لیزر در پزشکی ۱۴۰۰/ دوره ۱۸ / شماره (۳) / صفحات ۲۲-۱۲.

مقاله پژوهشی

ارزیابی تاثیر تابش لیزر کم‌توان به همراه ویتامین D در از بین بردن سلول‌های ملانومای پوستی

محیا قنبری زرندی[۱]
مینا سادات نادری[۲]
سیدمهدی طبایی[۳]*
سعید حسامی تکلو[۴]

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
٤- استادیار بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران

نویسندهٔ مسئول: سیدمهدی طبایی
پست الکترونیک:
smtabaie@yahoo.com

شماره تماس: ۰۹۱۲٤۲٦۸۳۷٦

چکیده

زمینه و هدف: امروزه از لیزرهای کم‌توان می‌توان برای ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی پوست به‌دلیل افزایش در القاء اپپتوز و افزایش میزان ROS استفاده کرد. ویتامین D در پوست مسیر سیگنالینگ‌های سرطانی را مهار کرده و رشد تومور را سرکوب می‌کند. در این مطالعه اثر تابش لیزر کم‌توان و همچنین نقش ویتامین D در سلول‌های سرطان ملانومای پوست انسانی رده A375 مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان می‌دهد استفاده از پرتودرمانی با نور لیزر کم‌توان همراه با ویتامین D می‌تواند نفوذ سلولی را بهبود بخشد و در نتیجه اثرات ضد سرطانی آن را از طریق القاء اپپتوز افزایش دهد.

روش و بررسی: مطالعه آزمایشگاهی مداخله‌ای و در محیط in vitro آزمایشگاه کشت سلولی سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۹-۱٤۰۰ انجام شد. ابتدا کشت سلول‌های سرطان پوست A375 در محیط کشت DMEM +۱۰٪ FBS انجام شد. تیمارهای ویتامین D در غلظت‌های مختلف (۳۵،۲۵،۱۰ و۵۰ میکرومولار) و تیمار لیزر کم‌توان با دوزهای انرژی مختلف (۱۰،۵،۲،۱ ژول بر سانتی‌مترمربع) بررسی شد و سپس اثر همزمان ویتامین D با غلظت بهینه و لیزر کم‌توان با دوز بهینه انجام شد و با روش تست MTT و فلوسایتومتری به ترتیب میزان زنده مانایی و میزان اپپتوز در اثر این تیمارها بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج تیمار ویتامین D با غلظت‌های مختلف (۳۵،۲۵،۱۰و۵۰ میکرومولار) در سلول‌های سرطان پوست رده سلولی A375 نشان داد که تیمار ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار کمترین زنده مانایی و بالاترین میزان اپپتوز دارد و همچنین دوز ۲ و ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع نیز کمترین زنده مانایی و بیشترین میزان اپپتوز را دارد و استفاده همزمان این تیمارها با یکدیگر اثر هم‌افزایی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی می‌توان گفت که ویتامین D و لیزر کم‌توان باعث کاهش بیشتر بقای سلول‌های سرطانی می‌شود. بنابراین استفاده از درمان ترکیبی لیزر کم‌توان و ویتامین D در غلظت و دوز انرژی موثر و بهینه اثرات ضدسرطانی را دارد و نتایج این تحقیق می‌تواند در درمان سلول‌های سرطان پوست ملانوما موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین D، لیزر کم‌توان LLLT، سرطان پوست، ملانوما، فاکتورهای سلولی، رده سلولی A375

