لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۷، دورهٔ ۱۵، شمارهٔ ۲، صفحات: ۳۴-۲۶ .

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ترکیب فنولی پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌های ملانومای انسانی تحت تابش انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان

مریم محمدی [۱]
خاطره خرسندی [۲]
زهرا کیان‌مهر [۱]

خلاصه

هدف: ملانوما به نوعی از سرطان پوست با منشأ سلول‌های ملانین‌دار می‌گویند که با مرگ‌ومیر بالا همراه است. اگرچه درحال‌حاضر روش‌های درمان برای ملانوم بدخیم شامل برداشت با جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و ایمونوتراپی می‌باشد، ولی این‌گونه درمان‌ها اغلب با عوارض شدید همراه هستند. یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها در درمان سرطان‌های مختلف، استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی است. ترکیبات فنولی یک‌دستهٔ عمده از آنتی‌اکسیدان های طبیعی در گیاهانی هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی مانند اثرهای آنتی‌اکسیدان و ضدسرطانی دارند. لیزر کم‌توان درمانی نوعی روش درمانی نوین در کاهش درد و التهاب می‌باشد. در رابطه با اثر لیزر کم‌توان برروی سلول‌های سرطانی مطالعات کمی صورت گرفته است. در این مطالعه اثر ترکیب فنولی پارا کوماریک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در حضور تابش‌های انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان بررسی شد.

روش بررسی: سلول های سرطانی ملانومای انسانی (ردهٔ A375) در معرض تابش لیزر کم‌توان باطول‌موج ۶۶۰نانومتر باانرژی $3\ J/cm^2$ قرار گرفت و سپس باغلظت‌های مختلف پاراکوماریک‌اسید (۱۰۰۰-۰ µg/mL) به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شد. سپس اثر لیزر کم‌توان و پاراکوماریک‌اسید بر بقای سلول‌ها بررسی شد. همچنین اثر تابش انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان (۶ و ۱, ۲, ۳ J/cm^2) بر سلول‌ها در عدم حضور و حضور غلظت IC_{50} از پاراکوماریک‌اسید (۴۰۰ µg/ml) با استفاده از تست MTT و میکروسکوپ نوری اینورت بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پیش‌تیمار با لیزر کم‌توان و سپس تیمار با پاراکوماریک‌اسید بقای سلول‌های سرطانی ملانوما را نسبت‌به حالت تاریکی کاهش می‌دهد. با افزایش انرژی های مختلف تابش در عدم‌حضور پاراکوماریک‌اسید، مرگ سلولی مشاهده نشد و فقط در دوز انرژی تابش بالا یعنی $6\ J/cm^2$، بقاء سلولی مقدار کمی نسبت‌به حالت کنترل کاهش داشت. درحالی‌که با افزایش دوز تابش در حضور غلظت ۴۰۰ µg/ml از پاراکوماریک بقاء سلولی به مقدار قابل‌توجهی کاهش پیدا کرد. بررسی مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت نوری نیز نتایج حاصل از روش MTT را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که لیزر کم‌توان به‌تنهایی باعث مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی ملانومانمی‌شود.اما استفاده‌ازلیزر کم‌توان به‌همراه پاراکوماریک‌اسیدباعث کاهش بقاء سلول‌ها می‌شود. با افزایش دوز تابش انرژی، میزان بقاء سلول در غلظت IC_{50} پاراکوماریک‌اسید کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌فنول‌ها، پاراکوماریک‌اسید، لیزر کم‌توان درمانی(LLLT)، سلول سرطانی ملانومای انسانی

۱. *گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران*

۲. *گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزردرپزشکی، پژوهشکدهٔ یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

نویسندهٔمسئول: خاطره خرسندی تلفن: ۰۲۱۶۶۴۹۲۵۷۲
پست الکترونیک: khorsandi.kh@ut.ac.ir

نویسندهٔمسئول: زهرا کیان‌مهر تلفن: ۰۲۱۲۲۹۴۴۳۲۴
پست الکترونیک: z.kianmehr@ut.ac.ir

مقدمه

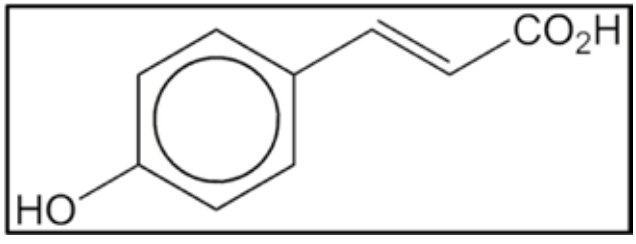
سرطان پوست بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم (سرطان) در بافت‌های پوست تشکیل می‌شوند. سه نوع عمدهٔ سرطان پوست وجود دارد: سرطان سلول پایه‌ای، کارسینوم سلول-سنگفرشی و ملانوما. دو مورد اول به‌همراه تعدادی از سرطان‌های پوستی که زیاد شایع نیستند، تحت عنوان سرطان پوستی غیر ملانومی شناخته می‌شوند. ملانوم‌ها تهاجمی‌ترین نوع سرطان پوستی هستند[۱].

