

## ارزیابی تاثیر تابش لیزر کم توان به همراه ویتامین D در از بین بردن سلول های ملانوما ی پوستی

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه از لیزرهای کم توان می توان برای از بین بردن سلول های سرطانی پوست به دلیل افزایش در القاء اپتوز و افزایش میزان ROS استفاده کرد. ویتامین D در پوست مسیر سیگنالینگ های سرطانی را مهار کرده و رشد تومور را سرکوب می کند. در این مطالعه اثر تابش لیزر کم توان و همچنین نقش ویتامین D در سلول های سرطان ملانوما ی پوست انسانی رده A375 مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان می دهد استفاده از پرتودرمانی با نور لیزر کم توان همراه با ویتامین D می تواند نفوذ سلولی را بهبود بخشد و در نتیجه اثرات ضد سرطانی آن را از طریق القاء اپتوز افزایش دهد.

**روش و بررسی:** مطالعه آزمایشگاهی مداخله ای و در محیط *in vitro* آزمایشگاه کشت سلولی سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ انجام شد. ابتدا کشت سلول های سرطان پوست A375 در محیط کشت ۱۰٪ FBS + DMEM انجام شد. تیمارهای ویتامین D در غلظت های مختلف (۱۰، ۲۵، ۳۵، ۵۰ و میکرومولار) و تیمار لیزر کم توان با دوزهای انرژی مختلف (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۵، ۵۰ ژول بر سانتی متر مربع) بررسی شد و سپس اثر همزمان ویتامین D با غلظت بهینه و لیزر کم توان با دوز بهینه انجام شد و با روش تست MTT و فلوسایتمتری به ترتیب میزان زنده مانایی و میزان اپتوز در اثر این تیمارها بررسی شد.

**یافته ها:** نتایج تیمار ویتامین D با غلظت های مختلف (۱۰، ۲۵، ۳۵، ۵۰ و میکرومولار) در سلول های سرطان پوست رده سلولی A375 نشان داد که تیمار ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار کمترین زنده مانایی و بالاترین میزان اپتوز دارد و همچنین دوز ۲ و ۵ ژول بر سانتی متر مربع نیز کمترین زنده مانایی و بیشترین میزان اپتوز را دارد و استفاده همزمان این تیمارها با یکدیگر اثر هم افزایی را نشان داد.

**نتیجه گیری:** به طور کلی می توان گفت که ویتامین D و لیزر کم توان باعث کاهش بیشتر بقای سلول های سرطانی می شود. بنابراین استفاده از درمان ترکیبی لیزر کم توان و ویتامین D در غلظت و دوز انرژی موثر و بهینه اثرات ضد سرطانی را دارد و نتایج این تحقیق می تواند در درمان سلول های سرطان پوست ملانوما موثر باشد.

**واژه های کلیدی:** ویتامین D، لیزر کم توان LLLT، سرطان پوست، ملانوما، فاکتورهای سلولی، رده سلولی A375

محیا قنبری زرنندی<sup>۱</sup>  
مینا سادات نادری<sup>۲</sup>  
سید مهدی طبایی<sup>۳\*</sup>  
سعید حسامی تکلو<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران  
۲- استادیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران  
۳- دانشیار پوست و مو، گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
۴- استادیار بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران

نویسنده مسئول: سید مهدی طبایی  
پست الکترونیک:

smtabaie@yahoo.com

۰۹۱۲۴۲۶۸۳۷۶

شماره تماس:

## مقدمه

از ۵۰ خال معمولی) یا حتی یک خال غیر معمولی، روی بدن نشان‌دهنده افزایش خطر ملانوم است.

ویتامین‌ها ترکیبات آلی و مواد مغذی ضروری برای رشد، تکامل، تمایز و محافظت از بدن هستند. ویتامین D یک ریزمغذی آلی محلول در چربی است که بدن انسان قادر به سنتز آن نیست. سطح ویتامین D در انسان به اشعه ماوراءبنفش (UVB) و تا حدودی به رژیم غذایی و مکمل‌ها بستگی دارد (۱۴، ۱۳). در میان عملکردهای ویتامین D یکی از مهمترین آنها تقویت سیستم ایمنی بدن است. این اثر باعث افزایش ایمنی ذاتی همراه با تنظیم چندگانه ایمنی اکتسابی است (۱۵). ویتامین‌های D حاصل از قرارگرفتن در معرض آفتاب، مواد غذایی و مکمل‌ها از نظر بیولوژیکی غیرفعال هستند و برای ایجاد شکل فعال ویتامین D باید دو فرایند هیدروکسیلاسیون در بدن بر روی آن‌ها انجام گیرد. اولین واکنش هیدروکسیلاسیون در کبد رخ می‌دهد و ویتامین D را به ۲۵- هیدروکسی ویتامین D تبدیل می‌کند که به «کلسی‌فدیول»<sup>۴</sup> نیز معروف است. دومین واکنش در کلیه‌ها اتفاق می‌افتد و شکلی از ویتامین D را که از نظر فیزیولوژیکی فعال است، ایجاد می‌کند. این ویتامین همچنین به عنوان «کلسی‌تریول»<sup>۵</sup> نیز شناخته می‌شود (۱۷، ۱۶). اثرات ویتامین D پس از سنتز ویتامین D دو نقش عمده دارد اول، به گیرنده هسته‌ای ویتامین (VDR) متصل می‌شود، سپس به گیرنده مشترک RXR خود متصل می‌شود و یک فاکتور رونویسی را تشکیل می‌دهد که بیان بیش از ۳۰۰۰ ژن را فعال می‌کند (۱۸). دوم، در غشای سلولی ویتامین D می‌تواند به یک پروتئین اتصال‌دهنده (PDIA3) متصل شود، جایی که غلظت کلسیم داخل سلولی را تنظیم می‌کند (۲۰، ۱۹). عملکرد مهم دیگر ویتامین D در القاء شکل‌گیری اتصالات بین سلولی توسط پروتئین کیناز C (PKC) است (۲۱). نشان داده شده است که اتصالات داخل سلولی ارتباط تنگاتنگی با سرطان‌زایی، پیشرفت تومور و متاستاز دارند (۲۲). نقش دیگری که ویتامین D در پوست ایفا می‌کند، توانایی در جلوگیری از آسیب رسیدن به DNA در برابر آسیب ناشی

