لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۸، دورهٔ ۱۶، شمارهٔ ۱، صفحات: ۲۷-۱۸.

مقاله پژوهشی

بررسی بقاء سلولی و آپوپتوز در سلول‌های ملانومای انسانی درحضور تابش لیزر کم‌توان و ترکیب فنولی گالیک‌اسید

زهره حسینمردی [۱]
زهرا کیان‌مهر [۲]
خاطره خرسندی [۳]

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 ازجمله 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 مطالعهٔ حاضر اثر ترکیب گیاهی گالیک‌اسید به‌تنهایی و همراه با لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بررسی شده است.

روش بررسی: سلول‌های سرطانی ملانوما ردهٔ A375 درمعرض تابش لیزر کم‌توان با طول موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی J/cm^2 ۳ به‌مدت ۹۰ ثانیه قرار گرفتند و سپس با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید (صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. همچنین اثر تابش میزان انرژی‌های مختلف لیزر کم‌توان (۱، ۲، ۳ و ۶ J/cm^2) بر سلول‌های درمعرض غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید (صفر و IC_{50}) بررسی شد. اثر لیزر کم‌توان و گالیک‌اسید بر بقاء سلولی با استفاده از تست MTT و وقوع آپوپتوز ازطریق بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول با میکروسکوپ فلورسانس (رنگ‌آمیزی دوگانهٔ اتیدیوم‌بروماید و آکریدین‌اورنج) و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تست MTT نشان داد که پیش‌تیمار با لیزر کم‌توان 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 J/cm^2 ۶، مقدار کمی نسبت به حالت کنترل کاهش داشت. در غلظت 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 کم‌توان به‌تنهایی باعث مرگ و میر سلول‌های سرطانی ملانوما ردهٔ A375 نمی‌شود، اما استفاده از لیزر کم‌توان به‌همراه گالیک‌اسید باعث کاهش بیشتر بقای سلول‌های سرطانی نسبت به حالت استفاده از گالیک‌اسید به‌تنهایی می‌شود. بنابراین استفاده از درمان ترکیبی لیزر کم‌توان و گالیک‌اسید، موجب کاهش دوز مؤثر اثرات ضدسرطانی گالیک‌اسید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های سرطانی ملانوما، گالیک‌اسید، لیزر کم‌توان، آپوپتوز

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

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

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

نویسندهٔ مسئول: زهرا کیان‌مهر، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۶۴۳۶۵
پست الکترونیک: z.kianmehr@ut.ac.ir

نویسندهٔ مسئول: خاطره خرسندی، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۶۴۳۶۵
پست الکترونیک: khorsandi.kh@ut.ac.ir

مقدمه

سرطان یک بیماری مهلک با آمار مرگ و میر بالا است که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی را به‌دنبال دارد. سـرطان در واقع رشـد و تکثیر کنترل نشـدهٔ سلول‌های غیر طبیعی در بدن می‌باشد. عوامل ایجادکنندهٔ سرطان را می‌توان به دو دستهٔ عوامل مرتبط با شیوهٔ زندگی مانند سیگار، الکل و تغذیهٔ نامناسب و عوامل محیطی مانند مصرف تنباکو، الکل، تغذیهٔ نامناسـب و قرار گرفتن در معرض تابش اشعه تقسـیم 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 سـلول پایه‌ای، کارسینوم سلول-سنگفرشی و سرطان سلول‌های ملانین‌دار (ملانوما) سه نوع عمدهٔ سرطان پوست به‌شمار می‌روند. دو مورد اول به‌همراه تعدادی از سرطان‌های پوستی تحت عنوان سرطان پوستی غیرملانومی شناخته می‌شـوند. ملانوم‌ها اغلب مقاوم به درمان می‌باشند و حالتی تهاجمی با متاستاز بالا دارند و درواقع تهاجمی‌ترین نوع سرطان پوستی هستند[۲]. ملانوما در زنان در مقایسه با مردان بیشتر اسـت و اغلب در مردان در قسـمت تنه و در زنان در اندام تحتانی (پاها) بروز می‌یابد. از نشانه‌های بالینی ملانوم می‌توان به داشتن شکل نامتقارن و تغییـر رنـگ قرمز به رنگ مایل بـه قهوه‌ای و انـدازهٔ لبه‌های نامنظم اشـاره کرد که با خارش و خونریزی نیز همراه است. زمانی‌که سلول‌های سـرطانی ملانوما به تومورهای بدخیم تبدیل می‌شـوند، اغلب به درمان مقاوم می‌شوند و به قسمت‌های عمیق پوست و همچنین اندام‌های داخلی مانند طحال، کبد و گره‌های لنفی متاستاز می‌دهند[۳].