ملانوما (melanoma) تومور بدخیمی است که از سلول‌های ملانین‌دار (ملانوسیت‌ها) یا خال‌های تغییرشکل‌یافته ایجاد می‌شود. این بیماری در مرحلهٔ اولیه می‌تواند به‌طور مؤثر با جراحی به‌تنهایی درمان شود، اما در حالت پیشرفته‌تر اغلب غیرقابل‌درمان هستند. ملانومای بدخیم دو درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود، ولی عامل یک درصد از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان است. در دنیا تعداد افراد مبتلا به سرطان ملانوما نسبت به بقیهٔ سرطان‌ها به‌سرعت درحال افزایش است، شیوع آن در بین جوامع مختلف متفاوت می‌باشد و هر ۱۰ تا ۲۰ سال میزان مبتلایان به این بیماری دو برابر می‌شود. در استرالیا این بیماری چهارمین سرطان شایع در بین مردان و سومین سرطان رایج در بین زنان می‌باشد. مطالعات اولیه روی شیوع این بیماری روی قسمت‌های مختلف بدن نشان داد که در مردان بیشتر در پشت بدن و شانه‌ها و در خانم‌ها در اندام تحتانی بیشتر شایع است. از عوامل مستعدکنندهٔ ابتلا به این بیماری داشتن نژاد سفید، در معرض آفتاب شدید قرار گرفتن، سابقهٔ خانوادگی، ژنتیک، سابقهٔ ملانومای قبلی، سرکوب ایمنی و خال‌های غیرطبیعی است. اخیراً استراتژی کنترل بیماری بیشتر روی پیشگیری این بیماری متمرکز شده است. درحال‌حاضر جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از رایج‌ترین درمان‌های این بیماری محسوب می‌شوند که به‌دلیل عوارض بالای این درمان‌ها، دانشمندان به‌دنبال استفاده از ترکیبات گیاهی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر آن‌ها می‌باشند[۲و۳]. آنتی‌اکسیدان‌های فنولی به‌طور گسترده‌ای در گیاهان وجود دارند و یکی از مهم‌ترین گروه‌های متابولیت ثانویه در گیاهان می‌باشند. در سال‌های اخیر اثرهای پلی‌فنول‌ها در رژیم غذایی توجه پژوهشگران، متخصصان تغذیه و تولیدکنندگان مواد غذایی را به‌خود جلب کرده است. مشخص شده است که پلی‌فنول‌ها علاوه‌بر داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند در پیشگیری و یا درمان بیماری‌هایی مانند سرطان مفید باشند[۴].

پلی‌فنول‌ها از لحاظ شیمیایی دارای حداقل یک حلقهٔ معطر و حاوی یک یا چند گروه هیدروکسیل هستند. منبع اصلی آنتی‌اکسیدان‌های فنولی، رژیم غذایی به‌ویژه میوه‌ها و سبزیجات است و درواقع اثرات ضد سرطانی آن‌ها اغلب به‌دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌های فنولی می‌باشد[۵]. کوماریک‌اسید از گروه فنول‌ها یکی از مشتقات سینامیک‌اسید است و از اولین ترکیبات واکنش‌های بیوسنتز پلی‌فنول است(شکل ۱). پاراکوماریک اسید (p-کوماریک اسید)، فراوان‌ترین ایزومر کوماریک‌اسید در طبیعت است که از سینامیک‌اسید توسط آنزیم ۴- سینامیک‌اسید هیدروکسیلاز به‌واسطهٔ سیتوکروم P450 سنتز می‌شود. پاراکوماریک‌اسید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضد توموری و جهش‌زایی می‌باشد[۶و۷]

در میان فن‌آوری‌های توسعه‌یافته درمان با لیزر کم‌توان روش نسبتاً جدیدی می‌باشد. لیزر کم‌توان در سطح سلولی عمل می‌کند و نتایج آن شامل کاهش درد، کاهش التهاب و بهبود بخشیدن به ترمیم بافت است[۸و۹]. لیزر کم‌توان درمانی دارای توان کمتر از ۲۵۰ میلی‌وات می‌باشد و به‌طورمعمول طیف باریکی از محدودهٔ قرمز یا نزدیک به مادون‌قرمز (۱۱۰۰-۶۰۰ نانومتر) با چگالی توان (تابش) کمتر از (۱۰۰ mW/cm^2) و چگالی انرژی بین (۵۰-۰/۰۴ J/cm^2) دارد. مکانیسم سلولی اثر لیزر کم‌توان با جذب نور قرمز و مادون‌قرمز به‌وسیلهٔ کروموفور یا گیرنده‌های نوری موجود در میتوکندری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، نیتریک‌اکسید (NO) و در نهایت افزایش ATP و فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و پراکسیداز همراه می‌باشد[۱۰و۱۱]. مطالعات نشان داده است که سیتوکروم C-اکسیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به نور لیزر کم‌توان است. جذب فوتون‌ها به‌وسیلهٔ سیتوکروم C-اکسیداز منجر به برانگیختگی الکترونی کروموفور می‌شود و درنتیجه واکنش انتقال الکترون تسریع می‌شود. انتقال الکترون لزوماً باعث افزایش تولید ATP می‌شود. بنابراین فعال شدن فوتون‌ها به‌وسیلهٔ آنزیم سیتوکروم C-اکسیداز نقش حیاتی در فعال شدن آبشارهای بیولوژیکی متنوع پس از تابش لیزر ایفا می‌کند[۱۲و۱۳]. برخلاف دیگر روش‌های پزشکی، لیزر کم‌توان درمانی دارای مکانیسم حرارتی نیست و موجب تخریب بافت نمی‌شود بلکه یک اثر فتوشیمیایی دارد و باعث تغییرات شیمیایی در سلول می‌گردد. این لیزرها با بافت واکنش می‌دهند و بدون ایجاد حرارت باعث تحریک یا مهار رشد در سلول‌ها می‌شوند[۱۴].

طبق پژوهش‌های قبلی مشخص شده است که لیزر کم‌توان موجب کاهش اثرهای نامطلوب شیمی‌درمانی و بهبود قابل توجه در کیفیت زندگی، حتی در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های پیشرفته، می‌شود. لیزر کم‌توان به‌عنوان یک درمان چندمنظورهٔ ایمن و مؤثر که به‌طور بالقوه برای استفاده با سایر درمان‌ها یا به‌عنوان یک روش مستقل قابل استفاده باشد،



شکل۱: ساختار شیمیایی پاراکوماریک‌اسید

در درمان سرطان و دیگر بیماری‌های پیچیده می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. اما در رابطه با اثرهای لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی مطالعات کمی صورت گرفته است.