ساختار پوست از یک شبکه پیچیده و یکپارچه تشکیل شده است که بدن را در مقابل اشعه UV، عوامل بیماری‌زا، مواد شیمیایی و آسیب‌های مکانیکی محافظت می‌کند. پوست همچنین دما و میزان آب آزادشده در محیط را تنظیم می‌کند. پوست دارای سه قسمت اصلی اپیدرم، درم و هیپودرم است (۱). اختلالات مختلفی پوست را تحت تاثیر قرار می‌دهد که باعث بیماری می‌شود برخی از این بیماری‌ها جزئی هستند و برخی دیگر می‌توانند حتی زندگی فرد را تهدید کنند. بیماری‌های پوستی بسیار شایع‌اند و در بیش از نیمی از جمعیت بزرگسالان مشاهده می‌شود (۲). شایع‌ترین بیماری‌های پوستی شامل تومورهای خوش‌خیم، آگزما، زگیل‌های ویروسی، بیماری‌های غدد سبابه و عفونت‌های قارچی است (۳، ۲). سرطان پوست همیشه از نظر ابتلاء نسبت به دیگر سرطان‌ها شایع‌تر بوده است. سرطان پوست حاصل رشد غیرطبیعی سلول‌های پوست است و زمانی ایجاد می‌شود که جهش‌هایی در DNA سلول رخ دهد. جهش باعث می‌شود سلول‌ها از کنترل خارج شوند و توده‌های سلول‌های سرطانی را تشکیل دهند (۵، ۴). کشنده‌ترین نوع سرطان پوست ملانوما است که حداقل ۲-۳ میلیون نفر در سال به آن مبتلا می‌شوند. در ملانوما سلول‌های تولیدکننده ملانین (ملانوسیت‌ها) دچار اختلال می‌شود. بروز ملانوم بدخیم در سرتاسر جهان به سرعت در حال افزایش است و این افزایش با سرعت بیشتری نسبت به سرطان‌های دیگر اتفاق می‌افتد. ملانوما همچنین می‌تواند در چشم‌ها و بندرت در بینی یا گلو هم ایجاد شود (۷، ۶). ملانوسیت‌ها از تاج عصبی مشتق شده‌اند. در نتیجه، ملانوما اگرچه معمولاً روی پوست مشاهده می‌شود، اما می‌تواند در مکان‌های دیگری که سلول‌های تاج عصبی مهاجرت می‌کنند، مانند دستگاه گوارش و مغز هم ایجاد شوند (۹، ۸). ملانوسیت‌ها در سطح پایه اپیدرم، قرار دارند و ماده رنگی ملانین را تولید می‌کنند (۱۰). قرار گرفتن بیش از حد در معرض نور ماوراءبنفش (UV)، که از آفتاب و از نورهای تخت‌خواب‌های برنزه ناشی می‌شود، می‌تواند خطر سرطان پوست، از جمله ملانوم را افزایش دهد (۱۲، ۱۱). داشتن خال‌های زیاد (بیش

<sup>۴</sup>Calcifediol

<sup>۵</sup>Calcitriol

<sup>۶</sup>Protein kinase

داخل سلولی می‌شود و منجر به تغییر عوامل رونویسی مربوط به تکثیر سلولی، بقا، ترمیم و بازسازی بافت می‌شود (۳۱،۳۲). لیزر درمانی کم توان می‌تواند منجر به تغییر در مسیر آپتوز شود و باعث کاهش زنده مانایی سلول در سلول‌های ملانوما می‌شود، نتایج نشان داد که درمان با اشعه لیزر کم توان بقا و رشد سلول‌های ملانوما را کاهش می‌دهد (۳۳،۳۴). همچنین مطالعات اخیر نشان داد که تابش لیزر باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه نفوذ موثرتر مواد مغذی و دارو به سلول می‌شود (۳۴،۳۵). مطالعه نادری و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که، تابش لیزر کم توان با دوز انرژی ۵ ژول بر سانتی متر مربع، منجر به افزایش ROS در سلول‌های فیبروبلاست انسانی می‌شود (۳۶). در سال ۲۰۲۰ مقاله‌ای در مورد مکانیسم‌های لیزر کم توان چاپ شده و نتایج آن نشان داد که لیزر کم توان در سلول‌های سرطانی باعث کاهش تکثیر سلولی می‌شود (۳۷). بیدین و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تحقیقاتی انجام دادند و نتیجه تحقیقاتشان نشان داد که تابش نور لیزر باعث کاهش زنده مانایی در رده سلولی سرطانی شده است (۳۸).