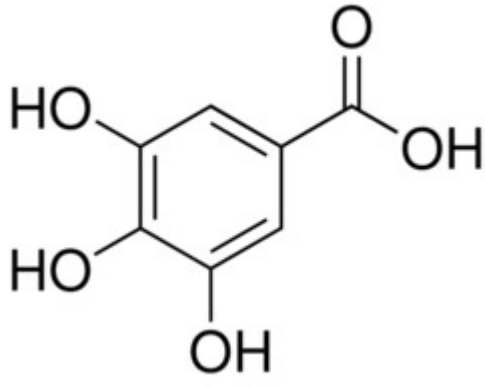
درحال‌حاضر جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از رایج‌ترین درمان‌های ملانوما هسـتند. اما، به‌دلیل عوارض جانبـی بالای این درمان‌ها محققان به‌دنبـال یافتـن درمان‌های جایگزیـن، مکمل یا حتـی ترکیبی که در عین داشـتن کارآیی بالا، عوارض جانبی کمتری نیز دارند، می‌باشـند. از جملهٔ این درمان‌ها می‌توان به اسـتفاده از ترکیبات گیاهی اشاره کرد که امروزه زمینهٔ تحقیقاتی وسـیعی ازجمله بررسـی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی را به‌خود اختصاص داده‌اند[۴].

ترکیبات فنولی جزء متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و از لحاظ ساختاری حلقهٔ آروماتیک یک یا چندحلقه‌ای واجد گروه‌های هیدروکسیل هستند. بیش از ۸۰۰۰ ترکیب فنولی تابه‌امروز کشـف شده است. ترکیبات فنولی جداشـده از گیاهان شـامل فلاونوئیدها، لیگان‌ها، تانن‌ها، گزانتونی‌ها و کومارین‌ها هسـتند. ترکیبـات فنولی اغلب فعالیت ضدسـرطانی دارند و به‌عنـوان یک مبارزه‌گر با بیماری‌های مرتبط با اسـترس اکسـیداتیو می‌باشند[۵]. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات فنولی گیاهی مانع آغاز و پیشرفت سرطان می‌شوند که به‌وسیلهٔ مدولاسیون ژن‌های تنظیم‌کنندهٔ فرآیندهای کلیدی سلول انجام می‌گیرد[۶].

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

لیزر کم‌توان درمانی[1] یکی از روش‌های درمانی نوین، ایمن و چندمنظوره با طیف وسـیعی 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 نئوپلاسـم‌های پیشرفته شده است[۸]. این درمان بر مبنای تاباندن طیف باریکی از نور در محدودهٔ قرمز تا مادون قرمز نزدیک (طول‌موج ۱۱۰۰-۶۰۰ نانومتر)، با چگالی توان (تابش) پایین (کمتر از $100\ mW/cm^2$) و چگالی انرژی بین $0/40\text{-}50\ J/cm^2$ می‌باشد. لیزر کم‌توان بدون ایجاد اثر گرمایی قابل توجه، ازطریق جذب و انتقال انرژی فوتون در غالب واکنش‌های فتوشیمیایی، اثرات درمانی خود را اعمال می‌کند. واکنش‌های اولیهٔ لیزرهای کم‌توان در سطح سلولی براساس جذب انرژی نور لیزر توسـط مولکول‌های زنجیرهٔ تنفسـی آغاز می‌شود و سـیتوکروم c-اکسـیداز یک کروموفور اصلی در پاسخ به لیزر کم‌توان اسـت. تابش نور لیزر کم‌توان برروی میتوکندری‌های ایزوله‌شده 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 سـرطان به‌ویژه سرطان ملانوما و اهمیت درمان آن، خواص آنتی‌اکسـیدانی و ضدسـرطانی گالیک‌اسـید و وجود مطالعات اندک در رابطه با اثرات لیزر کم‌توان بر سـلول‌های سـرطانی،



شکل۱: ساختار شیمیایی گالیک‌اسید

1. Low-Level Laser Therapy (LLLT)

مارا برآن داشت تا در این مطالعه اثر گالیک‌اسید و تابش لیزر کم‌توان را به‌تنهایی 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 ردهٔ A375 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 فسفات سالین (PBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Gibco (Gibco BRL,USA)، گالیک‌اسید و پودر MTT از شرکت Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)، اتیدیوم‌بروماید و آکریدین‌اورنج 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 ردهٔ A375 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 اثرات گالیک‌اسید بدون تابش نور لیزر (تاریکی)

برای بررسی سمیت سلولی گالیک‌اسید بر سلول‌ها در غیاب تابش نور لیزر (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 با غلظت‌های متفاوتی از گالیک‌اسید شامل صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار و به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. میزان مرگ‌ومیر سلولی بااستفاده از تست رنگ‌سنجی MTT بررسی شد و سپس غلظتی از گالیک‌اسید که موجب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی شده بود (IC_{50})، تعیین شد.

