

# بررسی بقاء سلولی و آپوپتوز در سلول‌های ملانومای انسانی در حضور تابش لیزر کم توان و ترکیب فنولی گالیک اسید

## خلاصه

**مقدمه:** ملانوما نوعی از سرطان پوست است که اغلب مقاوم به درمان می‌باشد و حالتی تهاجمی با متاستاز بالا دارد. امروزه، برای درمان سرطان ملانوما از روش‌های مختلفی از جمله جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی استفاده می‌شود که اغلب با عوارض جانبی همراه هستند. یکی از راه‌های درمان سرطان‌های مختلف، استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی است. در مطالعه حاضر اثر ترکیب گیاهی گالیک‌اسید به‌تنهایی و همراه با لیزر کم توان بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بررسی شده است.

**روش بررسی:** سلول‌های سرطانی ملانوما رده A375 در معرض تابش لیزر کم توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی  $3 \text{ J/cm}^2$  به مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفتند و سپس با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید (صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. همچنین اثر تابش میزان انرژی‌های مختلف لیزر کم توان (۱، ۲، ۳ و  $6 \text{ J/cm}^2$ ) بر سلول‌های در معرض غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید (صفر و  $\text{IC}_{50}$ ) بررسی شد. اثر لیزر کم توان و گالیک‌اسید بر بقاء سلولی با استفاده از تست MTT و وقوع آپوپتوز از طریق بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول با میکروسکوپ فلورسانس (رنگ‌آمیزی دوگانه اتیديوم بروماید و آکریدین اورنج) و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT نشان داد که پیش‌تیمار با لیزر کم توان و سپس تیمار با گالیک اسید بقاء سلول‌های سرطانی ملانوما را نسبت به گروه تاریکی و تیمار با گالیک‌اسید بیشتر کاهش می‌دهد. در غلظت صفر گالیک‌اسید، افزایش میزان انرژی تابش مرگ سلولی را القاء نمی‌کند و تنها بقای سلولی در دوز انرژی تابش بالا یعنی  $6 \text{ J/cm}^2$ ، مقدار کمی نسبت به حالت کنترل کاهش داشت. در غلظت  $\text{IC}_{50}$  از گالیک‌اسید، افزایش میزان انرژی تابش موجب کاهش قابل توجه بقای سلولی نسبت به حالت کنترل می‌شود. بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌ها و بررسی وقوع آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسانس و فلوسایتومتری، نتایج حاصل از تست MTT را تأیید کردند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که لیزر کم توان به‌تنهایی باعث مرگ و میر سلول‌های سرطانی ملانوما رده A375 نمی‌شود، اما استفاده از لیزر کم توان به‌همراه گالیک‌اسید باعث کاهش بیشتر بقای سلول‌های سرطانی نسبت به حالت استفاده از گالیک‌اسید به‌تنهایی می‌شود. بنابراین استفاده از درمان ترکیبی لیزر کم توان و گالیک‌اسید، موجب کاهش دوز مؤثر اثرات ضدسرطانی گالیک‌اسید می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های سرطانی ملانوما، گالیک‌اسید، لیزر کم توان، آپوپتوز

زهرا حسینمردی<sup>۱</sup>  
زهرا کیان‌مهر<sup>۲</sup>  
خاطره خرسندی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳. استادیار بیوشیمی، گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: زهرا کیان‌مهر، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۴۳۶۵  
پست الکترونیک: z.kianmehr@ut.ac.ir  
نویسنده مسئول: خاطره خرسندی، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۴۳۶۵  
پست الکترونیک: khorsandi.kh@ut.ac.ir

## مقدمه

سرطان یک بیماری مهلك با آمار مرگ و میر بالا است که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی را به دنبال دارد. سرطان در واقع رشد و تکثیر کنترل نشده سلول‌های غیر طبیعی در بدن می‌باشد. عوامل ایجادکننده سرطان را می‌توان به دو دسته عوامل مرتبط با شیوه زندگی مانند سیگار، الکل و تغذیه نامناسب و عوامل محیطی مانند مصرف تنباکو، الکل، تغذیه نامناسب و قرار گرفتن در معرض تابش اشعه تقسیم کرد. این عوامل ممکن است منجر به تغییرات ژنتیکی و بر هم زدن تعادل و توازن در روند عادی رشد سلول‌ها شوند. درمان و پیشگیری از سرطان یک چالش بزرگ در سراسر دنیا به‌شمار می‌رود [۱].

سرطان پوست بیماری است که در آن سلول‌های سرطانی در بافت پوست تشکیل می‌شوند. سرطان سلول پایه‌ای، کارسینوم سلول-سنگفرشی و سرطان سلول‌های ملانین دار (ملانوما) سه نوع عمده سرطان پوست به‌شمار می‌روند. دو مورد اول به‌همراه تعدادی از سرطانات پوستی تحت عنوان سرطان پوستی غیرملانومی شناخته می‌شوند. ملانوما اغلب مقاوم به درمان می‌باشند و حالتی تهاجمی با متاستاز بالا دارند و در واقع تهاجمی‌ترین نوع سرطان پوستی هستند [۲]. ملانوما در زنان در مقایسه با مردان بیشتر است و اغلب در مردان در قسمت تنه و در زنان در اندام تحتانی (پاها) بروز می‌یابد. از نشانه‌های بالینی ملانوم می‌توان به داشتن شکل نامتقارن و تغییر رنگ قرمز به رنگ مایل به قهوه‌ای و اندازه لبه‌های نامنظم اشاره کرد که با خارش و خونریزی نیز همراه است. زمانی که سلول‌های سرطانی ملانوما به تومورهای بدخیم تبدیل می‌شوند، اغلب به درمان مقاوم می‌شوند و به قسمت‌های عمیق پوست و همچنین اندام‌های داخلی مانند طحال، کبد و گره‌های لنفی متاستاز می‌دهند [۳].