با توجه به مطالب ذکرشده و آمار رو به افزایش مبتلایان به سرطان به‌ویژه سرطان ملانوما و اهمیت درمان آن و به‌دلیل آنکه تاکنون چنین مطالعهٔ ترکیبی بااستفاده از پلی‌فنول پاراکوماریک‌اسید و لیزر کم‌توان در زمینهٔ ملانوما صورت نگرفته است، این پژوهش رویکرد جدیدی محسوب می‌شود.

روش بررسی

مواد و وسایل آزمایش

پاراکوماریک‌اسید، پودر MTT از شرکت Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) خریداری شدند. سرم جنین گاوی(FBS) ، بافر فسفات سالین (PBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Gibco (Gibco BRL,USA) خریداری شدند. محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) از شرکت Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) خریداری شد. تمامی معرف‌ها از شرکت مرک Merck(Germany) خریداری شدند. در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

کشت سلول

سلول‌های سرطانی ملانوما انسانی ردهٔ A375 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط DMEM به‌همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شرایط ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

بررسی اثرهای پاراکوماریک‌اسید در تاریکی

برای بررسی سمیت سلولی پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌ها در غیاب نور (سمیت تاریکی) در هرچاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱×۱۰^{۴} سلول سرطانی ملانومای انسانی کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها در تاریکی با غلظت‌های متفاوتی از پاراکوماریک‌اسید شامل (۱۰۰۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزان مرگ‌ومیر سلولی با استفاده از تست رنگ‌سنجی MTT بررسی شد.

بررسی اثرهای پاراکوماریک‌اسید در حضور انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان (سمیت نوری)

جهت بررسی اثر لیزر بر سمیت سلولی ایجادشده توسط پاراکوماریک اسید ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه شده از سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی حاوی ۱×۱۰^{۴} سلول درچاهک‌های پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با مقادیر مشخصی از پاراکوماریک اسید شامل (۱۰۰۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها در معرض تابش لیزر (دستگاه لیزر Thor LX2) با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر به‌مدت ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی $۳\ J/cm^2$ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مرگ ومیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی و درصد توان زیستی باقیماندهٔ سلول‌ها در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد. گروه کنترل منفی به‌عنوان سلول‌هایی که فقط در معرض تابش لیزر کم‌توان بودند، تعریف شد.

همچنین در آزمایش دیگری، در عدم حضور و حضور غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید، اثرهای تابش لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت و با انرژی مختلف تابش ($۱\ J/cm^2$) ۳۰s، ($۲\ J/cm^2$) ۶۰s و ($۶\ J/cm^2$) ۱۸۰s، برروی سلول‌های ملانوما ردهٔ A375 انجام شد و بقای سلول‌ها اندازه‌گیری گردید. هر آزمایش حداقل سه‌بار تکرار شد.

بررسی توان زیستی سلول‌ها به روش MTT

در این مطالعه به‌منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT[1] استفاده شد. در روش MTT، آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های زنده با فعالیت آنزیمی خود منجر به تبدیل شدن نمک تترازولیوم-MTT به بلورهای فورمازان می‌شوند. بنابراین میزان فورمازان تولیدشده متناسب با تعداد سلول‌های زنده خواهد بود.

برای انجام تست MTT جهت بررسی سمیت تاریکی و نوری پاراکوماریک‌اسید، بعد از اتمام زمان انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت با پاراکوماریک‌اسید و لیزر کم‌توان، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها دو بار با بافر فسفات‌سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور برای مدت ۴ ساعت قرارگرفتند. پس از طی‌شدن زمان موردنظر چاهک‌ها تخلیه شدند و به هرکدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی-متیل‌سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. DMSO به‌عنوان حلال بلورهای فورمازان عمل می‌کند و باعث ایجاد رنگ بنفش با شدت‌های مختلف بسته به زنده بودن یا مردن سلول می‌شود.

جذب نوری سلول‌ها در هر چاهک جهت بررسی درصد توان زیستی سلول‌ها به‌وسیلهٔ دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر در مقایسه با جذب نوری گروه کنترل منفی (سلول‌های بدون پاراکوماریک‌اسید) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به‌دست‌آمده تحلیل و برروی نمودار ترسیم شدند.

1.MTT:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

بررسی مورفولوژی با میکروسکوپ نوری اینورت

به‌منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در معرض پاراکوماریک‌اسید و تابش لیزر کم‌توان، سلول‌ها در معرض تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی تابشی ۳ J/cm^2 قرار گرفتند و سپس با غلظت‌های متفاوت از پاراکوماریک‌اسید (۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌ها با میکروسکوپ نوری اینورت و بزرگ‌نمایی ۴۰x مورد مطالعه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری یافته‌ها به روش Student's t-test (two tailed) انجام شد. متغیرها به‌صورت میانگین و انحراف معیار ±SD گزارش شد. $P < 0.05$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