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

جهت بررسی اثر لیزر بر سمیت سلولی ایجادشده توسط گالیک‌اسید، ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده از سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی حاوی ۱×۱۰^{۴} سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌ها در معرض تابش لیزر (دستگاه لیزر LX2 Thor) با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر به‌مدت ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی J/cm^2 ۳ قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با مقادیر مشخصی از گالیک‌اسید (صفر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مرگ‌ومیر 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 درمعرض تابش لیزر کم‌توان بودند، تعریف شد.

همچنین در آزمایش دیگری در حضور غلظت صفر و غلظت IC_{50} گالیک‌اسید (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، اثرات تابش لیزر در بازه‌های زمانی متفاوت و با انرژی‌های تابش مختلف ($۱\ J/cm^2$) ۳۰s، ($۲\ J/cm^2$) ۶۰s و ($۶\ J/cm^2$) ۱۸۰s برروی سلول‌های سرطانی انجام شد و بقای سلول‌ها به‌روش MTT اندازه‌گیری گردید. هرآزمایش حداقل سه بار تکرار گردید.

بررسی توان زیستی سلول‌ها به روش MTT

به‌منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT[۲] استفاده شد. در این روش 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 گالیک اسید بعد از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها دو بار با بافر فسفات‌سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از طی شدن زمان موردنظر چاهک‌ها تخلیه شدند و به هرکدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. DMSO به‌عنوان 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 طول‌موج ۵۷۰ نانومتر به‌وسیلهٔ دستگاه الایزاریدر قرائت شد و درصد توان زیستی سلول‌ها در مقایسه با جذب نوری گروه کنترل منفی (سلول‌های بدون گالیک‌اسید) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به‌دست‌آمده تحلیل و برروی نمودار ترسیم شدند.

سنجش کیفی وقوع آپوپتوز با میکروسکوپ فلورسانس (رنگ آمیزی دوگانهٔ اتیدیوم‌بروماید و آکریدین‌اورنج)

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

در این روش از رنگ‌های فلورسانس آکریدین‌اورنج[3] و اتیدیوم‌بروماید[4] 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 اولیهٔ آپوپتوز می‌باشد. اما، درصورتی‌که سلول در مراحل انتهایی آپوپتوز و یا به‌صورت 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 برروی 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 آپوپتوزشده در یک جمعیت سلولی تیمارشده 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[5] (PI) استفاده می‌شود که تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک از سلول‌های نکروتیک را امکان‌پذیر می‌سازد. ازجمله تغییراتی که در مراحل اولیهٔ آپوپتوز رخ می‌دهد، انتقال فسفاتیدیل‌سرین از لایهٔ داخلی غشاء به لایهٔ خارجی می‌باشد. حضور فسفاتیدیل‌سرین در لایهٔ 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 برروی لایهٔ خارجی غشاء مورداستفاده قرار گیرد. اما، ازآنجایی‌که 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. بدین‌ترتیب که پروپیدیوم‌یدید قادر به عبور از غشاء سلول‌های سالم و همچنین سلول‌هایی که در مراحل ابتدایی آپوپتوز هستند (به‌دلیل حفظ تمامیت غشاء پلاسمایی)، نمی‌باشد و تنها وارد سلول‌های نکروتیک می‌شود، به DNA سلول متصل می‌شود و قابل شناسایی در دستگاه فلوسایتومتری 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 به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با تریپسین از کف پلیت جدا و با محلول PBS شستشو داده شدند و به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحلهٔ بعد به رسوب حاصل از سانتریفوژ 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 درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت آنالیز سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت.

در نموداری که دستگاه فلوسایتومتری گزارش می‌دهد: محور X (FL-1)، نمایانگر لگاریتم فلورسانس انکسین V-FITC و محور Y (FL-3)، نمایانگر فلورسانس PI می‌باشد. FITC با نور آبی در طول‌موج ۴۹۳ نانومتر برانگیخته می‌شود و فلورسانس سبز در طول‌موج ۵۲۵ نانومتر ساطع می‌کند. PI با نور سبز- آبی در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر برانگیخته می‌شود و فلورسانس قرمز در طول‌موج 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 به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) گزارش شدند. $P < 0.05$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر سمیت گالیک‌اسید به‌تنهایی 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. درواقع، با افزایش غلظت گالیک‌اسید بقای سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی در یک رفتار وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. به‌طوری که در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید درصد بقای سلول‌ها به‌ترتیب ۸۷، ۵۷ و ۲۳ درصد کاهش ($P < 0.05$) می‌یابد (شکل ۲ الف). به این ترتیب غلظت IC_{50} گالیک‌اسید درحدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