با توجه به یافته‌های موجود ویتامین‌های مختلفی خاصیت ضد سرطانی دارند اما به دلیل اینکه ویتامین D در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماری‌های مختلف از متابولیسم استخوان گرفته تا سرطان می‌تواند نقش عظیمی داشته باشد، در دهه‌های اخیر مطالعاتی در زمینه استفاده از ویتامین D در بیماری‌های مختلف نوپلاستی انجام شده است (۳۹). چندین مطالعه نشان داده که رابطه معکوسی بین مصرف ویتامین‌ها و خطر ابتلا به سرطان وجود دارد و همچنین ویتامین D اثر ضد تکثیری و ضد پroliferative دارد (۴۰) و متابولیت فعال و همچنین آنالوگ‌های مصنوعی آن دارای فعالیت ضد سرطانی هستند که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴۱). لیزر به عنوان ابزاری برای درمان بیماری‌ها به کار می‌رود که لیزر کم توان از طریق مکانیسم تحریک زیست نوری عملکرد خود را برای ضایعه‌های پوستی اعمال می‌کند (۴۲). نشان داده شده که ویتامین D مسیر سیگنالینگ‌های سرطانی را مهار کرده و رشد تومور را سرکوب می‌کند و همچنین درمان با اشعه لیزر کم توان بقا و رشد سلول‌های

از اشعه UVB است (۲۳). نشان داده شده است ویتامین D مسیر سیگنالینگ جوجه تیغی (H-HOG) را مهار کرده و رشد تومور را سرکوب می‌کند (۲۴). ویتامین D همچنین در سرطان‌زایی نقش مهمی دارد زیرا از رشد سلول‌های سرطانی در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند (۲۵،۲۶). ویتامین D می‌تواند در تقویت اثرات سیستم ایمنی و حمله به سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد، همانند کراتونیت‌ها و ملانوسیت‌ها که دارای ظرفیت تولید خودمختار از D(OH)1.25 و بندر VD<sup>۱</sup> هستند. چنین تولید محلی ممکن است نقشی در ایمنی پوستی ذاتی و اکتسابی ایفا کند (۲۷،۲۸).

لیزر یکی از ابزارهای مورد استفاده در درمان سرطان پوست است. لیزرهای کم توان، لیزرهایی هستند که اثر حرارتی ندارند و در بیماری مختلف پوستی و کنترل درد به کار می‌رود (۲۹). لیزر درمانی با لیزرهای کم توان (LLLT) یک فناوری با رشد سریع است که در بسیاری از شرایطی که نیاز به ترمیم، تسکین درد و تنظیم التهاب است، استفاده می‌شود (۳۰). اشعه لیزر دارای سه ویژگی مهم است که آن را از نور معمولی متمایز می‌کند. این سه ویژگی عبارت است از: تک فامی<sup>۲</sup>، هم راستایی<sup>۳</sup> و هم دوستی<sup>۴</sup>. مکانیسم اساسی بیولوژیکی در پشت تاثیر LLLT از طریق جذب نور قرمز و NIR<sup>۱۱</sup> توسط کروموفورهای میتوکندری، به ویژه سیتوکروم C اکسیداز (CCO) است که در زنجیره تنفسی واقع در میتوکندری وجود دارد. مکانیسم‌های متعددی در میتوکندری رخ می‌دهد که منجر به تحریک زیستی فرایندهای مختلف می‌شود. فرضیه این است که این جذب انرژی نور ممکن است باعث تجزیه نوری اکسید نیتریک مهاری از CO<sub>2</sub><sup>۱۲</sup> شود که منجر به افزایش فعالیت آنزیم، انتقال الکترون، تنفس میتوکندری و تولید آدنوزین تری فسفات ATP شود. حالت ردوکس سلولی که باعث فعال شدن بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ

<sup>۱</sup>Vitamin D receptor

<sup>۲</sup>Monochromatic

<sup>۳</sup>Collimated

<sup>۴</sup>Coherent

<sup>۱۱</sup>Hypertrophic scar

<sup>۱۲</sup>Cytochrome c

میکرومولار تهیه شد و در بازه زمانی ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی تاثیر داده شد.

#### بررسی اثر لیزر بر سلول‌های سرطان پوست رده A375 :

جهت بررسی اثر لیزر کم‌توان، سلول‌های کشت داده شده به تنهایی و همچنین سلول‌های تیمار شده با ویتامین D در معرض نور لیزر با طول موج ۶۸۵ نانومتر با انرژی‌های ۱ و ۲ و ۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس میزان زنده‌مانایی سلولی و اپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

#### بررسی تکثیر و زنده‌مانایی سلول‌ها :

برای بررسی زنده‌مانایی و تکثیر سلول‌های ملانومای پوستی تحت اثر تیمارهای مختلف ویتامین D و لیزر کم‌توان از تست MTT که یک رنگ‌سنجی به شمار می‌آید، استفاده شد. براساس اطلاعات به دست آمده از تست MTT می‌توان میزان تکثیر و بقای سلول‌ها را پیش و پس از تابش لیزر کم‌توان و ویتامین D بررسی کرد. به این ترتیب که بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تابش لیزر کم‌توان و گذشت ۲۴ ساعت از ویتامین D پلیت سلول‌ها از انکوباتور خارج کرده و میزان یک دهم محیط رویی سلول‌ها به هر چاهک محلول MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفته شد. پس از سپری شدن چهار ساعت محیط رویی پلیت‌ها خارج شد و به هر کدام از چاهک‌ها محلول DMSO اضافه گردید تا کریستال‌های بنفش (فورمازان) (Formazan) ایجاد شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی به چاهک‌های پلیت الیزا منتقل و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه (Elisa reader) (Metertech Inc. M965/965+ VERSION 1.11) با فیلتر رفرانس ۶۲۰ خوانده شد و در صد سلول‌های زنده در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

#### بررسی میزان اپتوز سلولی :

در مرحله اول پس از جدا سازی سلول‌ها از فلاسک، با اضافه کردن ۲ میلی لیتر از محلول PBS در rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و شستشو داده می‌شود تا محیط سلول‌ها حذف شود. پس از

ملانوما را کاهش می‌دهد. مطالعات اخیر نشان داد تابش لیزر باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه نفوذ موثر مواد مغذی و دارو به سلول می‌شود. Annika Schäfer و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با موضوع ارتباط با پلی مورفیسیم‌های مرتبط با متابولیسم ویتامین D و خطر ملانوم و همچنین پیش‌آگهی ملانوم یک مطالعه مورد شاهدهی نشان دادند که ویتامین D نقش مهمی در فعال‌سازی مکانیسم ترمیم DNA پس از تابش اشعه ماوراءبنفش چه در سلول‌های کراتینوسیت و چه در سلول‌های ملانوم دارند (۴۳). همچنین مطالعات اخیر نشان داد که تابش لیزر باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه نفوذ موثرتر مواد مغذی، دارو به سلول می‌شود (۴۴). استفاده از پرتودرمانی با نور لیزر کم‌توان به همراه ویتامین D می‌تواند نفوذ سلولی را بهبود بخشد و در نتیجه اثرات ضدسرطانی آن را از طریق القاء اپتوز افزایش دهد (۴۵).