در حال حاضر جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از رایج‌ترین درمان‌های ملانوما هستند. اما، به دلیل عوارض جانبی بالای این درمان‌ها محققان به دنبال یافتن درمان‌های جایگزین، مکمل یا حتی ترکیبی که در عین داشتن کارایی بالا، عوارض جانبی کمتری نیز دارند، می‌باشند. از جمله این درمان‌ها می‌توان به استفاده از ترکیبات گیاهی اشاره کرد که امروزه زمینه تحقیقاتی وسیعی از جمله بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی را به‌خود اختصاص داده‌اند [۴].

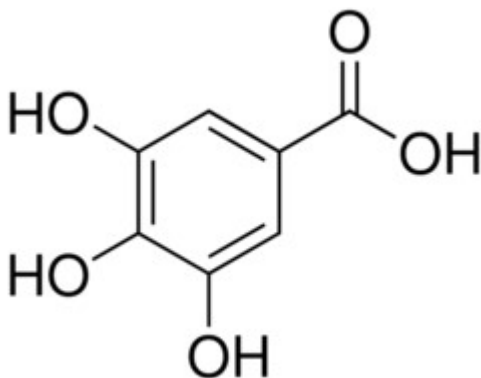
ترکیبات فنولی جزء متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و از لحاظ ساختاری حلقه آروماتیک یک یا چندحلقه‌ای واجد گروه‌های هیدروکسیل هستند. بیش از ۸۰۰۰ ترکیب فنولی تا به امروز کشف شده است. ترکیبات فنولی جدا شده از گیاهان شامل فلاونوئیدها، لیگان‌ها، تانن‌ها، گزانتونی‌ها و کومارین‌ها هستند. ترکیبات فنولی اغلب فعالیت ضدسرطانی دارند و به‌عنوان یک مبارزه‌گر با بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌باشند [۵]. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات فنولی گیاهی مانع آغاز و پیشرفت سرطان می‌شوند که به‌وسیله مدولاسیون ژن‌های تنظیم‌کننده

فرآیندهای کلیدی سلول انجام می‌گیرد [۶].

گالیک‌اسید یا ۳-۴-۵ تری‌هیدروکسی بنزوئیک‌اسید (شکل ۱) با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب مهم در برابر سرطان و انواع تومورها می‌باشد. گالیک‌اسید سمیت سلولی برای سلول‌های سرطانی و سمیت بسیار کمی برای سلول‌های طبیعی از خود نشان می‌دهد. گالیک‌اسید اثرات متنوعی را در سطوح مختلف مولکولی بر تومور دارد [۷].

لیزر کم‌توان درمانی<sup>۱</sup> یکی از روش‌های درمانی نوین، ایمن و چندمنظوره با طیف وسیعی از اثرات درمانی شامل تسریع روند بهبود زخم و ترمیم آسیب بافتی، کاهش التهاب و تسکین درد می‌باشد که به‌عنوان یک روش درمانی مستقل یا مکمل با سایر درمان‌ها قابل استفاده است. به‌طوری‌که لیزر کم‌توان موجب کاهش اثرات نامطلوب شیمی‌درمانی و بهبود قابل توجه در کیفیت زندگی حتی در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های پیشرفته شده است [۸]. این درمان بر مبنای تاباندن طیف باریکی از نور در محدوده قرمز تا مادون قرمز نزدیک (طول موج ۶۰۰-۱۱۰۰ نانومتر)، با چگالی توان (تابش) پایین (کمتر از  $100 \text{ mW/cm}^2$ ) و چگالی انرژی بین  $0.40 - 50 \text{ J/cm}^2$  می‌باشد. لیزر کم‌توان بدون ایجاد اثر گرمایی قابل توجه، از طریق جذب انتقال انرژی فوتون در غالب واکنش‌های فتوشیمیایی، اثرات درمانی خود را اعمال می‌کند. واکنش‌های اولیه لیزرهای کم‌توان در سطح سلولی بر اساس جذب انرژی نور لیزر توسط مولکول‌های زنجیره تنفسی آغاز می‌شود و سیتوکروم C-اکسیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به لیزر کم‌توان است. تابش نور لیزر کم‌توان بر روی میتوکندری‌های ایزوله شده افزایش پتانسیل الکتروشیمیایی پروتون، افزایش سنتز NADH، سنتز RNA و پروتئین، افزایش مصرف اکسیژن، افزایش پتانسیل غشای میتوکندریایی و در نهایت افزایش سنتز ATP را نشان می‌دهد [۹].

آمار روبه‌افزایش مبتلایان به سرطان به‌ویژه سرطان ملانوما و اهمیت درمان آن، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی گالیک‌اسید و وجود مطالعات اندک در رابطه با اثرات لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی،



شکل ۱: ساختار شیمیایی گالیک‌اسید

### 1. Low-Level Laser Therapy (LLLT)

ساعت پس از کشت، سلول‌ها در معرض تابش لیزر (دستگاه لیزر LX2 Thor) با طول موج ۶۶۰ نانومتر به مدت ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی  $J/cm^2$  ۳ قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با مقادیر مشخصی از گالیک‌اسید (صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مرگ‌ومیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی و درصد توان زیستی باقیمانده سلول‌ها در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد. گروه کنترل منفی به عنوان سلول‌هایی که فقط در معرض تابش لیزر کم‌توان بودند، تعریف شد.

همچنین در آزمایش دیگری در حضور غلظت صفر و غلظت IC<sub>50</sub> گالیک‌اسید (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثرات تابش لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت و با انرژی‌های تابش مختلف ( $1 J/cm^2$ ،  $30 s$ ،  $2 J/cm^2$ ،  $60 s$  و  $6 J/cm^2$ ،  $180 s$  بروی سلول‌های سرطانی انجام شد و بقای سلول‌ها به روش MTT اندازه‌گیری گردید. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید.

### بررسی توان زیستی سلول‌ها به روش MTT

به منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT<sup>۲</sup> استفاده شد. در این روش آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده با فعالیت آنزیمی خود منجر به تبدیل شدن نمک تترازولیم-MTT به بلورهای فورمازان می‌شوند. بنابراین میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول‌های زنده خواهد بود.