---

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

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

5. Propidium Iodid

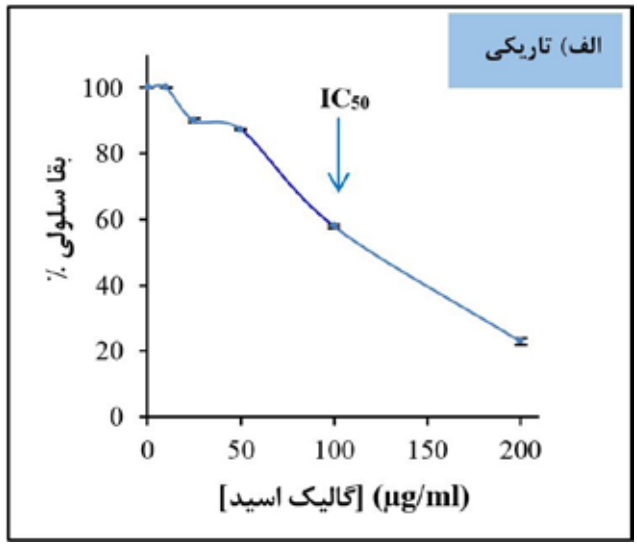
اثر سمیت گالیک‌اسید به‌همراه لیزر کم‌توان (سمیت نوری) بر توان زیستی سلول‌های سرطانی ملانوما

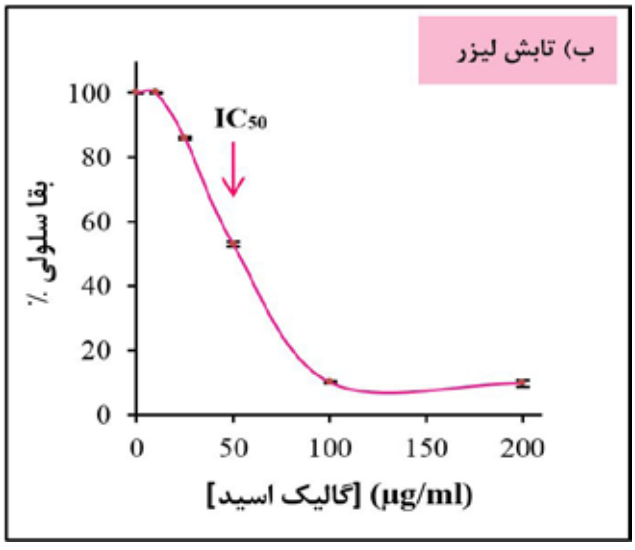
نتایج حاصل از آزمایش بررسی اثر گالیک‌اسید بر سلول‌های سرطانی ملانوما در حضور تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر با انرژی $3\ J/cm^2$ نشان داد که در حالت پیش‌تیمار با لیزر کم‌توان بقاء سلول‌ها تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید به میزان ۹/۷ کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در نمونهٔ کنترل (بدون گالیک‌اسید) بقای سلول‌ها نسبت به حالت تاریکی تغییری نکرده است که نشان‌دهندهٔ بی‌اثر بودن این دوز لیزر کم‌توان بر سلول‌های سرطانی ملانوما است. درحضور تابش لیزر کم‌توان، بقای سلول‌ها در یک رفتار وابسته به غلظت گالیک‌اسید کاهش ($P < 0.05$) می‌یابد، به‌طوری‌که 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).

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 به‌مدت ۳۰ ثانیه و سطح انرژی $1\ J/cm^2$ بقاء سلول‌ها به میزان ۸۸/۴ درصد کاهش یافت. در تابش ۶۰ ثانیه با انرژی $2\ J/cm^2$، بقای سلولی ۸۲/۹ درصد بود و در تابش ۹۰ ثانیه با انرژی تابشی $3\ J/cm^2$، میزان بقای سلول ۵۷ درصد گزارش شد. در نمونهٔ سلولی با ۱۸۰ ثانیه تابش با انرژی تابشی $6\ J/cm^2$، میزان بقای سلول به حدود ۵۵ درصد کاهش یافت (شکل ۳ ب).

سنجش وقوع آپوپتوز

به‌منظور سنجش کیفی وقوع آپوپتوز، سلول‌های تیمارشده با آکریدین‌اورنج / اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسانس و بزرگ‌نمایی x۴۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. همان‌طورکه در شکل ۴ نشان داده شده است، در حضور گالیک‌اسید به تنهایی تعداد