با توجه به اهمیت نقش ویتامین D و نور لیزر کم‌توان در درمان سلول‌های سرطانی ملانومای پوستی، که در بالا بررسی شد در این مطالعه به تاثیر ویتامین D در غلظت‌های مختلف و لیزر کم‌توان در دوزهای انرژی مختلف و همچنین تاثیر توأم این دو فاکتور در از بین بردن سلول‌های سرطانی رده A375 پرداخته شد.

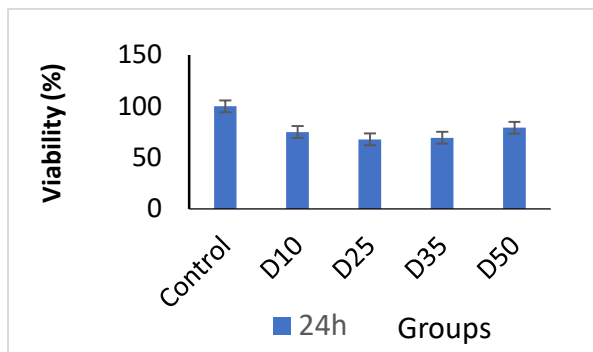
#### روش بررسی

##### کشت سلول:

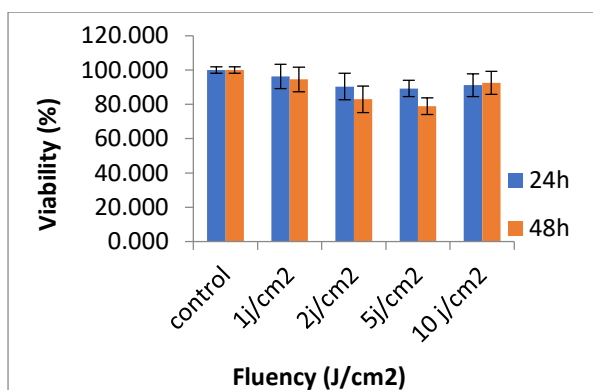
ابتدا سلول رده ملانوما پوستی (A375) پس از تهیه از مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی دفریز شد. جهت کشت سلولی سلول‌های ملانومای پوستی از محیط کشت DMEM + ۱۰٪ FBS استفاده شد. سلول‌ها درون انکوباتور با CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هر ۲۴ ساعت یک بار تعویض محیط کشت صورت گرفت. پس از رسیدن به پاساژ سلولی ۳، تیمارهای ویتامین و لیزر کم‌توان انجام شد.

#### بررسی اثر ویتامین D بر سلول‌های سرطان پوست رده A375 :

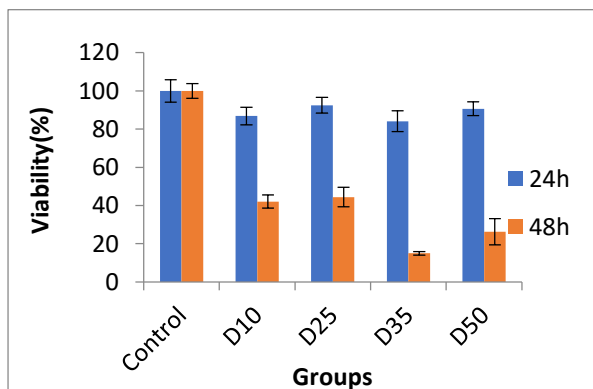
جهت بررسی ویتامین D بر روی میزان زنده‌مانایی و اپتوز سلول‌های ملانوم پوستی، ویتامین D با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۵۰



شکل ۱: زنده مانایی سلول‌های رده سلولی A375 تحت تیمار غلظت‌های مختلف ویتامین D (با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲۴ ساعت



شکل ۲: اثر لیزر کم توان با دوزهای انرژی مختلف (۱، ۲، ۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع) بر زنده مانایی سلول‌های رده A375 در ۲۴ و ۴۸ ساعت



شکل ۳: زنده مانایی سلول‌های رده A375 تحت تیمارهای توأم ویتامین D (با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) و لیزر کم توان با انرژی ۲ ژول بر سانتی‌متر مربع در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت.

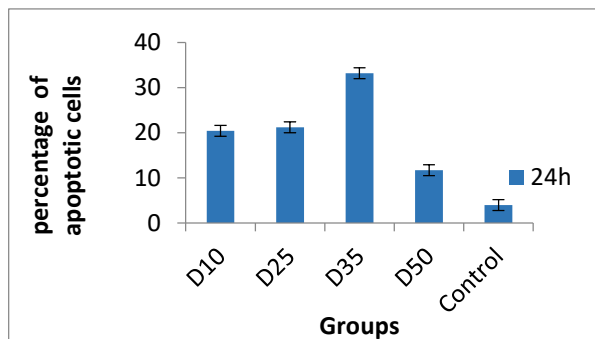
شستشو رسوب سلولی را به وسیله Binding buffer ۱ x به حجم ۵۰۰ میکرولیتر می‌رسانیم. به دلیل اینکه رنگ FITC و pi با یکدیگر هم پوشانی دارند، برای تصحیح و تنظیم هم پوشانی به ۴ لوله از نمونه احتیاج است، پس نمونه را در ۴ لوله تقسیم می‌کنیم. (یک لوله بدون رنگ، یک لوله حاوی رنگ Annexin V-FITC، یک لوله حاوی رنگ PI و لوله آخر حاوی هر دو رنگ FITC، PI) لوله اول که همان سلول بدون رنگ است را به همراه لوله سوم در ۴ درجه نگه می‌داریم.