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

مقـدمه

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 جزیی 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، اگزما، زگیل‌های ویروسی، بیماری‌های غدد سبابه و عفونت‌های قارچی است(۲،۳). 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(٤،٥).کشنده ترین نوع سرطان پوست ملانوما است که حداقل ۲-۳ میلیون نفر در سال به آن مبتلا می‌شوند. درملانوما 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(٦،٧).ملانوسیت‌ها از تاج عصبی مشتق شده‌اند. درنتیجه، 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(۸،۹) 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(۱۱،۱۲). داشتن خال‌های زیاد (بیش از ۵۰ خال معمولی) یا حتی یک خال غیرمعمولی، 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(۱۳،۱٤). 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»[٤]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»[٥] نیز شناخته می‌شود(۱٦،۱۷).اثرات ویتامین D پس از سنتز ویتامین D دو نقش عمده دارد اول، به گیرنده هسته‌ای ویتامین D (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(۱۹،۲۰). عملکرد مهم دیگر ویتامین D در القاء شکل‌گیری اتصالات بین‌سلولی توسط پروتئین کیناز C(PKC)[٦]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

[٤] Calcifediol
[٥] Calcitriol
[٦] Protein kinase

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

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(۲٤). ویتامین D همچنین در سرطان‌زایی نقش مهمی دارد زیرا از رشد سلول‌های سرطانی در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند(۲٦،۲٥). ویتامینD می‌تواند در تقویت اثرات سیستم ایمنی و حمله به سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد، همانند کراتونسیت‌ها و ملانوسیت‌ها که دارای ظرفیت تولید خودمختار از D(OH)1.25 و بندر VD[۷]هستند. چنین تولید محلی ممکن است نقشی در ایمنی پوستی ذاتی و اکتسابی ایفا کند(۲۸،۲۷).

لیزر یکی از ابزارهای مورد استفاده در درمان سرطان پوست است. لیزرهای کم‌توان، لیزرهایی هستند که اثر حرارتی ندارند و در بیماری مختلف پوستی و کنترل درد به کار می‌رود(۲۹). لیزردرمانی با لیزرهای کم‌توان (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: تک‌فامی[۸] هم‌راستایی[۹] و هم‌دوستی:[۱۰] مکانیسم اساسی بیولوژیکی در پشت تاثیر LLLT از طریق جذب نور قرمز و NIR[۱۱] توسط کرومافورهای 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 CCO2[۱۲]شودکه منجر به افزایش فعالیت آنزیم، انتقال الکترون، تنفس میتوکندری و تولید آدنوزین تری‌فسفات ATP شود. حالت ردوکس سلولی که باعث فعال‌شدن بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی می‌شود و منجر به تغییر عوامل رونویسی مربوط به تکثیر سلولی، بقا، ترمیم و بازسازی بافت می‌شود(۳۲،۳۱). لیزردرمانی کم‌توان می‌تواند منجر به تغییر در مسیر اپیتوز شود و باعث کاهش زنده مانایی سلول در سلول‌های ملانوما می‌شود، نتایج نشان داد که درمان با اشعه لیزر کم‌توان بقا و رشد سلول‌های ملانوما را کاهش می‌دهد(۳٤،۳۳). همچنین مطالعات اخیر نشان داد که تابش لیزر باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه نفوذ موثرتر مواد مغذی و دارو به سلول می‌شود(۳٥،۳٤). مطالعه نادری و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که، تابش لیزر کم‌توان با دوز انرژی ٥ ژول بر سانتی‌مترمربع، منجر به افزایش ROS در سلول‌های فیبروبلاست انسانی می‌شود(۳٦). در سال ۲۰۲۰ مقاله‌ای در مورد مکانیسم‌های لیزر کم‌توان چاپ شده و نتایج آن نشان داد که لیزر کم‌توان در سلول‌های سرطانی باعث کاهش تکثیر سلولی می‌شود(۳۷). بیدین و همکارانش در سال ۲۰۱٦ تحقیقاتی انجام دادند و نتیجه تحقیقات‌شان نشان داد که تابش نور لیزر باعث کاهش زنده‌مانایی در رده سلولی سرطانی شده است(۳۸).