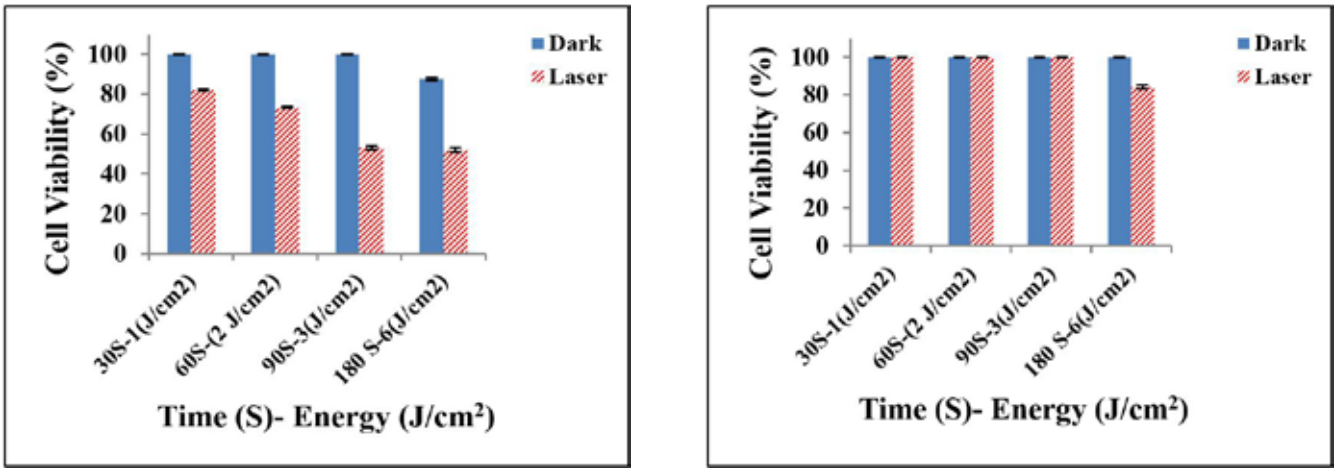


شکل ۲: الف) اثر غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید به‌تنهایی بر سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در تاریکی و ب) تابش لیزر کم‌توان با طول‌موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی $3\ J/cm^2$ بر سلول‌ها و سپس ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید. نتایج به‌صورت میانگین ± SD (n = ۳) نشان داده شده است.

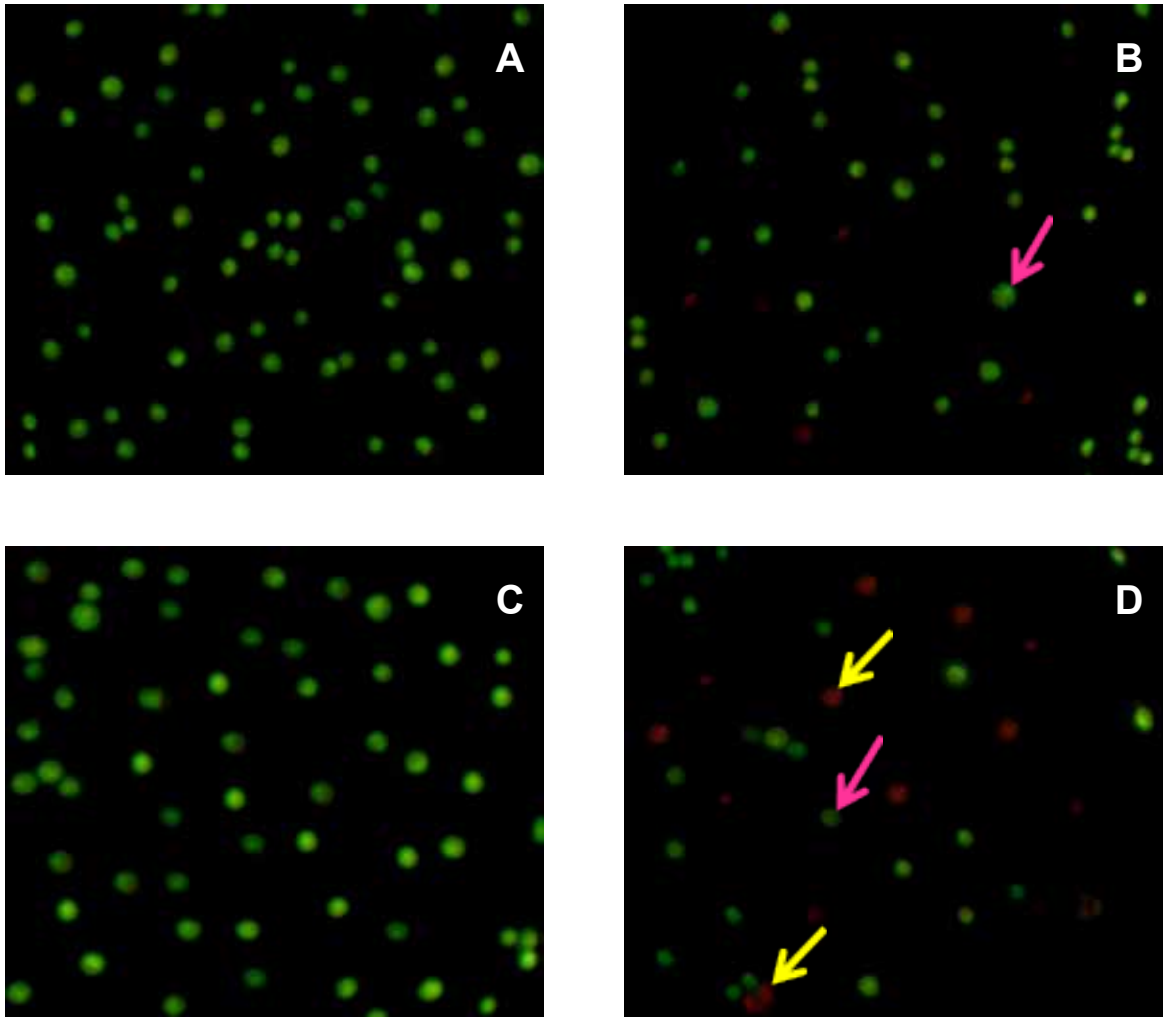
ازآنجاکه IC_{50} گالیک‌اسید (یعنی غلظتی از آن ماده که در آن غلظت ۵۰ درصد از سلول‌ها کشته شده‌اند) برای سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی A375 غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد، بنابراین در ادامهٔ مطالعات، اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر در غلظت‌های صفر و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید بر سلول‌های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