برای انجام تست MTT جهت بررسی سمیت تاریکی و نوری گالیک‌اسید بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها دو بار با بافر فسفات‌سالیین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از طی شدن زمان موردنظر چاهک‌ها تخلیه شدند و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. DMSO به عنوان حلال بلورهای فورمازان عمل می‌کند و باعث ایجاد رنگ بنفش با شدت‌های مختلف بسته به زنده بودن یا مردن سلول‌ها می‌شود. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزاریدر قرائت شد و درصد توان زیستی سلول‌ها در مقایسه با جذب نوری گروه کنترل منفی (سلول‌های بدون گالیک‌اسید) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده تحلیل و بر روی نمودار ترسیم شدند.

سنجش کیفی وقوع آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسانس (رنگ آمیزی دوگانه اتیدایوم بروماید و آکریدین اورنج)

ما را بر آن داشت تا در این مطالعه اثر گالیک‌اسید و تابش لیزر کم‌توان را به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر بر بقای سلولی و آپوپتوز در سلول‌های ملانومای انسانی بررسی کنیم.

## روش بررسی

### مواد و وسایل آزمایش

سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی رده A375 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. محیط کشت از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) از شرکت Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). سرم جنین گاوی (FBS)، بافر فسفات‌سالیین (PBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Gibco (Gibco BRL, USA)، گالیک‌اسید و پودر MTT از شرکت Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). اتیدایوم بروماید و آکریدین اورنج از شرکت Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) خریداری شدند. در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

### کشت سلول

سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی رده A375 در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

### بررسی اثرات گالیک‌اسید بدون تابش نور لیزر (تاریکی)

برای بررسی سمیت سلولی گالیک‌اسید بر سلول‌ها در غیاب تابش نور لیزر (سمیت تاریکی) در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی  $1 \times 10^4$  سلول سرطانی ملانومای انسانی کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub>) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از گالیک‌اسید شامل صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. میزان مرگ‌ومیر سلولی با استفاده از تست رنگ‌سنجی MTT بررسی شد و سپس غلظتی از گالیک‌اسید که موجب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی شده بود تعیین شد.

### بررسی اثرات گالیک‌اسید در حضور انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان (سمیت نوری)

جهت بررسی اثر لیزر بر سمیت سلولی ایجاد شده توسط گالیک‌اسید، ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه شده از سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی حاوی  $1 \times 10^4$  سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. ۲۴

می‌باشد [۱۰]. بنابراین با استفاده از این دو ترکیب، تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک از سلول‌های نکروتیک امکان‌پذیر خواهد بود.

به‌این‌منظور، در ابتدا سلول‌ها در حضور تابش لیزر کم‌توان به مدت ۹۰ ثانیه و با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر و سپس با غلظت‌های صفر و ۵۰ از گالیک‌اسید به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با تریپسین از کف پلیت جدا و با محلول PBS شستشو داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ اضافه گردید. به دنبال اضافه کردن بافر بایندینگ، ۱۰ میکرولیتر از رنگ پروپیدیوم‌یدید و ۵ میکرولیتر از رنگ انکسین V نیز به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت آنالیز سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت.

در نموداری که دستگاه فلوسایتومتری گزارش می‌دهد: محور (FL-1) X، نمایانگر لگاریتم فلورسانس انکسین V-FITC و محور (FL-3) Y، نمایانگر فلورسانس PI می‌باشد. FITC با نور آبی در طول موج ۴۹۳ نانومتر برانگیخته می‌شود و فلورسانس سبز در طول موج ۵۲۵ نانومتر ساطع می‌کند. PI با نور سبز-آبی در طول موج ۵۴۰ نانومتر برانگیخته می‌شود و فلورسانس قرمز در طول موج ۶۲۰ نانومتر از خود ساطع می‌کند.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری یافته‌ها به روش Student's t-test (two tailed) با نرم‌افزار Excel ۲۰۱۷ انجام شد. متغیرها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) گزارش شدند.  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### اثر سمیت گالیک‌اسید به تنهایی بر توان زیستی سلول‌های سرطانی ملانوما

نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر گالیک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانوما در تاریکی و غیاب نور لیزر نشان داد که بقای سلول‌های سرطانی ملانوما تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر به میزان ۲۳ درصد کاهش می‌یابد. در واقع، با افزایش غلظت گالیک‌اسید بقای سلول‌های سرطانی ملانوما انسان در یک رفتار وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. به طوری که در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید درصد بقای سلول‌ها به ترتیب ۸۷، ۵۷ و ۲۳ درصد کاهش ( $P < 0.05$ ) می‌یابد (شکل ۲ الف). به این ترتیب غلظت  $IC_{50}$  گالیک‌اسید در حدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

در این روش از رنگ‌های فلورسانس آکریدین‌اورنج<sup>۳</sup> و اتیدیوم‌بروماید<sup>۴</sup> برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده می‌شود. رنگ آکریدین‌اورنج که قابلیت گذر از غشای سلولی سالم را دارد، وارد سلول و سپس هسته می‌شود و با اتصال به DNA نشر فلورسانس سبز از خود ساطع می‌کند. بنابراین وجود هسته‌های متراکم به رنگ سبز درخشان بیانگر مراحل اولیه آپوپتوز می‌باشد. اما، در صورتی که سلول در مراحل انتهایی آپوپتوز و یا به صورت نکروز باشد، تمامیت غشای سلولی به هم خورده و رنگ اتیدیوم‌بروماید می‌تواند وارد سلول و هسته شود و با اتصال به DNA نشر فلورسانس نارنجی مایل به قرمز از خود ساطع کند.

بدین منظور ابتدا محلول محتوی ۱۰۰ میکروگرم آکریدین‌اورنج و ۱۰۰ میکروگرم اتیدیوم‌بروماید در یک میلی‌لیتر بافر سالین تهیه شد و سپس ۵ میکرولیتر از این محلول فوق با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخلوط و مقداری از آن بر روی یک لام تمیز گذاشته شد. سپس با میکروسکوپ فلورسانس و بزرگنمایی ۴۰X سلول‌ها بررسی شدند. برای تعیین درصد سلول‌های آپوپتوتیک حداقل ۳۰۰ سلول شمارش شد.