به لوله دوم و چهارم ۵ μl Annexin V-FITC اضافه می‌کنیم و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه می‌نماییم. پس از اتمام زمان انکوباسیون به لوله‌ها یک میلی‌لیتر از محلول Binding Buffer ۱ X اضافه کرده و در دوره ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم و به رسوب سلولی ۵۰۰ میکرولیتر دیگر Binding Buffer ۱ X اضافه می‌کنیم. در هنگام خوانش نمونه‌ها، به لوله سوم و چهارم ۳ میکرولیتر رنگ PI اضافه می‌کنیم.

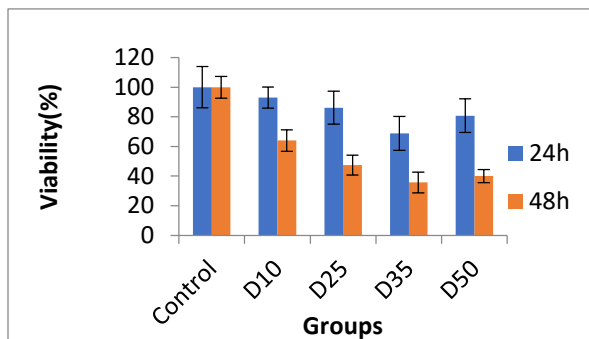
### یافته‌ها

نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول‌های ملانوما پوستی (A375):

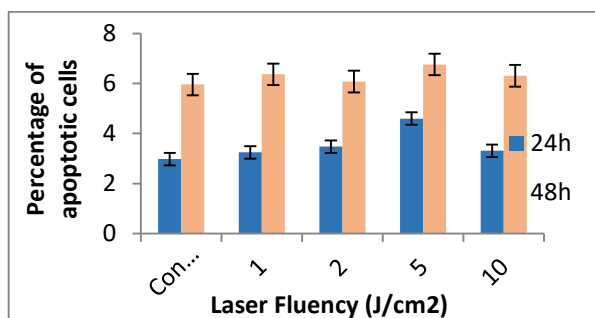
در تیمار با ویتامین D در ۴ غلظت (۱۰، ۲۵، ۳۵، ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲۴ ساعت و همچنین نتایج تیمار لیزر کم توان با دوز انرژی (۱، ۲، ۵، ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع) در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ نتایج تیمار ویتامین توأم با لیزر کم توان در شکل‌های زیر نشان داده شده است.



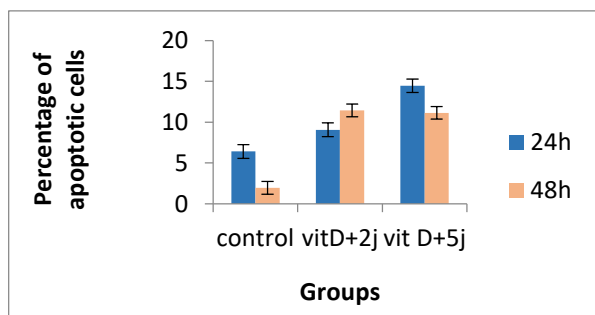
شکل ۵: میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ویتامین D (۱۰، ۲۵ و ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲۴ ساعت



شکل ۴: زنده‌مانایی سلول‌های رده A375 تحت تیمارهای نواماً ویتامین D (با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) و لیزر کم‌توان با انرژی ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت



شکل ۶: میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر دوزهای مختلف لیزر کم‌توان (۱، ۲، ۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع) سلول‌های رده A375 در ۲۴ و ۴۸ ساعت



شکل ۷: میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر توام دوزهای مختلف لیزر کم‌توان (۲ و ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع) و ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار در ۲۴ و ۴۸ ساعت.

نتایج حاصل از تست اپیتوز حاکی از آن است که غلظت ۳۵ میکرومولار از تیمار ویتامین D در بازه زمانی ۲۴ ساعت بیشترین افزایش اپیتوز سلولی را منجر شد و تابش دوز انرژی لیزر ۵ و ۲ ژول بر سانتی‌مترمربع در ۴۸ ساعت بیشترین القاء اپیتوز را به همراه داشته

در تست MTT با توجه به شکل ۱ نتایج حاکی از آن است که تمام غلظت‌های ویتامین D در بازه زمانی ۲۴ ساعت کاهش سلول‌های سرطانی را نشان داد و در غلظت ۳۵ میکرومولار ویتامین D بیشترین کاهش سلول‌های سرطانی را به همراه داشت. با توجه به شکل ۲ تابش لیزر کم‌توان در دوز انرژی لیزر ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع منجر به کاهش سلول‌های سرطانی در بازه زمانی ۴۸ ساعت شده است. شکل ۳ و ۴ نشان‌دهنده کاهش بیشتر زنده‌مانایی سلول‌های ملانومای پوستی تحت اثرات تواماً ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار و نور لیزر کم‌توان با دوزهای انرژی ۲ و ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع است. قابل توجه است که غلظت ۳۵ میکرومولار و دوز انرژی لیزر ۲ ژول بر سانتی‌مترمربع در بازه زمانی ۴۸ ساعت بیشترین تاثیر را در کاهش زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی داشته است.