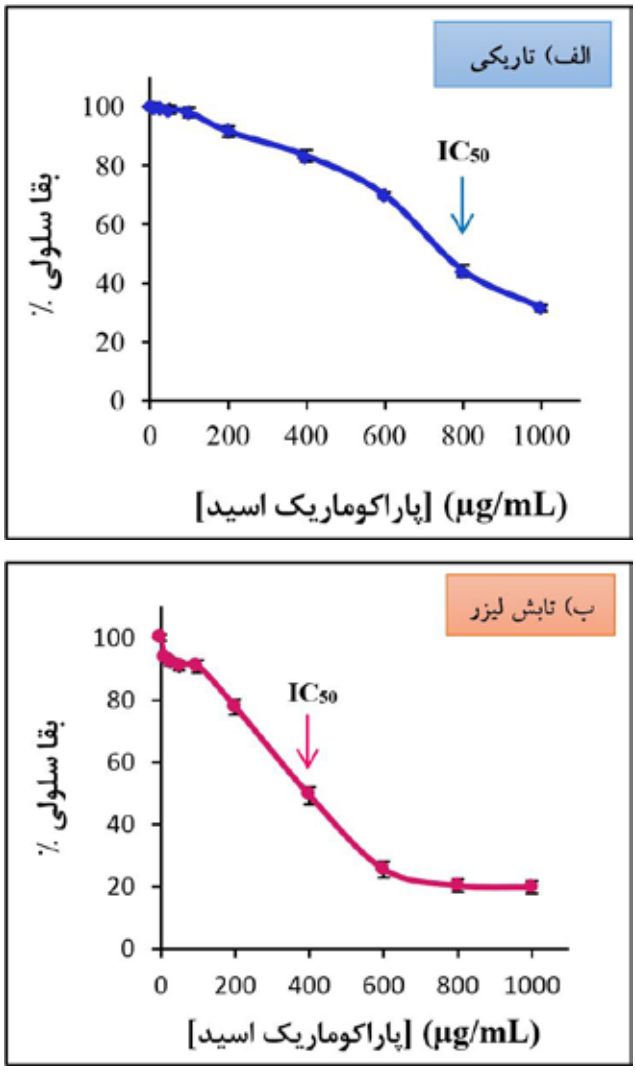
اثر سمیت تاریکی پاراکوماریک‌اسید بر توان زیستی سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی

نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در غیاب نور نشان داد که تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید تفاوت چشمگیری در کاهش بقاء سلولی نسبت‌به حالت کنترل مشاهده نمی‌شود ولی با افزایش غلظت پاراکوماریک‌اسید بقاء سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در یک رفتار وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید درصد بقاء سلول‌ها به‌ترتیب ۹۱، ۸۳، ۶۹/۹، ۴۴ و ۳۱ درصد کاهش ($P < 0.05$) می‌یابد (شکل ۲ الف). به‌این‌ترتیب غلظت IC_{50} پاراکوماریک اسید ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

اثر سمیت پارا کوماریک اسید به‌همراه لیزر کم‌توان (سمیت نوری) بر توان زیستی سلول‌ها

نتایج آزمایش مربوط به بررسی اثر پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در حضور تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی ۳ J/cm^2 نشان داد که در حضور لیزر کم‌توان بقای سلول تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید تغییرات قابل‌توجهی را نشان نمی‌دهد ولی با به‌کار بردن غلظت‌های بالاتراز پاراکوماریک‌اسید، بقای سلولی کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در نمونهٔ کنترل (بدون پاراکوماریک‌اسید) بقای سلول نسبت‌به حالت تاریکی تغییری نکرده است که نشان‌دهندهٔ بی‌اثر بودن دوز لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانوما می‌باشد. درحضور تابش لیزر کم‌توان، بقای سلول‌ها در یک رفتار وابسته‌به دوز پاراکوماریک‌اسید کاهش ($P < 0.05$) می‌یابد به‌طوری که غلظت IC_{50} پاراکوماریک‌اسید از حدود ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حالت تاریکی به حدود ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حالت تحت‌تابش لیزر کم‌توان کاهش ($P < 0.05$) یافت (شکل ۲ ب).

درادامهٔ مطالعات، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر درعدم حضور و حضور غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بررسی شد. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان داده شده است، انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بدون حضور پاراکوماریک‌اسید اثری ندارد و فقط در دوز انرژی بالاتر (۶ J/cm^2) تغییرات بسیار کمی در بقاء سلولی دیده می‌شود (شکل ۳).



شکل ۲: الف) اثر غلظت‌های مختلف پاراکوماریک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در تاریکی و ب) تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی J/cm^2 ۳ بر سلول‌ها و سپس ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پاراکوماریک‌اسید. نتایج به‌صورت میانگین ± SD (n = ۳) نشان داده شده است.

آزمایش مشابهی با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید انجام شد. نتایج نشان داد که درغلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (IC_{50}) در غیاب لیزر کم‌توان، بقای سلول‌ها تا ۸۳ درصد کاهش ($P < 0.05$) می‌یابد. در حضور تابش لیزر کم‌توان به‌مدت ۳۰ ثانیه و سطح انرژی J/cm^2 ۱ بقاء سلول‌ها به‌میزان ۵۹/۵ درصد کاهش ($P < 0.05$) یافت. در تابش ۶۰ ثانیه با انرژی J/cm^2 ۲، بقاء سلولی ۵۶ درصد ($P < 0.05$) بود و در تابش ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی J/cm^2 ۳، میزان بقاء سلول ۵۰ درصد ($P < 0.05$) گزارش شد. درنمونهٔ سلولی با ۱۸۰ ثانیه تابش و انرژی تابشی J/cm^2 ۶، میزان بقاء سلول به حدود ۴۶ درصد ($P < 0.05$) کاهش یافت (شکل ۴).