### سنجش کمی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری

به‌منظور تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده و قیاس آن با جمعیت سلولی در کنترل منفی، روش فلوسایتومتری استفاده شد. در این روش از دو ترکیب انکسین V (Annexin V - FITC) و پروپیدیوم‌یدید<sup>۵</sup> (PI) استفاده می‌شود که تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک از سلول‌های نکروتیک را امکان‌پذیر می‌سازد. از جمله تغییراتی که در مراحل اولیه آپوپتوز رخ می‌دهد، انتقال فسفاتیدیل‌سرین از لایه داخلی غشاء به لایه خارجی می‌باشد. حضور فسفاتیدیل‌سرین در لایه خارجی غشاء را می‌توان به کمک ترکیب انکسین V نشان‌دار شده با FITC نشان داد. انکسین V پروتئینی است که میل ترکیبی بالایی برای فسفاتیدیل‌سرین دارد و در حضور یون کلسیم به صورت برگشت‌پذیر به آن اتصال می‌یابد. بنابراین این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یک پروب مناسب برای تشخیص فسفاتیدیل‌سرین بر روی لایه خارجی غشاء مورد استفاده قرار گیرد. اما، از آنجایی که اتصال انکسین به فسفاتیدیل‌سرین غشایی تنها منحصر به آپوپتوز نیست و در مورد سلول‌های نکروتیک نیز مشاهده می‌شود، با استفاده از ترکیب فلورسانس پروپیدیوم‌یدید می‌توان بین سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک تمایز قائل شد. بدین ترتیب که پروپیدیوم‌یدید قادر به عبور از غشاء سلول‌های سالم و همچنین سلول‌هایی که در مراحل ابتدایی آپوپتوز هستند (به دلیل حفظ تمامیت غشاء پلاسمایی)، نمی‌باشد و تنها وارد سلول‌های نکروتیک می‌شود، به DNA سلول متصل می‌شود و قابل شناسایی در دستگاه فلوسایتومتری

3. [3, 6-bis(dimethyl) acridinium chloride hemi(zinc chloride salt)]

4. [(3, 8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridinium bromide)]

5. Propidium Iodid

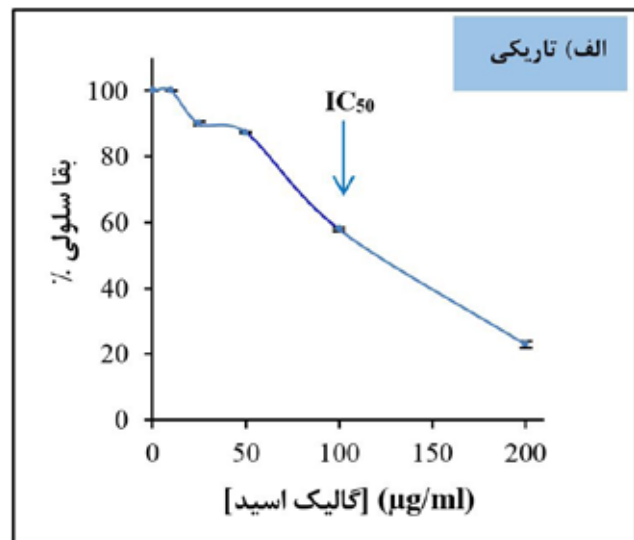
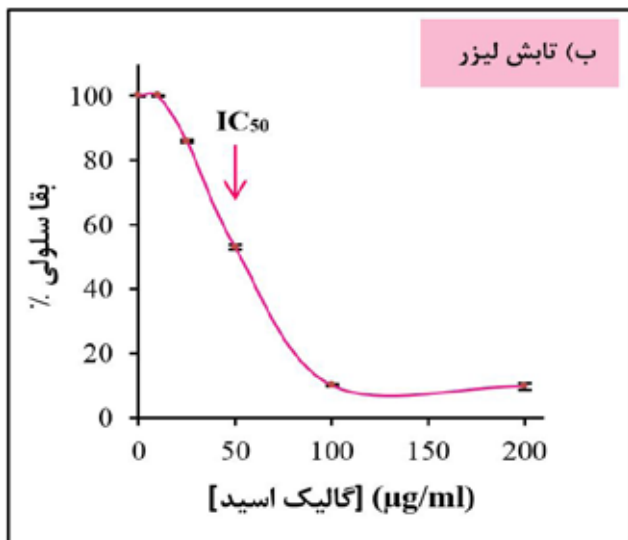
بقای سلولی دیده می‌شود (شکل ۳ الف). آزمایش مشابهی با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید انجام شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در غیاب لیزر کم‌توان، درصد بقای سلول‌ها تا ۸۴ درصد کاهش می‌یابد. در حضور تابش لیزر کم‌توان به مدت ۳۰ ثانیه و سطح انرژی  $1 \text{ J/cm}^2$  بقاء سلول‌ها به میزان ۸۸/۴ درصد کاهش یافت. در تابش ۶۰ ثانیه با انرژی  $2 \text{ J/cm}^2$ ، بقای سلولی ۸۲/۹ درصد بود و در تابش ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی  $3 \text{ J/cm}^2$ ، میزان بقای سلول ۵۷ درصد گزارش شد. در نمونه سلولی با ۱۸۰ ثانیه تابش با انرژی تابشی  $6 \text{ J/cm}^2$ ، میزان بقای سلول به حدود ۵۵ درصد کاهش یافت (شکل ۳ ب).

### سنجش وقوع آپوپتوز

به‌منظور سنجش کیفی وقوع آپوپتوز، سلول‌های تیمار شده با آکریدین اورنج / اتیدایوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسانس و بزرگ‌نمایی  $\times 40$  مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در حضور گالیک‌اسید به تنهایی تعداد

### اثر سمیت گالیک‌اسید به همراه لیزر کم‌توان (سمیت نوری) بر توان زیستی سلول‌های سرطانی ملانوما

نتایج حاصل از آزمایش بررسی اثر گالیک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانوما در حضور تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی  $3 \text{ J/cm}^2$  نشان داد که در حالت پیش‌تیمار با لیزر کم‌توان بقاء سلول‌ها تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید به میزان ۹/۷ کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در نمونه کنترل (بدون گالیک‌اسید) بقای سلول‌ها نسبت به حالت تاریکی تغییری نکرده است که نشان‌دهنده بی‌اثر بودن این دوز لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانوما است. در حضور تابش لیزر کم‌توان، بقای سلول‌ها در یک رفتار وابسته به غلظت گالیک‌اسید کاهش ( $P < 0.05$ ) می‌یابد، به طوری که غلظت  $IC_{50}$  گالیک‌اسید از حدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حالت تاریکی به حدود ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حالت تحت تابش لیزر کم‌توان کاهش ( $P < 0.05$ ) یافته است (شکل ۲ ب).