**نتایج حاصل از تست اپیتوز بر روی سلول‌های ملانومای پوستی:**  
نتایج حاصل از تست اپیتوز بر روی سلول‌های سرطان ملانومای پوست رده (A375) در تیمار با ویتامین D در ۴ غلظت (۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲۴ ساعت در شکل ۵ و همچنین نتایج تیمار لیزر کم‌توان با دوز انرژی (۱، ۲، ۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع) در ۳ بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکل ۶ و نتایج تیمار ویتامین تواماً با لیزر کم‌توان در شکل ۷ نشان داده شده است.

می‌تواند از روش کار در تقویت اثرات سیستم ایمنی درمانی که از سیستم ایمنی بدن برای یافتن و حمله به سلول‌های سرطانی استفاده می‌کند، استفاده کرد، همانند کراتونوسیت‌ها و ملانوسیت‌ها که دارای ظرفیت تولید خودمختار<sup>۳</sup> از D(OH)1.25 و بندر VD هستند. چنین تولید محلی ممکن است نقشی در ایمنی پوستی ذاتی و اکتسابی ایفا کند (۴۸، ۴۹).

در مطالعات اخیر نشان داده شد که ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار زنده‌مانایی سرطان پوست رده (A375) را کاهش داده و نتایج به دست آمده تاییدی بود بر مقاله ذکر شده است. همچنین ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار سلول‌ها را به سمت القاء آپتوز افزایش می‌دهد و مسیر سیگنال‌دهی سلول‌های سرطانی ملانوما را تغییر می‌دهد به نحوی که با ترمیم DNA و همچنین تقویت سیستم ایمنی باعث سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود.

از لیزر کم توان در یک سیستم بیولوژیک برای تقویت بازسازی بافت، کاهش التهاب و تسکین درد استفاده می‌شود. لیزر کم توان به روش درمانی مفید است که از آن برای درمان سرطان پوست می‌تواند استفاده شود (۱). لیزرهای کم توان دارای اثرات فتوشیمیایی است که به معنای جذب نور و ایجاد تغییر شیمیایی است (۵۱، ۵۰). بیدین و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تحقیقاتی انجام دادند و نتیجه تحقیقاتشان نشان داد که تابش نور لیزر باعث کاهش زنده‌مانایی در رده سلولی سرطانی شده است (۳۸). در مطالعه اخیر نتایج حاصل حاکی از آن است که تابش نور لیزر با دوز انرژی ۲ و ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع بیشترین تاثیر را بر زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی رده (A375) دارد و زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد و همچنین باعث افزایش القاء آپتوز سلولی شده است و نتایج حاصل تاییدی بود بر مقاله انجام شده در سال ۲۰۱۶ که ذکر شد.

پان و همکاران گزارش دادند که تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر ROS می‌تواند آپتوز سلولی را برای از بین بردن سلول‌های سرطانی افزایش دهد (۵۲). همچنین مطالعه اخیر نشان داد که ویتامین D با غلظت ۵۰ میکرومولار و دوز انرژی لیزر ۲ و ۵

و در انجام تست تواماً نشان داده شد که غلظت ۳۵ میکرومولار ویتامین D به همراه دوز انرژی لیزر ۲ و ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع باعث افزایش آپتوز سلولی و از بین رفتن سلول‌های ملانومای پوستی شده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

ویتامین D یک ویتامین محلول در چربی است. عملکرد ویتامین D به تولید کلسیم، ساخت و مراقبت از استخوان‌ها کمک کرده و در تنظیم سیستم ایمنی، سلول‌ها و پیشگیری از سرطان مفید می‌باشد. بدن ویتامین D را ذخیره کرده و زمانی که پوست در معرض نور آفتاب قرار می‌گیرد شروع به ساخت ویتامین D می‌کند. ویتامین D یک استروئید ترشحی است که در پوست سنتز می‌شود و به ترتیب در کبد و کلیه متابولیزه می‌شود (۴۶). طبق مطالعات صورت گرفته ویتامین D اثرات ضدسرطانی دارد. در سال ۲۰۱۱ تانگ و همکاران دریافتند که مصرف مکمل روزانه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم کلسیم و ۴۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D باعث کاهش میزان کلی ملانوم در یک آزمایش می‌شود (۴۷). محققان دانشگاه لیزرانگلستان در مطالعات آزمایشگاهی دریافتند که ویتامین D می‌تواند باعث کند شدن روند رشد و توقف و گسترش سرطان پوست ملانوما شود (۲۷). دکتر نیوتن و همکاران در سال ۲۰۱۵ با عنوان مقاله‌ای با موضوع کمبود ویتامین D با پیش‌آگهی ملانوم متاستاتیک همراه است به بررسی بیولوژی سلول ویتامین D در ملانوما پرداخته‌اند و همچنین Del Puerto, C و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با مقاله‌ای با موضوع محور ویتامین D و نقش آن در سرطان‌زایی پوست دریافتند آن‌ها به رفتار سلول‌هایی که فاقد پروتئین موسوم به گیرنده ویتامین D (VDR) بودند پرداختند، و به این نتیجه رسیدند که ویتامین D نمی‌تواند سیگنال‌هایی را به درون سلول ارسال کند مگر اینکه VDR روی سطح خود داشته باشد، تومور در سلول‌هایی با VDR کم، سریع‌تر رشد می‌کند. نیوتن دریافت که در چه زمانی مسیر WNTI BETA-CATININ در ملانوما فعال است و می‌تواند پاسخ ایمن را کاهش دهد و باعث شود سلول‌های ایمنی کمتر به داخل تومور برسند و در ادامه دریافت که اگرچه ویتامین D به خودی خود سرطان را درمان نمی‌کند اما

ژول بر سانتی متر مربع باعث افزایش ROS سلولی شده و سبب افزایش اپتوز سلولی می‌شود.