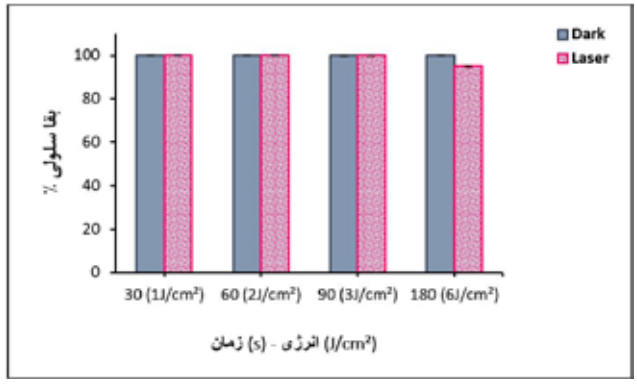
باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده، به‌منظور مشاهدهٔ اثر لیزر کم توان بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در حضور پاراکوماریک‌اسید، سلول‌ها پس از تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی J/cm^2 ۳ با غلظت‌های متفاوت از پاراکوماریک‌اسید (۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ نوری اینورت و بزرگ‌نمائی ۴۰x مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طورکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، قسمت A و B به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در محیط تاریکی با غلظت‌های ۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید، C و D به ترتیب نشان‌دهندهٔ سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در حضور تابش لیزر کم‌توان با غلظت‌های ۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک می‌باشد (شکل ۵). همان‌طورکه مشاهده می‌شود، با افزایش پاراکوماریک‌اسید و در غلظت (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و حضور تابش لیزر کم‌توان از تعداد سلول‌ها کاسته می‌شود و همچنین مورفولوژی سلول‌ها از حالت دوکی‌شکل به حالت گرد و کوچک‌شده تغییرشکل می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری

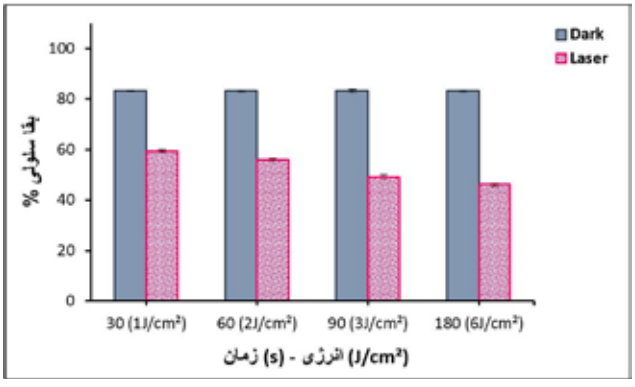
ملانوما تومور پوستی است که انتشار آن در جهان به سرعت در حال افزایش است. این نوع از سرطان می‌تواند تهاجمی باشد و حتی در مراحل اولیه متاستاز دهد[۱۵]. اگرچه درحال‌حاضر روش‌های درمان برای ملانوم بدخیم شامل برداشت جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و ایمونوتراپی می‌باشد، اما این‌گونه درمان‌ها اغلب با عوارض شدید همراه است. اثرها و شانس بقای طولانی‌مدت حتی بعد از درمان نیز ضعیف می‌باشد ازاین‌رو، بررسی رویکردهای جدید برای درمان ملانوم بدخیم از اهمیت بالایی برخوردار است[۱۸–۱۶]. یکی از بزرگ‌ترین محدودیت‌های داروهای ضد سرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است که می‌تواند ناشی‌از مقاومت ذاتی تومور نسبت به دارو باشد یا درطول شیمی‌درمانی کسب شود و به‌گونه‌ای عمل می‌کند که سلول‌های مقاوم از بین سلول‌های هتروژن انتخاب می‌شوند درنتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم، روند درمان مشکل‌تر می‌شود. امروزه، داروهای گیاهی به‌علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

ترکیبات فنولی دستهٔ مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را تشکیل می‌دهند که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضدسرطان، ضدقارچی، ضدباکتری، ضدویروسی، ضدانعقادخون و ضدکلسترول هستند. در مطالعات اپیدمیولوژیک، رژیم حاوی ترکیبات فنولی، پتانسیل پیشگیری از سرطان را نشان دادند. ارتباط معکوس بین مصرف رژیم حاوی ترکیبات فنولی و خطر ابتلا به سرطان در چند مطالعه مشاهده شده است[۱۹و۲۰].

گزارش‌های مختلفی که در زمینهٔ اثر لیزر برروی انواع سلول‌های نرمال و سرطانی وجود دارد، حاکی‌از آن است که اثر لیزر یک اثر یکسان و ثابت نمی‌باشد و بستگی به تیمارهای همراه دارد. به‌عبارتی‌دیگر، مکانیسم اثر لیزر را از دو جنبه می‌توان درنظر گرفت. لیزر با تأثیر برروی کروموفورهای



شکل ۳: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان (J/cm^2 ۱، J/cm^2 ۲، J/cm^2 ۳ و J/cm^2 ۶) بر بقای سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بدون حضور پاراکوماریک‌اسید و مقایسه با حالت تاریکی. نتایج به‌صورت میانگین ± SD (n = ۳) بیان شده است.