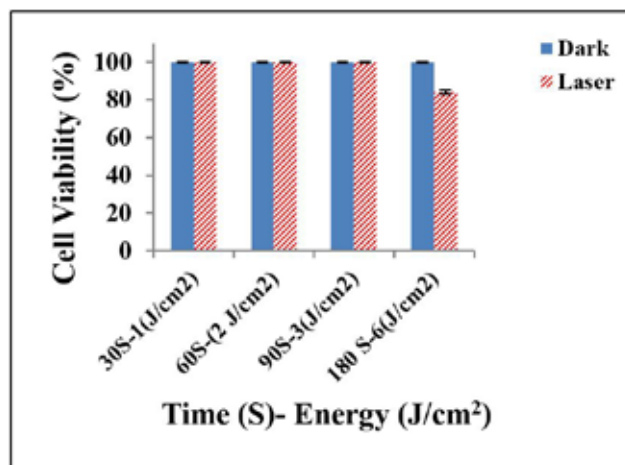
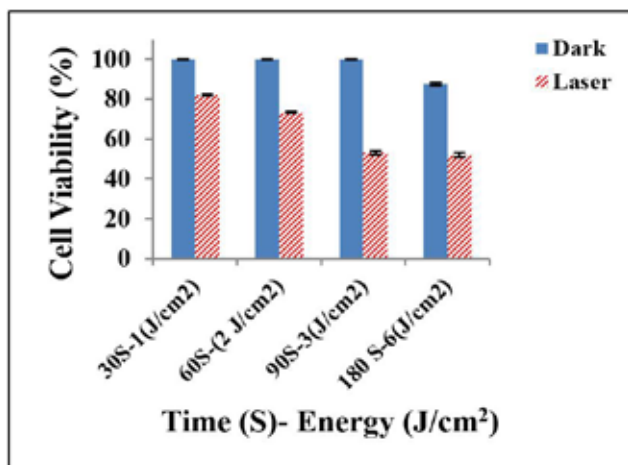
شکل ۲: الف) اثر غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید به تنهایی بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در تاریکی و ب) تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی  $3 \text{ J/cm}^2$  بر سلول‌ها و سپس ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید. نتایج به صورت میانگین  $\pm SD$  ( $n = 3$ ) نشان داده شده است.

کمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی می‌شوند درحالی‌که در حضور تابش لیزر کم‌توان و سپس تیمار با گالیک‌اسید بر تعداد مرگ و میر سلول‌ها افزوده می‌شود. سلول‌های سبز نشان‌دهنده سلول‌های زنده و سلول‌های سبز با کروماتین فشرده نشان‌دهنده آپوپتوز اولیه و سلول‌های نارنجی-قرمز نشان‌دهنده آپوپتوز ثانویه و یا نکروز می‌باشند.

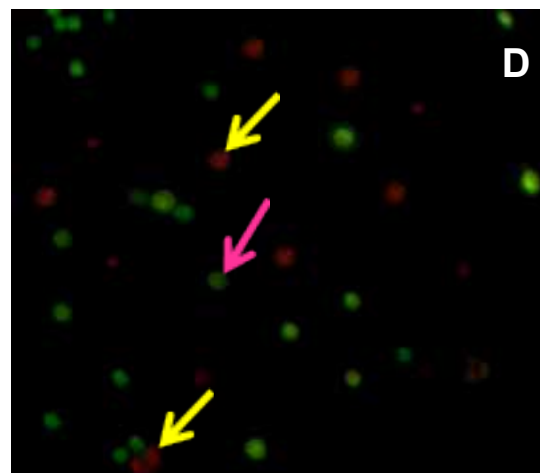
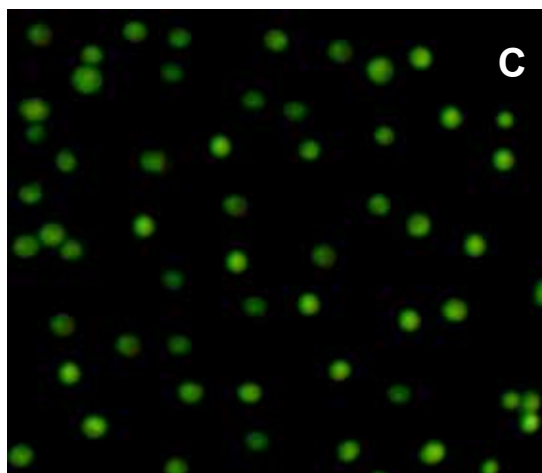
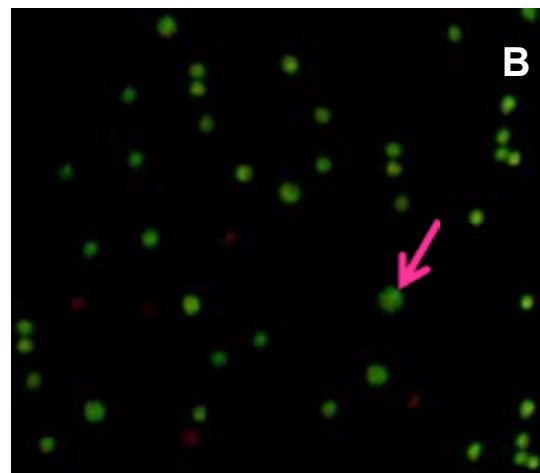
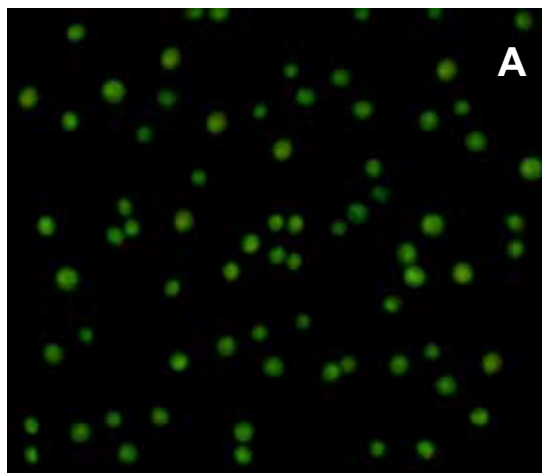
بررسی کمی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در سلول‌های سرطانی ملانوما رده A375 تحت تابش لیزر کم‌توان و تیمار با گالیک‌اسید نشان داد که میزان آپوپتوز در حالت پیش‌تیمار با لیزر و سپس تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گالیک‌اسید نسبت به تاریکی افزایش یافته است (شکل ۵).