همان‌طورکه 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 $6\ J/cm^2$، تغییرات بسیار کمی در 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 نشان‌دهندهٔ سلول‌های زنده و سلول‌های سبز با کروماتین فشرده نشان‌دهندهٔ آپوپتوز اولیه و سلول‌های نارنجی-قرمز نشان‌دهندهٔ آپوپتوز ثانویه و یا نکروز می‌باشند.

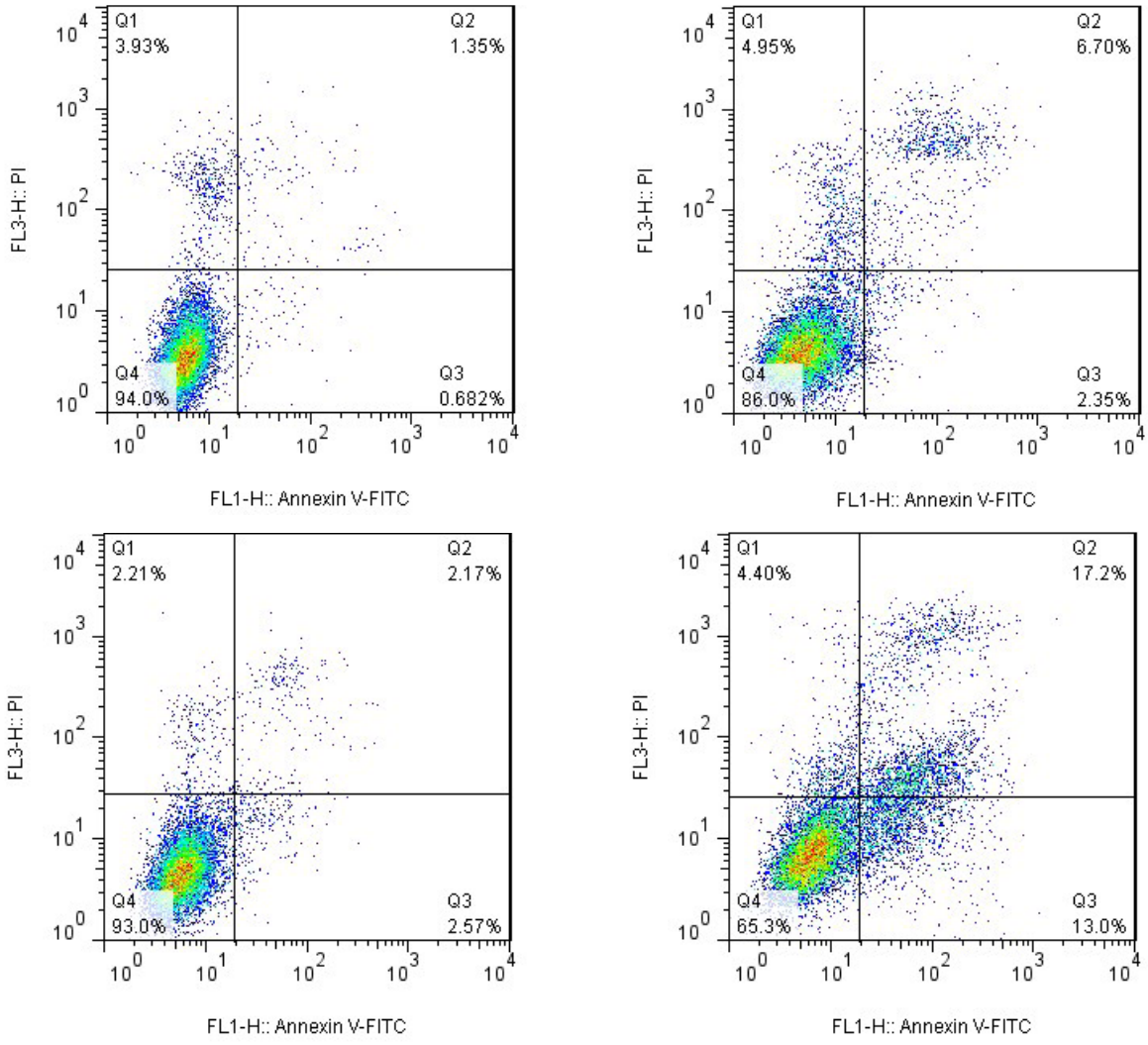
بررسی کمی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در سلول‌های سرطانی ملانوما ردهٔ A375 تحت‌تابش لیزر کم‌توان و تیمار با گالیک‌اسید نشان داد که میزان آپوپتوز در حالت پیش‌تیمار با لیزر و سپس تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گالیک‌اسید نسبت به تاریکی افزایش یافته است (شکل ۵).