با توجه به یافته‌های موجود ویتامین‌های مختلفی خاصیت ضدسرطانی 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 نئوپلاستی 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 ضدتکثیری و ضدپرولیفراتیو دارد(٤۰) و متابولیت فعال و همچنین آنالوگ‌های مصنوعی آن دارای فعالیت ضدسرطانی هستند که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(٤۱). لیزر به عنوان ابزاری برای درمان بیماری‌ها به کار می‌رود که لیزر کم‌توان از طریق مکانیسم تحریک زیست نوری عملکرد خود را برای ضایعه‌های پوستی اعمال می‌کند(٤۲). نشان داده شده که ویتامین D مسیر سیگنالینگ های سرطانی را مهار کرده و رشد تومور را سرکوب می‌کند و همچنین درمان با اشعه لیزر کم‌توان بقا و رشد سلول‌های

---

[۷] Vitamin D receptor
[۸] Monochromatic
[۹] Collimated
[۱۰] Coherent
[۱۱] Hypertrophic scar
[۱۲] Cytochrome c

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

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 مورفیسم‌های مرتبط با متابولیسم ویتامین D و خطر ملانوم و همچنین پیش‌آگهی ملانوم یک مطالعه مورد شاهدی 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(٤٣). همچنین مطالعات اخیر نشان داد که تابش لیزر باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌ها و در نتیجه نفوذ موثرتر مواد مغذی، دارو به سلول می‌شود(٤٤). 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 اپپتوز افزایش دهد(٤٥).

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 تواماً 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 لیزردر پزشکی جهاد دانشگاهی دفریز شد. جهت کشت سلولی سلول‌های ملانومای پوستی از محیط کشت DMEM +۱۰٪ FBS استفاده شد. سلول‌ها درون انکوباتور با CO2 ٪۵ و دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هر ٢٤ ساعت یک بار تعویض محیط کشت صورت گرفت. پس از رسیدن به پاساژ سلولی۳، 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 اپپتوز سلول‌های ملانوم پوستی، ویتامین D با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۵۰ میکرومولار تهیه شد و در بازه زمانی ٢٤ 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 تیمارشده با ویتامین D در معرض نور لیـــزر با طول موج ٦٨٥ نانومتر با انرژی‌های ۱ و ۲ و۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع در دو بازه زمانی ٢٤ و ٤٨ ساعت قرار گرفتند و سپس میزان زنده‌مانایی سلولی و اپپتوز 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 ٢٤ و ٤٨ ساعت از تابش لیزر کم‌توان و گذشت ٢٤ 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 ٤ ساعت در انکوباتور قرار گرفته شد. پس از سپری‌شدن 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 الایزا 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 ٦٢٠ خوانده شد و در صد سلول‌های زنده در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی میزان اپپتوز سلولی :

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

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

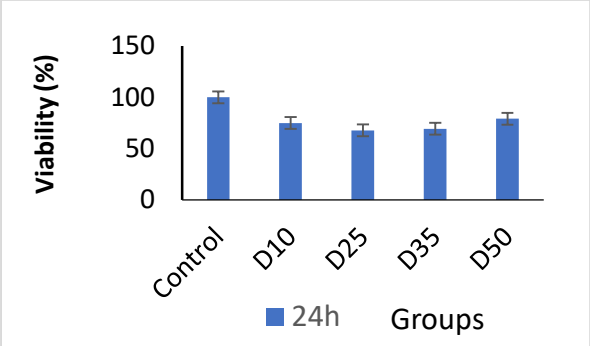
شستشو رسوب سلولی را به وسیله Binding buffer x ۱به حجم ۵۰۰ میکرولیتر می‌رسانیم. به دلیل اینکه رنگ FITC وpi با یکدیگر هم‌پوشانی دارند، برای تصحیح و تنظیم هم‌پوشانی به ۴ لوله از نمونه احتیاج است، پس نمونه را در ۴ لوله تقسیم می‌کنیم. (یک لوله بدون رنگ،یک لوله حاوی رنگ Annexin V-FITC، یک لوله حاوی رنگ PI و لوله اخر حاوی هر دو رنگ FITC،(PI) لوله اول که همان سلول بدون رنگ است را به همراه لوله سوم در ٤ درجه نگه می‌داریم.