مطالعه نادری و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد که تابش لیزر کم‌توان با دوز انرژی ۵ ژول بر سانتی متر، منجر به افزایش ROS در سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌شود (۵۳). در مطالعه اخیر نتایج حاکی از آن است که لیزر کم‌توان با دوز انرژی ۲ و ۵ ژول بر سانتی متر مربع باعث افزایش ROS سلول‌های سرطانی شده و در پی آن سلول‌ها را به سمت القاء اپتوز سوق می‌دهد، که نتایج این مطالعه تاییدی بر مقاله ذکر شده در سال ۲۰۲۱ بود.

در مطالعه حاضر که انجام شد نتایج نشان داد که نور لیزر کم‌توان با دوز انرژی ۲ و ۵ ژول بر سانتی متر مربع و همچنین تیمار ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار باعث افزایش تولید ROS و افزایش القاء اپتوز سلولی می‌شود.

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که علاوه بر ویتامین D و تابش لیزر کم‌توان، استفاده همزمان ویتامین D و لیزر کم‌توان منجر به کاهش بیشتر در زنده‌مانایی و افزایش اپتوز سلولی می‌شود. بنابراین استفاده از درمان ترکیبی لیزر کم‌توان و ویتامین D می‌تواند در درمان سلول‌های سرطان پوست ملانومای پوستی موثر باشد. نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌تواند گامی موثر در جهت بهبود روش‌های درمانی محسوب شود. با آگاهی از مکانیسم سلولی و ملکولی تاثیر لیزر کم‌توان و ویتامین D می‌توان به روش بهتر درمانی به ویژه در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان پوست دست یافت.

با توجه به مطالعه انجام شده پیشنهاد می‌شود که مکانیسم‌های سلولی و مولکولی حاصل از ویتامین D و نور لیزر به صورت توأم مورد بررسی قرار گیرد و همچنین این تاثیر هم‌افزایی ویتامین D و نور لیزر در رده‌های سرطانی مختلف بررسی گردد.

## References:

1. McDaniel B, Badri T, Steele RB. Basal Cell Carcinoma. 2018;
2. Zhai H, Maibach HI. Dermatotoxicology. CRC Press; 2004.
3. Howell JY, Ramsev ML. Cancer. squamous cell of the skin. Treasure Island, FL StatPearls Publ. 2020;
4. Brown TM, Krishnamurthv K. Histology, dermis. StatPearls [Internet]. 2020;
5. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: molecular pathogenesis and theraneutic management. Mol Cell Pharmacol. 2014;6(3):228.
6. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Bovle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. Eur J Cancer. 2005;41(1):45–60.
7. Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, Chiarion Sileni V, Montesco MC, Vecchiato A, et al. Melanoma m (zero): diagnosis and therapy. Int Sch Res Not. 2013;2013.
8. Ott PA. Intralesional cancer immunotherapies. Hematol Clin. 2019;33(2):249–60.
9. Tarhini A, Atzinger C, Gunte-Singh K, Johnson C, Macahilig C, Rao S. Treatment patterns and outcomes for patients with unresectable stage III and metastatic melanoma in the USA. J Comp Eff Res. 2019;8(7):461–73.
10. Williams PF, Olsen CM, Havward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: A meta-analysis and estimates of population burden. Int J Cancer. 2011;129(7):1730–40.
11. Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BA, Mihm MC, et al. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. Pediatrics. 1989;84(2):199–204.
12. Janvilisri T, Leelawat K, Rovtrakul S, Paemane A, Tohtong R. Novel serum biomarkers to differentiate cholangiocarcinoma from benign biliary tract diseases using a proteomic approach. Dis Markers. 2015;2015.
13. Prasad KN, Edwards-Prasad J. Effects of toconpherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. Cancer Res. 1982;42(2):550–5.
14. Reichrath J, Rech M, Moeini M, Meese E, Tilgen W, Seifert M. In vitro comparison of the vitamin D endocrine svstem in 1. 25 (OH) 2D3-resnnsive and-Resistant melanoma cells. Cancer Biol Ther. 2007;6(1):48–55.
15. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Snevd MJ, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxvvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. Int J cancer. 2011;128(6):1414–24.
16. Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. Lancet. 2014;383(9919):816–27.
17. Jafarirad S, Hammami Torehabe F, Rasta SH, Salehi R. A novel non-invasive strategy for low-level laser-induced cancer therapy by using new Ag/ZnO and Nd/ZnO functionalized reduced graphene oxide nanocomposites. Artif cells, nanomedicine, Biotechnol. 2018;46(sup2):800–16.
18. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ . 25 (OH) 2vitamin D3: genomic and non-genomic mechanisms. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(4):543–59.
19. Nemere I, Garbi N, Hammerling G, Hintze KJ. Role of the 1. 25D3-MARRS receptor in the 1. 25 (OH) 2D3-stimulated uptake of calcium and phosphate in intestinal cells. Steroids. 2012;77(10):897–902.
20. Piotrowska A, Wierzbicka J, Żmiejewski MA. Vitamin D in the skin physiology and pathology. Acta Biochim Pol. 2016;63(1):17–29.
21. Gordon-Thomson C, Gupta R, Tongkao-on W, Rvan A, Halliday GM, Mason RS. 1 $\alpha$ . 25 Dihydroxvvitamin D 3 enhances cellular defences against UV-induced oxidative and other forms of DNA damage in skin. Photochem Photobiol Sci. 2012;11(12):1837–47.
22. Gniadecki R, Gaikowska B, Hansen M. 1. 25-dihydroxvvitamin D3 stimulates the assembly of adherens junctions in keratinocytes: involvement