شکل۳: اثر انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان (۱، ۲، ۳ و ۶ J/cm^2) بر بقای سلول‌های سرطانی ملانوما انسانی.
الف) بدون حضور گالیک‌اســـید و مقایسه با حالت تاریکی. ب) در معرض غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گالیک‌اسید به‌مدت ۲۴ ساعت و مقایسه با حالت تاریکی. نتایج به‌صورت میانگین ± SD (n = ۳) بیان شده است.



شکل۴: تصاویر میکروسکوپ فلورسانت از سلول‌های سرطانی ملانوما ردهٔ 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.



شکل۵: ارزیابی میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ملانوما ردهٔ 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.

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 بقاء و آپوپتوز سلول‌های سرطانی ملانومای انسانی ردهٔ A375 بررسی گردید.

پلی‌فنول‌ها گروهی از مواد شـــیمیایی هستند که در گیاهان، میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. مطالعات مختلف نشان داده است که رژیم غذایی حاوی ترکیبات فنولی، پتانســـیل پیشگیری از ســـرطان را دارد و ارتباط معکـــوس بین مصرف رژیم غذایی حـــاوی ترکیبات فنولی و خطر ابتلا به سرطان مشاهده شده است[۱۱و۱۲]. گالیک‌اسید رایج‌ترین فنول در میان میوه‌ها، ســـبزیجات، زیتون و چای سبز می‌باشـــد[۱۳]. به لحاظ فعالیت بیولوژیکی، گالیک‌اســـید به‌عنوان یک آنتی‌اکســـیدان 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 ناشـــی از دیس‌لیپیدمی و نیز اثرات آپوپتوزی، ضدتکثیری و ضدتوموری در سرطان پروســـتات موش را نشان داده است[۱۴]. مصرف گیاهان حاوی ترکیباتی نظیر کاتچین، گالیک‌اســـید و کافئین می‌تواند با مهار یا کاهش گلیکاسیون پروتئین‌ها مانند آلبومین مانع از بروز برخی از عوارض بیماری دیابتی گردد. اثر اســـیدگالیک 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 گالیک‌اســـید در ســـلول‌های سرطان ســـینه سه‌گانه (TNBC) که بـــا هورمون‌درمانی هدفمند گیرندهٔ HER2 قرار گرفتند، بررسی شده است. درمان با گالیک‌اسید به‌طور قابل‌توجهی موجب کاهش

میزان سـلول‌های TNBC انسـانی MDA-MB-231 و HS578T می‌شود. علاوه‌براین، گالیک‌اسید باعث کاهش بقاء در سلول‌های MCF-10F می‌شود. گالیک‌اسـید منجر به افزایش نسبت G0/G1 و نسبت فاز زیر G1 در سـلول‌های MDA-MB-231 می‌شـود که می‌تواند به مهار پروتئین G1 و آپوپتوز سـلولی ازطریق پروتئین کینازی که به پروتئین p38 / p21 / p27 متصل اسـت، منتهی گردد. بنابراین پیشنهاد شده است که گالیک‌اسید می‌تواند برای درمان TNBC سودمند باشد. گالیک اسـید رشد سـلول‌های سرطانی ریه را توسـط GSH مهار می‌کند و از طریق کاهش MUP، آپوپتوز و سـطح ROS را تغییر می‌دهد. اسـید گالیک باعث آپوپتوز القایی در پریادیپوسـیت 3T3-L1 و چندین سلول دیگر شده است[۱۶-۱۸].

مطالعهٔ قبلی محمدی و همکاران برروی اثر ترکیب فنولی پاراکوماریک اسید در حضور لیزر کم‌توان بر سلول‌های ملانوما ردهٔ A375 نشان داد که بقای سلول‌های ملانوما ردهٔ A375 در حضور پاراکوماریک‌اسید (تاریکی) در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می‌یابد[۱۹]. در مطالعهٔ ما نیز مشخص شد که بقای سلول‌های ملانومای انسانی ردهٔ A375 درحضور گالیک‌اسید تنها در یک رفتار وابسته به دوز کاهش می‌یابد. بنابراین نتایج مطالعهٔ حاضر با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. علاوه‌برآن در مطالعات قبلی نیز نشان داده شـده است که مشتقات هیدروکسیله و متیلهٔ ترانس‌سینامیک‌اسید، تهاجم و متاستاز ملانوما در ردهٔ C8161 و A375 را مهار می‌نماید[۲۰].