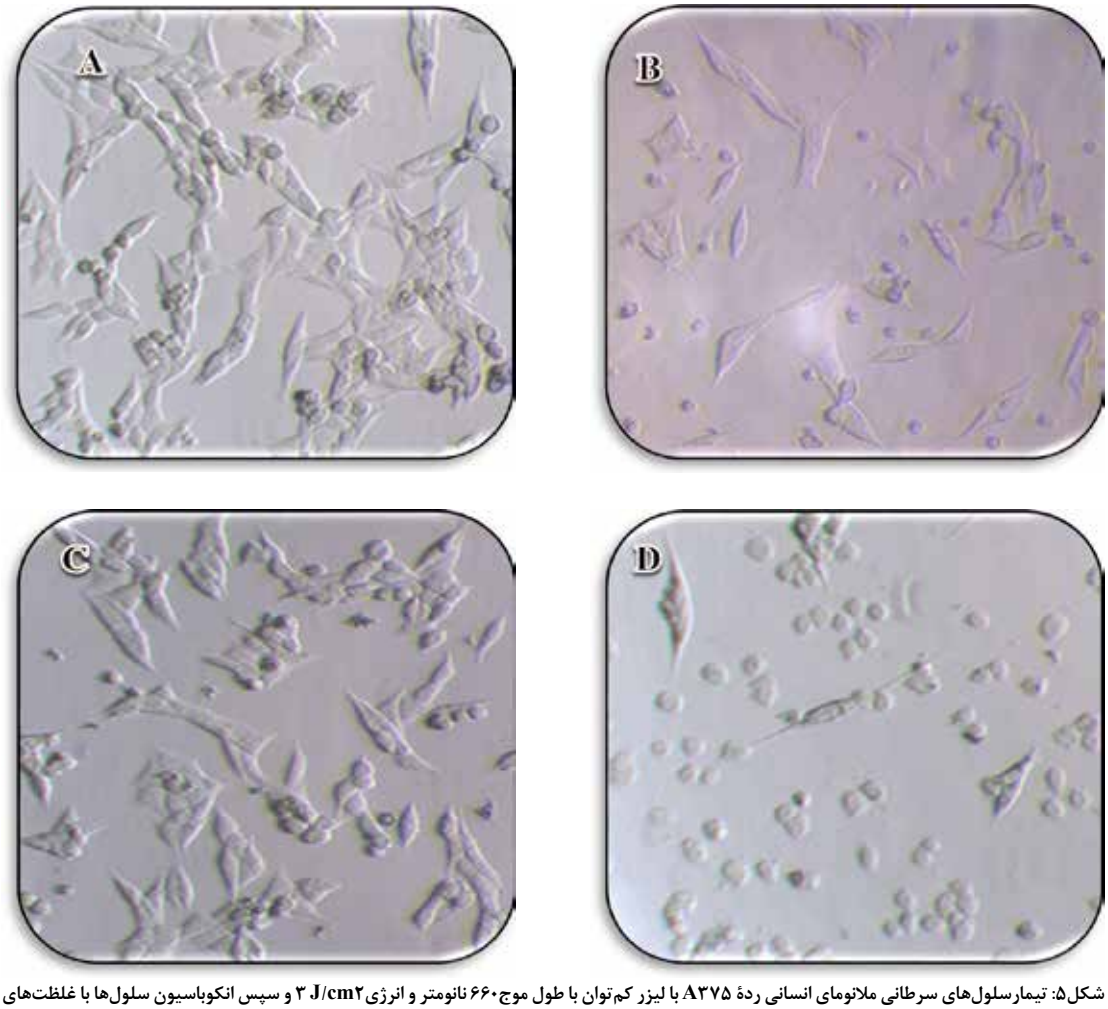
شکل ۴: اثر انرژی‌های مختلف J/cm^2 ۱، J/cm^2 ۲، J/cm^2 ۳ و J/cm^2 ۶ تابش لیزر کم‌توان بربقای سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در معرض غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید به‌مدت ۲۴ ساعت و مقایسه با حالت تاریکی. نتایج به‌صورت میانگین ± SD (n = ۳) بیان شده است.

موجود در میتوکندری برروی سلول اثر می‌گذارد و محرک مکانیسم‌های واکنشی در سلول می‌گردد و یا با تأثیر بر نفوذپذیری غشای سلولی منجربه تغییر در عکس‌العمل سلول مقابل یک تیمار بخصوص می‌شود. باتوجه به اهمیت ترکیبات فنولی در درمان سرطان و همچنین شناخت بهتر اثر لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی در این مطالعه اثر پاراکوماریک‌اسید به‌عنوان ترکیب فنولی در حضور لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی ردهٔ A375 بررسی گردید.

مطالعات نشان داده است که پاراکوماریک‌اسید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضد توموری و ضدجهش‌زایی در بسیاری از سلول‌های سرطانی است[۲۴–۲۱]. این ماده در سرطان سینه موجب تأخیر سیکل سلولی می‌گردد و مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود[۲۵و۲۶]. یافته‌های محققان نشان داده است که پاراکوماریک‌اسید نه‌تنها مانع فعالیت تیروزیناز انسان در محیط آزمایشگاهی می‌شود، بلکه همچنین موجب مهار ملانوژنز در سلول‌هایی که در معرض نور UVB قرار دارند، نیز می‌گردد[۲۷].

مطالعات مختلف نشان داده است که سلول‌ها نسبت‌به پاراکوماریک‌اسید رفتار وابسته به دوز نشان می‌دهند. یعنی با افزایش غلظت، اثر سمیت سلولی پاراکوماریک‌اسید بیشتر قابل مشاهده است[۲۴و۲۵].

در مطالعهٔ ما نیز مشخص شد که بقاء سلول‌های ملانوما ردهٔ A375 در حضور پاراکوماریک‌اسید (تاریکی) در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می‌یابد. بنابراین نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مشتقات هیدروکسیله و متیلهٔ ترانس‌سینامیک‌اسید تهاجم و متاستاز ملانوما در ردهٔ C8161 و A375 را مهار می‌نماید[۲۱]. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط de Oliveira Niero و همکاران انجام شد پتانسیل سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک‌اسید سینامیک در سلول‌های ملانوم انسانی ردهٔ HT-144



شکل۵: تیمارسلول‌های سرطانی ملانومای انسانی ردهٔ A۳۷۵ با لیزر کم‌توان با طول موج۶۶۰ نانومتر و انرژی۲J/cm ۳ و سپس انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پاراکوماریک‌اسید. غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید درتاریکی (A) و با تابش لیزر کم‌توان (C)، غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراکوماریک‌اسید در تاریکی (B) و با تابش لیزر کم‌توان (D)

و سلول‌های ملانوسیتی انسان (NGM) مقایسه شد، سنجش بقاء سلولی نشان داد که مقدار IC_{50} برای سلول‌های ملانوم انسانی ردهٔ HT-144 mM، معادل ۲/۴ mM است، درحالی‌که سلول‌های NGM نسبت به درمان مقاوم‌تر بودند. آن‌ها نتیجه گرفتند که اسیدسینامیک مانع از تکثیر سلول‌های ملانوم می‌شود[۲۲] که نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر نیز این موضوع را تأیید می‌کند.