- of protein kinase C. *Endocrinology*. 1997;138(6):2241–8.
23. Biilsma MF, Snek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Pennelenbosch MP. Repression of smoothed by natched-dependent (pro-) vitamin D3 secretion. *PLoS Biol*. 2006;4(8):e232.
24. BIKLE DD, ELLISON TI, SMITH MK, GILLIAM AC, MACDONALD PN. Inactivation of the Vitamin D Receptor Enhances Susceptibility of Murine Skin to UV-Induced Tumorigenesis. *Commentary. J Invest Dermatol*. 2008;128(10).
25. Oikawa A, Nakavasu M. Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferols. *FEBS Lett*. 1974;42(1):32–5.
26. Schäfer A, Emmert S, Krunna J, Schubert S, Tzvetkov M, Mössner R, et al. No association of vitamin D metabolism-related polymorphisms and melanoma risk as well as melanoma prognosis: a case-control study. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(5):353–61.
27. Newton-Bishop JA, Davies JR, Latheef F, Randerson-Moor J, Chan M, Gascovne J, et al. 25-Hydroxyvitamin D2/D3 levels and factors associated with systemic inflammation and melanoma survival in the Leeds Melanoma Cohort. *Int J cancer*. 2015;136(12):2890–9.
28. Del Puerto C, Navarrete-Dechent C, Molgó M, Borzutzky A, González S. Vitamin D axis and its role in skin carcinogenesis: a comprehensive review. *Appl Cancer Res*. 2016;36(1):1–8.
29. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silanunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatologic Surg*. 2005;31(3):334–40.
30. Rr A, Parrish JA, PARRISH JA. The optics of human skin. *J Invest*. 1981;7:33–7.
31. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. In: *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. NIH Public Access; 2013. p. 41.
32. Dahmardehei M, Kazemikhoo N, Vaghardoost R, Mokmeli S, Momeni M, Nilfroushzadeh MA, et al. Effects of low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. *Lasers Med Sci*. 2016;31(3):497–502.
33. Khorsandi K, Kianmehr Z, Hosseinzadeh R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1):1–14.
34. Hosseinzadeh R, Khorsandi K, Jahanshahi M. Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2017;184:198–203.
35. Kianmehr Z, Khorsandi K, Mohammadi M, Hosseinzadeh R. Low-level laser irradiation potentiates anticancer activity of n-coumaric acid against human malignant melanoma cells. *Melanoma Res*. 2020;30(2):136–46.
36. Naderi MS, Razaqhi M, Diavid GE, Haiebrahimi Z. A comparative study of 660 nm low-level laser and light emitted diode in proliferative effects of fibroblast cells. *J lasers Med Sci*. 2017;8(Suppl 1):S46.
37. Tam SY, Tam VCW, Ramkumar S, Khaw ML, Law HKW, Lee SWY. Review on the cellular mechanisms of low-level laser therapy use in oncology. *Front Oncol*. 2020;10:1255.
38. Badruzzaman A, Bidin N, Bohari SPM. THE EFFECT OF LASER IRRADIATION ON THE VIABILITY OF HUMAN BREAST CANCER CELL, MDA-MB-231. *J Teknol*. 2016;78(3).
39. Minocha R, Damian DL, Halliday GM. Melanoma and nonmelanoma skin cancer chemoprevention: Arole for nicotinamide? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018 Jan;34(1):5-12. doi: 10.1111/phpp.12328. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28681504.
40. Welsh J. Vitamin D and prevention of breast cancer. *Acta Pharmacol. Sin*. 2007;28:1373–1382. doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00700.x
41. Colston, K.W., Mackay, A.G., James, S.Y., Binderup, L., Chan-der, S.K. and Coombes, R.C. (1992) *Biochem. Pharmacol*. 44, 2273-2280.

42. Bingol U, Altan L, Yurtkuran M. Low power laser treatment for shoulder pain. *Photomedicine and Laser Surg* 2015; 23: 459-464.
43. Schäfer A, Emmert S, Krunna J, Schubert S, Tzvetkov M, Mössner R, et al. Noassociation of vitamin D metabolism-related polymorphisms and melanoma risk as well as melanoma prognosis: a case-control study. *Arch Dermatol Res*. 2012;304:353-6
44. 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 doi: 10.1097/cmr.0000000000000603.
45. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK *Natl J Maxillofac Surg*. 2012 Jul; 3(2):124-32
46. Leventis P, Kiel PDW. The tolerability and biochemical effects of high-dose bolus vitamin D2 and D3 supplementation in patients with vitamin D insufficiency. *Scand J Rheumatol*. 2009;38(analyses of the women's health initiative randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2):149-53.
47. Tang JY, Fu T, LeBlanc E, Manson JE, Feldman D, Linos E, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of nonmelanoma and melanoma skin cancer: post hoc 2011;29(22):3078.
48. Newton-Bishop JA, Davies JR, Latheef F, Randerson-Moor J, Chan M, Gascovne J, et al. 25-Hydroxyvitamin D2 /D3 levels and factors associated with systemic inflammation and melanoma survival in the Leeds Melanoma Cohort. *Int J Cancer*. 2015;136:2890-9
49. Del Puerto, C., Navarrete-Dechent, C., Molegó, M, et al. Vitamin D axis and its role in skin carcinogenesis: a comprehensive review. *Annl Cancer Res* 36, 5 (2016). <https://doi.org/10.1186/s41241-016-0006-4>
50. Einstein A. Zur quantentheorie der strahlung. *Phys Z*. 1917;18:124.
51. Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphase dose response in low level light therapy. *Dose-response*. 2009;7(4): dose-response.
52. Pan J-S, Hong M-Z, Ren J-L. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol WJG*. 2009;15(14):1702.
53. Naderi MS, Tabaie SM, Soheilifar MH, Pornour M. Evaluation of the effect of low-level laser irradiation on viability and ROS production in human hair follicle stem cells. *Tehran University Medical Journal*. 2021; 79(1): 26-32.