بررسـی اثر لیزر برروی انواع سلول‌های نرمال و سرطانی نشان می‌دهد که اثر لیزر یک اثر یکسان و ثابت نمی‌باشد و بستگی به تیمارهای همراه دارد. باتوجـه به مطالعات مختلف، مکانیسـم اثر لیـزر عبارت‌انداز: لیزر با تأثیر بـرروی کروموفورهای موجود در میتوکندری برروی سـلول 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 تیمـار بخصوص می‌گردد[۲۱]. تابش لیـزر همچنین باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و دفع مواد زاید داخل سلولی و درنتیجه نفوذ مؤثرتر مواد مغذی به داخل سـلول می‌شـود. تابش لیزر موجب افزایش سـنتز آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) در سلول می‌شود. افزایش ATP توسط لیزر کم‌توان ممکن اسـت اجازه دهد که سـلول‌های سرطانی به محرک‌های سـمیت سلولی پروآپوپتوتیک پاسخ دهند و سـیگنال‌های سلولی بعدی درجهت القاء آپوپتوز که به شـدت وابسـته بهATP هستند، با کارآیی بهتری اجرا شود[۲۲]. 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[۲۳].

چنان‌که برخی از مطالعات نشـان داده‌اند، درمان با لیزر کم‌توان ممکن است اثرات سایر درمان‌های سرطانی را تقویت کند[۱۹و۲۷-۲۴]. مطالعهٔ اخیر محمدی و همکاران برروی اثر ترکیب فنولی پاراکوماریک‌اسـید در حضور لیزر کم‌توان بر سـلول‌های ملانوما ردهٔ A375 نشان داد که پیش تیمار سـلول‌های سرطانی ردهٔ A375 با لیزر کم‌توان و سپس تیمار این سلول‌ها با پاراکوماریک‌اسـید، بقاء و رشد سلول‌های ملانوما را نسبت به گروه کنترل (تاریکی) کاهش می‌دهد[۱۹]. در مطالعهٔ حاضر نیز نشـان داده شـد که پیش‌تیمار سـلول‌های سرطانی ملانومای انسـانی با لیزر کم‌توان و سـپس تیمار این سلول‌ها با گالیک‌اسید، بقاء و رشد سلول‌های ملانوما را نسـبت به گروه کنترل (تاریکی) کاهش می‌دهد. این مطالعات نشـان می‌دهد که لیزر کم‌توان به تنهایی قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی ملانوما نمی‌باشد، اما اسـتفاده از لیزر کم‌توان می‌تواند به نوعی نفوذپذیری سلول‌های ملانوما را به ترکیبات فنولی بهبود بخشد و درنتیجه اثر ضدسرطانی آن افزایش می‌یابد.

همچنین در بررسی اثر پیش‌تیمار انرژی‌های مختلف تابش لیزر کم‌توان بر سلول و سپس تیمار با غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید مشخص شد در غلظت IC_{50} گالیک‌اسید (۵۰ $\mu g/mL$) بقای سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد و افزایش دوز تابشـی با کاهش بقای سلولی ارتباط مستقیم دارد. مشاهدهٔ تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمارشده با گالیک‌اسید به‌همراه لیزر کم‌توان یافته‌های به‌دست‌آمده از مطالعهٔ بقای سلولی را تأیید کرد. میزان مرگ‌ومیر سـلولی در سلول‌هایی که در معرض گالیک‌اسید به‌همراه لیزر کم‌توان قرار گرفتند، نسبت به سلول‌های قرارگرفته در تاریکی بیشتر بود.

علاوه‌برآن مطالعات ما برروی مرگ سلولی القاءشده توسط لیزر کم‌توان و گالیک‌اسـید نشـان داد که پیش‌تیمار با لیزر کم‌توان و سپس تیمار با گالیک‌اسید میزان مرگ سلولی از نوع آپاپتوز را افزایش می‌دهد.

در نهایت مطالعات بیشتری در جهت شناخت بهتر مکانیسم‌های سلولی و بیوشـیمیایی لیزر کم‌توان به‌تنهایی و نیز در ترکیب با دیگر روش‌های درمانی در جهت کاربرد این درمان ترکیبی در بالین مورد نیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسـندگان از تمامی افرادی که در انجام ایـن پژوهش کمک کردند، تشکر و قدرانی می‌نمایند.

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, Zanghï¿½ 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 Sova1, ?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.