulin using low frequency ultrasound. *J Control Release*. 2002 May 17; 81(1-2):113-9.
15. Maione E, Shung KK, Meyer RJ, Jack J, Hughes W, Newnham R.E, et al. Transducer design for a portable ultrasound enhanced transdermal drug-delivery system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2002 Oct; 49(10):1430-6.
16. Scott K, My-Quyen T, Kost J. Transdermal insulin delivery in swine after pre-treatment with ultrasound using sonoprep. Available at <http://www.sontra.com>. Accessed Jun 12, 2005.
17. Tachibana K, Tachibana S. The Use of Ultrasound for Drug Delivery. *J Echocardiography*. 2001 May; 18(4): 323-8.
18. Redding BK, Roy RB, Yom M, Stankus A. Animal trials using a novel ultrasonically powered insulin transdermal drug delivery system. Available at <http://www.encsys.com/articles/AnimalTrialPaper>. Accessed Nov 30, 2003.
19. Redding BK, Roy RB, Yom M, Stankus A. Novel ultrasonically powered insulin transdermal drug delivery system preliminary human pilot trial. Available at <http://www.encsys.com/articles/HumanPilotTrial1>. Accessed Nov 29, 2003.
20. Katrong BJ, Basic and clinical pharmacology, translated by Ghotbi N., Esfandiary E., Tehran, Arjmand, 1994, Vol 2. [In Persian]
21. Braunwald.E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's Principales of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005.