مقالات بسیار کمی وجود دارد که نشان می‌دهد درمان با لیزر کم‌توان می‌تواند برای بیماران سرطانی مضر و یا سودمند باشد. در پژوهشی که نتایج آن در سال ۲۰۱۵ منتشر شد اثر دوزهای مختلف لیزر کم‌توان در تکثیر سلول‌های خونی میلوئید حاد ردهٔ سلولی(KG-۱a) در سطح آزمایشگاه بررسی شد و افزایش معنی‌داری در تکثیر سلول تنها پس از دو مرحله با تراکم انرژی ۲۰ J/cm۲مشاهده شد. نتایج نشان داد اگرچه لیزر کم‌توان درمانی معمولاً برای درمان موکوزیت ناشی از پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما مطالعات بیشتر نشان می‌دهد که طول‌موج‌های مختلف و دوز لیزردرمانی در درمان موکوزیت مؤثر هستند. بنابراین پزشکان باید درمورد استفاده از این درمان برای بیماران مبتلا به بدخیمی محتاط باشند[۲۸].

در تحقیقات اخیر که توسط Ottaviani و همکاران انجام شد اثر ضد سرطان سه پروتکل لیزر که در آن‌ها طول موج‌های معمولی مورد استفاده قرار گرفته است، در ملانوم ردهٔ B16F10 بررسی شد و نتایج این تحقیق نشان داد که نور لیزر باعث افزایش متابولیسم سلولی شده و درنتیجه در in vivo پیشرفت تومور کاهش یافته است. همچنین نور لیزر تعداد بالای ماکروفاژهای آنژیوژنیک در تودهٔ توموری را کاهش داد که یک استراتژی جدید برای کنترل پیشرفت تومور است[۲۹].

مطالعات نشان داده است که لیزر کم‌توان اثر متفاوتی در سلول‌های سرطانی بدخیم نسبت به سلول‌های طبیعی سالم داشته است. از آنجایی‌که عرضهٔ آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) در سلول‌های سرطانی بسیار محدود است، افزایش ATP توسط لیزر کم‌توان ممکن است اجازه دهد که سلول‌های سرطانی به محرک‌های سمیت سلولی پروآپوپتوتیک پاسخ دهند و سیگنال‌های سلولی بعدی در جهت مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) که به‌شدت وابسته به انرژی (ATP) است، با کارآیی بهتری اجرا شود[۳۰و۳۱]. در مقابل، ازآنجاکه سلول‌های سالم طبیعی حاوی مقادیر کافی از ATP هستند، اثر لیزر کم‌توان در سلول‌های سالم، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است که می‌تواند مکانیسم‌های محافظتی را در این سلول‌ها ایجاد کند[۳۲]. بنابراین رویکرد ترکیب لیزر کم‌توان با سایر روش‌های درمانی یا داروهای ضد سرطان می‌تواند مرگ سلول‌های سرطانی را افزایش دهد و درعین‌حال از سلول‌های سالم محافظت کند[۳۳].

برخی از مطالعات نشان می‌دهد درمان با لیزر کم‌توان ممکن است اثرهای سایر درمان‌های سرطانی را تقویت کند[۳۷-۳۴]. تحقیقات اخیر نشان داده است که تابش لیزر همچنین باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و دفع مواد زاید داخل سلولی و درنتیجه نفوذ مؤثرتر مواد مغذی به داخل سلول می‌شود. تحریک زیستی با نور توسط لیزرهای کم‌توان تأثیر زیادی در درمان بیماری‌ها داشته است[۳۸و۳۹].

در مطالعهٔ حاضر نشان داده شد که پیش‌تیمار سلول‌های سرطانی ردهٔ A375 با لیزر کم‌توان و سپس تیمار این سلول‌ها با پاراکوماریک‌اسید، بقاء و رشد سلول‌های ملانوما را نسبت به گروه کنترل (تاریکی) کاهش می‌دهد. این مطالعه نشان داد که لیزر کم‌توان به‌تنهایی قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی ملانوما نمی‌باشد اما استفاده از لیزر کم‌توان می تواند به‌نوعی نفوذپذیری سلول‌های ملانوما را به پاراکوماریک‌اسید بهبود بخشد و درنتیجه اثر ضد سرطانی آن افزایش می‌یابد.

همچنین در بررسی اثر پیش‌تیمار انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر سلول و سپس تیمار با غلظت‌های مختلف پاراکوماریک‌اسید مشخص شد در غلظت IC_{50} (۴۰۰ µg/mL) بقاء سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد و افزایش دوز تابشی با کاهش بقاء سلولی ارتباط مستقیم دارد. مشاهده‌های مورفولوژی سلول‌های تیمارشده با پاراکوماریک‌اسید به‌همراه لیزر کم‌توان یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعهٔ بقاء سلولی را تأیید کرد. میزان مرگ و میر سلولی در سلول‌هایی که در معرض پاراکوماریک‌اسید به‌همراه لیزر کم‌توان قرار گرفتند، نسبت به سلول‌های در تاریکی قرار گرفته، بیشتر بود.

درنهایت، می‌توان پیشنهاد داد که لیزر کم‌توان درمانی می‌تواند در درمان بیماران مبتلا به سرطان در ترکیب با دیگر روش‌های درمانی استفاده گردد. با این وجود هنوز نمی‌توان نظر قطعی در این رابطه داشت و مطالعات بیشتری در جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های سلولی و بیوشیمیایی لیزر کم‌توان 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.

References:

1. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas, Nat. Rev. Cancer. 2016; 16: 345. http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.37.