از آنجا که  $IC_{50}$  گالیک‌اسید (یعنی غلظتی از آن ماده که در آن غلظت ۵۰ درصد از سلول‌ها کشته شده‌اند) برای سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی A375 غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، بنابراین در ادامه مطالعات، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر در غلظت‌های صفر و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بررسی شد.

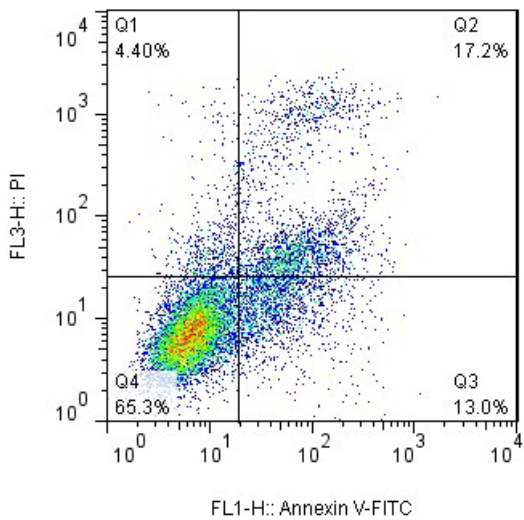
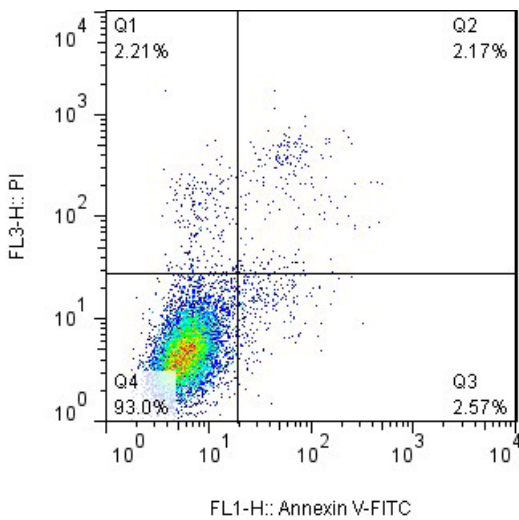
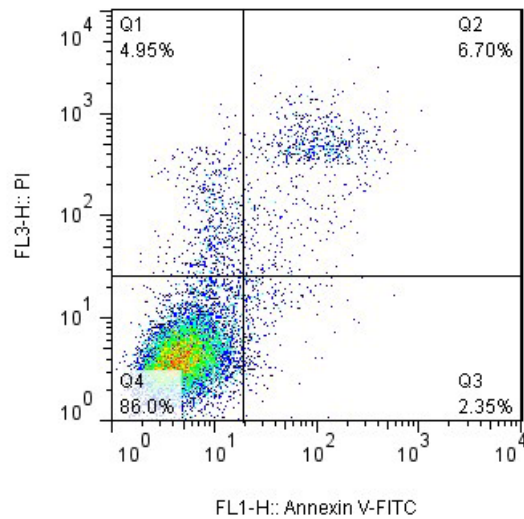
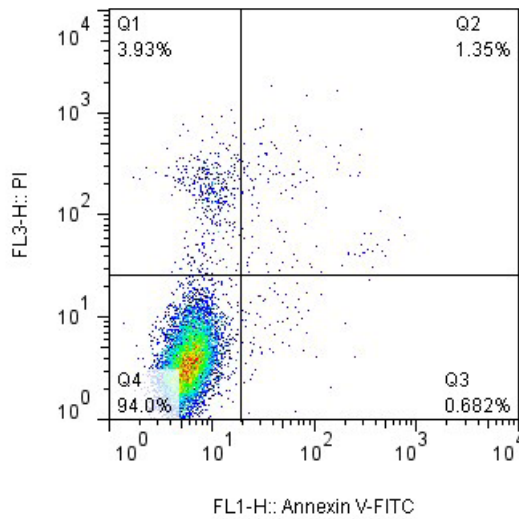
همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانوما بدون حضور گالیک‌اسید اثری ندارند و فقط در دوز انرژی بالا یعنی  $6 \text{ J/cm}^2$ ، تغییرات بسیار کمی در



شکل ۳: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان (۱، ۲، ۳ و ۶ J/cm<sup>2</sup>) بر بقای سلول‌های سرطانی ملانوما انسانی. الف) بدون حضور گالیک‌اسید و مقایسه با حالت تاریکی. ب) در معرض غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید به مدت ۲۴ ساعت و مقایسه با حالت تاریکی. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SD (n = ۳) بیان شده است.



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ فلورسانت از سلول‌های سرطانی ملانوما رده A۳۷۵. (A) در غلظت صفر و (B) غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید در پلیت تاریکی. (C) در غلظت صفر و (D) غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید در پلیت تحت تابش لیزر. فلش‌های صورتی: آپاپتوز اولیه، فلش‌های زرد: آپاپتوز ثانویه.



شکل ۵: ارزیابی میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ملانوما رده A375.

(A) در غلظت صفر و (B) غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید در پلیت تاریکی. (C) در غلظت صفر و (D) غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید در پلیت تحت تابش لیزر.

## بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اهمیت ترکیبات فنولی در درمان سرطان و همچنین شناخت بهتر اثر لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی، در این مطالعه اثر گالیک‌اسید به‌عنوان ترکیب فنولی در حضور لیزر کم‌توان بر بقای و آپوپتوز سلول‌های سرطانی ملانوما انسانی رده A375 بررسی گردید.

پلی‌فنول‌ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که در گیاهان، میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. مطالعات مختلف نشان داده است که رژیم غذایی حاوی ترکیبات فنولی، پتانسیل پیشگیری از سرطان را دارد و ارتباط معکوس بین مصرف رژیم غذایی حاوی ترکیبات فنولی و خطر ابتلا به سرطان مشاهده شده است [۱۱ و ۱۲]. گالیک‌اسید رایج‌ترین فنول در میان میوه‌ها، سبزیجات، زیتون و چای سبز می‌باشد [۱۳]. به لحاظ فعالیت بیولوژیکی، گالیک‌اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و به

سلول‌های بدن در محافظت از صدمات اکسیداتیو کمک می‌نماید، اعمال ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدالتهابی. همچنین مانع از بالارفتن چربی رژیم غذایی ناشی از دیس‌لیپیدمی و نیز اثرات آپوپتوزی، ضدتکثیر و ضدتوموری در سرطان پروسستات موش را نشان داده است [۱۴]. مصرف گیاهان حاوی ترکیباتی نظیر کاتچین، گالیک‌اسید و کافئین می‌تواند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها مانند آلبومین مانع از بروز برخی از عوارض بیماری دبابتی گردد. اثر اسیدگالیک بر کاهش اختلالات عصبی مختلف از جمله بیماری آلزایمر که با دمانس و کاهش حافظه همراه است، گزارش شده است [۱۵]. گالیک‌اسید دارای فعالیت ضدسرطانی بالقوه در انواع مختلف بدخیمی است و باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. اثرات ضدتوموری گالیک‌اسید در سلول‌های سرطان سینه سه‌گانه (TNBC) که با هورمون‌درمانی هدفمند گیرنده HER2 قرار گرفتند، بررسی شده است. درمان با گالیک‌اسید به‌طور قابل توجهی موجب کاهش

اخیر محمدی و همکاران بر روی اثر ترکیب فنولی پاراکوماریکاسید در حضور لیزر کم توان بر سلول‌های ملانوما رده A375 نشان داد که پیش تیمار سلول‌های سرطانی رده A375 با لیزر کم توان و سپس تیمار این سلول‌ها با پاراکوماریکاسید، بقاء و رشد سلول‌های ملانوما را نسبت به گروه کنترل (تاریکی) کاهش می‌دهد [۱۹]. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که پیش تیمار سلول‌های سرطانی ملانوما انسانی با لیزر کم توان و سپس تیمار این سلول‌ها با گالیکاسید، بقاء و رشد سلول‌های ملانوما را نسبت به گروه کنترل (تاریکی) کاهش می‌دهد. این مطالعات نشان می‌دهد که لیزر کم توان به تنهایی قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی ملانوما نمی‌باشد، اما استفاده از لیزر کم توان می‌تواند به نوعی نفوذپذیری سلول‌های ملانوما را به ترکیبات فنولی بهبود بخشد و در نتیجه اثر ضدسرطانی آن افزایش می‌یابد.

همچنین در بررسی اثر پیش تیمار انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم توان بر سلول و سپس تیمار با غلظت‌های مختلف گالیکاسید مشخص شد در غلظت IC<sub>50</sub> گالیکاسید (۵۰ µg/mL) بقای سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد و افزایش دوز تابشی با کاهش بقای سلولی ارتباط مستقیم دارد. مشاهده تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با گالیکاسید به همراه لیزر کم توان یافته‌های به دست آمده از مطالعه بقای سلولی را تأیید کرد. میزان مرگ‌ومیر سلولی در سلول‌هایی که در معرض گالیکاسید به همراه لیزر کم توان قرار گرفتند، نسبت به سلول‌های قرار گرفته در تاریکی بیشتر بود.

علاوه بر آن مطالعات ما بر روی مرگ سلولی القاء شده توسط لیزر کم توان و گالیکاسید نشان داد که پیش تیمار با لیزر کم توان و سپس تیمار با گالیکاسید میزان مرگ سلولی از نوع آپوپتوز را افزایش می‌دهد.

در نهایت مطالعات بیشتری در جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های سلولی و بیوشیمیایی لیزر کم توان به تنهایی و نیز در ترکیب با دیگر روش‌های درمانی در جهت کاربرد این درمان ترکیبی در بالین مورد نیاز است.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش کمک کردند، تشکر و قدرانی می‌نمایند.

میزان سلول‌های TNBC انسانی MDA-MB-231 و HS578T می‌شود. علاوه بر این، گالیکاسید باعث کاهش بقاء در سلول‌های MCF-10F می‌شود. گالیکاسید منجر به افزایش نسبت G0/G1 و نسبت فاز زیر G1 در سلول‌های MDA-MB-231 می‌شود که می‌تواند به مهار پروتئین G1 و آپوپتوز سلولی از طریق پروتئین کینازی که به پروتئین p27 / p21 / p38 متصل است، منتهی گردد. بنابراین پیشنهاد شده است که گالیکاسید می‌تواند برای درمان TNBC سودمند باشد. گالیکاسید رشد سلول‌های سرطانی ریه را توسط GSH مهار می‌کند و از طریق کاهش MUP، آپوپتوز و سطح ROS را تغییر می‌دهد. اسید گالیک باعث آپوپتوز القایی در پریادیپوسیت 3T3-L1 و چندین سلول دیگر شده است [۱۶-۱۸].

مطالعه قبلی محمدی و همکاران بر روی اثر ترکیب فنولی پاراکوماریکاسید در حضور لیزر کم توان بر سلول‌های ملانوما رده A375 نشان داد که بقای سلول‌های ملانوما رده A375 در حضور پاراکوماریکاسید (تاریکی) در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می‌یابد [۱۹]. در مطالعه ما نیز مشخص شد که بقای سلول‌های ملانوما انسانی رده A375 در حضور گالیکاسید تنها در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می‌یابد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. علاوه بر آن در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که مشتقات هیدروکسیله و متیله ترانس سینامیکاسید، تهاجم و متاستاز ملانوما در رده C8161 و A375 را مهار می‌نماید [۲۰].