به لوله دوم و چهارم ٥ µl ،Annexin V-FITC اضافه می‌کنیم و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه می‌نماییم. پس از اتمام زمان انکوباسیون به لوله‌ها یک میلی‌لیتر از محلول X Binding Buffer ۱ اضافه کرده و در دوره rpm ۱۵۰۰به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم و به رسوب سلولی ۵۰۰ میکرولیتر دیگر X Binding Buffer ۱ اضافه می‌کنیم. در هنگام خوانش نمونه‌ها، به لوله سوم و چهارم ۳ میکرولیتر رنگ PI اضافه می‌کنیم.

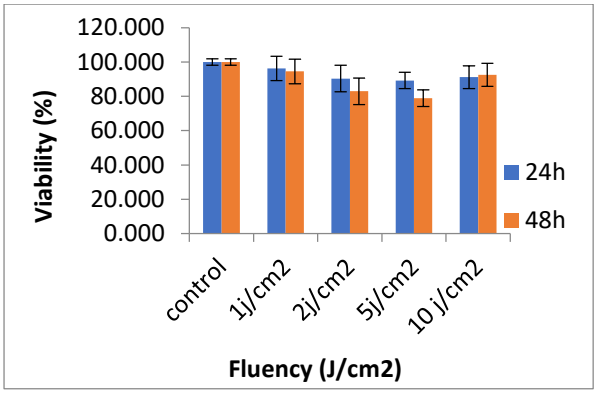
یافتـه‌ها

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

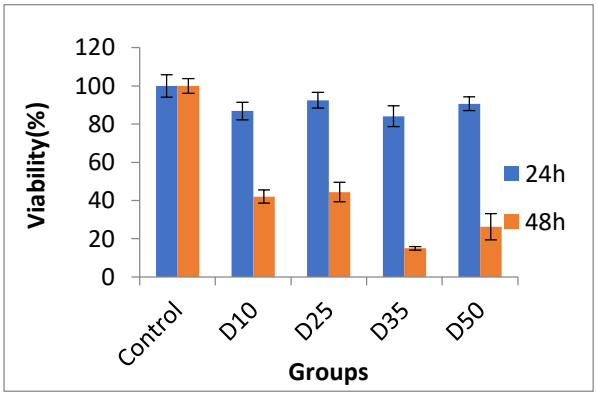
در تیمار با ویتامین D در ٤ غلظت (۳۵،۲۵،۱۰، ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲٤ ساعت و همچنین نتایج تیمار لیزر کم‌توان با دوز انرژی (۱،۲، ۵، ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع) در دو بازهای زمانی ۲٤ و ٤۸ نتایج تیمار ویتامین تواماً با لیزر کم‌توان در شکل‌های زیر نشان داده شده است.



شکل ۱: زنده مانایی سلول‌های رده سلولی A375تحت تیمار غلظت‌های مختلف ویتامین D(با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲٤ ساعت

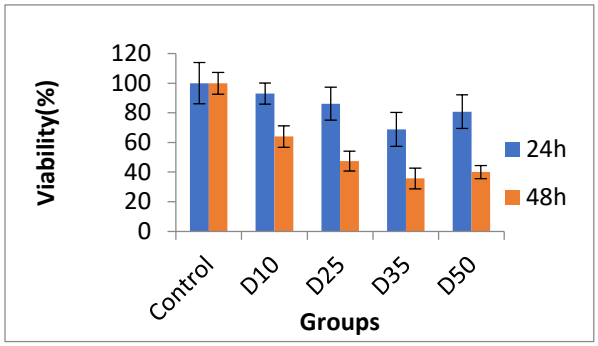


شکل ۲ : اثر لیزر کم‌توان با دوزهای انرژی مختلف (۱، ۲، ۵ و ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع) بر زنده‌مانایی سلول‌های رده A375 در ۲٤ و ٤۸ ساعت



شکل ۳ : زنده‌مانایی سلول‌های رده A375تحت تیمارهای تواماً ویتامین D (با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) و لیزر کم‌توان با انرژی ۲ ژول بر سانتی‌مترمربع در دو بازه زمانی ۲٤ و ٤۸ ساعت.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