2. Geller AC, Clapp RW, Sober AJ, Gonsalves L, Mueller L, Christiansen CL. Melanoma Epidemic: An Analysis of Six Decades of Data From the Connecticut Tumor Registry, J. Clin. Oncol. 2013; 31: 4172–8. doi:10.1200/JCO.2012.47.3728.

3. Ossio R, Roldán-Marín R, Martínez-Said H, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma: a global perspective, Nat. Rev. Cancer. 2017; 17: 393. http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.43.

4. El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review, Int. J. Food Sci. Technol. 2009; 44: 2512–8. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x.

5. Russo GL, Tedesco I, Spagnuolo C, Russo M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil?, Semin. Cancer Biol. 2017; 46: 1–13. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.005.

6. Kolahi M, Tabandeh MR, Saremy S, Hosseini SA, Hashemitabar M. The Study of Apoptotic Effect of p-Coumaric Acid on Breast Cancer Cells MCF-7, SSU_Journals. 2016; 24: 211–21. http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3569-en.html.

7. Sharma SH, Chellappan DR, Chinnaswamy P, Nagarajan S. Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats, Biomed. Pharmacother. 2017; 94: 577–88. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.146.

8. Tchanque-Fossuo CN, Ho D, Dahle SE, Koo E, Li CS, Isseroff RR. A systematic review of low-level light therapy for treatment of diabetic foot ulcer, Wound Repair Regen. 2016; 24: 418–26. doi:10.1111/wrr.12399.

9. Cotler HB, Chow RT, Hamblin MR, Carroll J. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain, MOJ Orthop. Rheumatol. 2015; 2: 68. doi:10.15406/mojor.2015.02.00068.

10. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, 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.

11. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring, Semin. Cutan. Med. Surg. 2013; 32: 41–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126803/.

12. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy, Dose-Response. 2009; 7: 358–83. doi:10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.

13. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2016; 22: 348–64. doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201.

14. [14] Moskvin SV. Only lasers can be used for low level laser therapy, BioMedicine. 2017; 7: 22. doi:10.1051/bmdcn/2017070422.

15. Grimaldi AM, Cassidy PB, Leachmann S, Ascierto PA. Novel Approaches in Melanoma Prevention and Therapy, in: 2014: 443–55. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_25.

16. Henriques V, Martins T, Link W, Ferreira BI. The Emerging Therapeutic Landscape of Advanced Melanoma, Curr. Pharm. Des. 2018; 24: 549–58. doi:10.2174/1381612824666180125093357.

17. Wong DJL, Ribas A. Targeted Therapy for Melanoma, in: 2016: 251–62. doi:10.1007/978-3-319-22539-5_10.

18. Homet B, Ribas A. New drug targets in metastatic melanoma, J. Pathol. 2014; 232: 134–41. doi:10.1002/path.4259.

19. 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–91S. http://ajcn.nutrition.org/content/81/1/284S.abstract.

20. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies, Oxid. Med. Cell. Longev. 2016; 2016: 6475624. doi:10.1155/2016/6475624.

21. Matej Sova1 ZD, ?eljko ?i?ak2, Jelena A. Anti? Stankovi?3, Matev? Prijatelj1, Samo Turk1, S.G. Jurani?2, Irena Mlinari?-Ra??an1, Cinnamic Acid Derivatives Induce

Cell Cycle Arrest in Carcinoma Cell Lines, Med. Chem. (Los. Angeles). 2013; 9.

22. E.L. de O. Niero, G. Machado-Santelli, Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells, J. Exp. Clin. Cancer Res. 2013; 32: 31. doi:10.1186/1756-9966-32-31.

23. Kiliç I, Yeşiloğlu Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2013; 115: 719–24. doi:https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.110.

24. Jaganathan SK. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells, World J. Gastroenterol. 2013; 19: 7726. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7726.

25. Kong CS, Jeong CH, Choi JS, Kim KJ, Jeong JW. Antiangiogenic Effects of P-Coumaric Acid in Human Endothelial Cells, Phyther. Res. 2013; 27: 317–23. doi:10.1002/ptr.4718.

26. Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention, Int. J. Cancer. 1995; 62: 345–50. doi:10.1002/ijc.2910620319.

27. An SM, Koh JS, Boo YC. p-coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB, Phyther. Res. 2010; 24: 1175–80. doi:10.1002/ptr.3095.

28. Dastanpour S, Momen Beitollahi J, Saber K. The Effect of Low-Level Laser Therapy on Human Leukemic Cells, J. Lasers Med. Sci. 2015; 6: 74–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431967/.

29. Ottaviani G, Martinelli V, Rupel K, Caronni N, Naseem A, Zandonà L. Laser Therapy Inhibits Tumor Growth in Mice by Promoting Immune Surveillance and Vessel Normalization, EBioMedicine. 2016; 11: 165–72. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.028.

30. 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.

31. 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.

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

33. Santana-Blank L, Rodríguez-Santana E, Santana-Rodríguez KE, Reyes H. Quantum Leap in Photobiomodulation Therapy Ushers in a New Generation of Light-Based Treatments for Cancer and Other Complex Diseases: Perspective and Mini-Review, Photomed. Laser Surg. 2016; 34: 93–101. doi:10.1089/pho.2015.4015.

34. Kiro NE, Hamblin MR, Abrahamse H. Photobiomodulation of breast and cervical cancer stem cells using low-intensity laser irradiation, Tumor Biol. 2017; 39. 1010428317706913. doi:10.1177/1010428317706913.

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

36. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis, Curr. Opin. Oncol. 2012; 24: 363–70. doi:10.1097/CCO.0b013e328352eaa3.

37. Zecha JAEM, Raber - Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Sonis ST, Elad S. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations, Support. Care Cancer. 2016; 24: 2781–92. doi:10.1007/s00520-016-3152-z.

38. 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.

39. 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.