بررسی اثر لیزر بر روی انواع سلول‌های نرمال و سرطانی نشان می‌دهد که اثر لیزر یک اثر یکسان و ثابت نمی‌باشد و بستگی به تیمارهای همراه دارد. با توجه به مطالعات مختلف، مکانیسم اثر لیزر عبارت‌انداز: لیزر با تأثیر بر روی کروموفورهای موجود در میتوکندری بر روی سلول اثر می‌گذارد و محرک مکانیسم‌های واکنشی در سلول می‌گردد، لیزر با تأثیر بر نفوذپذیری غشای سلولی منجر به تغییر در عکس‌العمل سلول در مقابل یک تیمار بخصوص می‌گردد [۲۱]. تابش لیزر همچنین باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و دفع مواد زائد داخل سلولی و در نتیجه نفوذ مؤثرتر مواد مغذی به داخل سلول می‌شود. تابش لیزر موجب افزایش سنتز آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) در سلول می‌شود. افزایش ATP توسط لیزر کم توان ممکن است اجازه دهد که سلول‌های سرطانی به محرک‌های سمیت سلولی پرو آپوپتوتیک پاسخ دهند و سیگنال‌های سلولی بعدی در جهت القاء آپوپتوز که به شدت وابسته به ATP هستند، با کارایی بهتری اجرا شود [۲۲]. در مقابل، از آنجا که سلول‌های سالم طبیعی حاوی مقادیر کافی از ATP هستند، اثر لیزر کم توان در سلول‌های سالم، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است که می‌تواند مکانیسم‌های محافظتی را در این سلول‌ها ایجاد کند [۲۳].

چنان‌که برخی از مطالعات نشان داده‌اند، درمان با لیزر کم توان ممکن است اثرات سایر درمان‌های سرطانی را تقویت کند [۱۹، ۲۷-۲۴]. مطالعه

## References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7–30. doi:10.3322/caac.21442.
2. Leonardi G, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos D, Mccubrey J. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol* 2018. doi:10.3892/ijo.2018.4287.
3. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 99: 91–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.12.002.
4. Grimaldi AM, Cassidy PB, Leachmann S, Ascierto PA. Novel Approaches in Melanoma Prevention and Therapy, 2014; 443–55. doi:10.1007/978-3-642-38007-5\_25.
5. Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula S V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J* 2016; 15: 99. doi:10.1186/s12937-016-0217-2.
6. Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 284S–291S.
7. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* 2015; 5: 27540–57. doi:10.1039/C5RA01911G.
8. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang Y-Y, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 516–33. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.
9. Chiari S. Photobiomodulation and Lasers, n.d., p. 118–23. doi:10.1159/000351906.
10. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 2001; 38: 179–93. doi:10.1016/S0037-1963(01)90051-4.
11. Curti V, Di Lorenzo A, Dacrema M, Xiao J, Nabavi SM, Daglia M. In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Semin Cancer Biol* 2017; 46: 119–31. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.005.
12. Fresco P, Borges F, Diniz MPMM and C. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 114–34. doi:http://dx.doi.org/10.2174/138161210789941856.
13. Chen H-M, Wu Y-C, Chia Y-C, Chang F-R, Hsu H-K, Hsieh Y-C. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2017; 286: 161–71. doi:10.1016/j.canlet.2009.05.040.
14. Russell LH, Mazzio E, Badisa RB, Zhu Z-P, Agharahimi M, Oriaku ET. Autoxidation of Gallic acid Induces ROS-dependant Death in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 1595–602.
15. Golumbic C, Mattill HA. The antioxidant properties of gallic acid and allied compounds. *Oil Soap* 1942; 19: 144–5. doi:10.1007/BF02545531.
16. Lee H-L, Lin C-S, Kao S-H, Chou M-C. Gallic acid induces G1 phase arrest and apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231 via p38 mitogen-activated protein kinase/p21/p27 axis. *Anticancer Drugs* 2017; 28: 1150–6. doi:10.1097/CAD.0000000000000565.
17. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35: 473–85. doi:https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011.
18. ZHAO B, HU M. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol Lett* 2013; 6: 1749–55. doi:10.3892/ol.2013.1632.
19. Kianmehr Z, Khorsandi K, Mohammadi M, Hosseinzadeh R. Low-level laser irradiation potentiates anticancer activity of p-coumaric acid against human malignant melanoma cells. *Melanoma Res* 2019; 1. doi:10.1097/CMR.0000000000000603.
20. Matej Soval, ?eljko ?i?ak2, Jelena A. Anti? Stankovi?3, Matev? Prijatelj1, Samo Turk1 ZD, Jurani?2, Irena Mlinari?-Ra??an1 SG. Cinnamic Acid Derivatives Induce Cell Cycle Arrest in Carcinoma Cell Lines. *Med Chem (Los Angeles)* 2013; 9.

21. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol* 2017; 12: 833–42. doi:10.1016/j.redox.2017.04.018.

22. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life* 2010; 62: 607–10. doi:10.1002/iub.359.

23. Eguchi Y, Shimizu S TY. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57: 1835–40.

24. Hode L. Low-Level Laser Therapy May Have Cancer Fighting Role. *Photomed Laser Surg* 2016; 34: 221–2. doi:10.1089/pho.2016.4128.

25. Zecha JAEM, Raber-Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Elad S, Hamblin MR. Low-level laser therapy/ photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer* 2016; 24: 2793–805. doi:10.1007/s00520-016-3153-y.

26. Khorsandi K, Chamani E, Hosseinzadeh G, Hosseinzadeh R. Comparative study of photodynamic activity of methylene blue in the presence of salicylic acid and curcumin phenolic compounds on human breast cancer. *Lasers Med Sci* 2018. doi:10.1007/s10103-018-2571-0.

27. Hosseinzadeh R, Khorsandi K, Jahanshiri M. Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2017; 184. doi:10.1016/j.saa.2017.05.008.