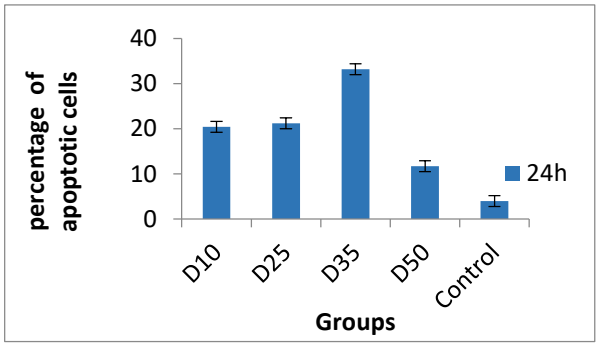


شکل ٤: زنده‌مانایی سلول‌های رده A375تحت تیمارهای تواماً ویتامین D (با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) و لیزر کم‌توان با انرژی ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع در دو بازه زمانی ۲٤ و٤۸ ساعت

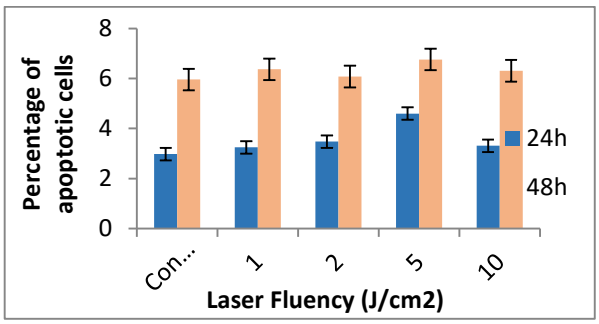
در تست MTT با توجه به شکل ۱ نتایج حاکی از آن است که تمام غلظت‌های ویتامین D دربازه زمانی ۲٤ ساعت کاهش سلول‌های سرطانی را نشان داد و در غلظت ۳۵ میکرومولار و یتامین D بیشترین کاهش سلول‌های سرطانی را به همراه داشت. با توجه به شکل ۲ تابش لیزر کم‌توان در دوز انرژی لیزر ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع منجر به کاهش سلول‌های سرطانی در بازه زمانی ٤۸ ساعت شده است. شکل ۳ و ٤ 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 ٤۸ ساعت بیشترین تاثیر را در کاهش زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی داشته است.

نتایج حاصل از تست اپیتوز بر روی سلول‌های ملانومای پوستی:

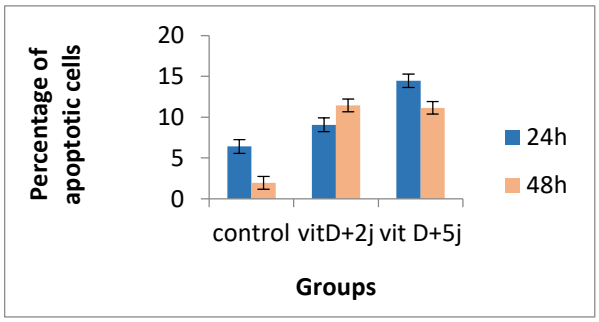
نتایج حاصل از تست اپیتوز بر روی سلول‌های سرطان ملانومای پوست رده (A375) در تیمار با ویتامین D در ٤ غلظت (۱۰، ۲۵، ۳۵ و ۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲٤ ساعت در شکل ۵ و همچنین نتایج تیمار لیزر کم‌توان با دوز انرژی (۱، ۲، ۵ و۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع) در ۳ بازهای زمانی ۲٤ و٤۸ ساعت در شکل ٦ و نتایج تیمار ویتامین تواما با لیزر کم‌توان در شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۵ : میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ویتامین D (۱۰و۲۵ و۳۵ و۵۰ میکرومولار) در بازه زمانی ۲٤ ساعت



شکل ٦ : میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر دوزهای مختلف لیزر کم‌توان (۱،۲،۵و۱۰ ژول برسانتی‌مترمربع) سلول‌های رده A375 در ۲٤ و ٤۸ ساعت



شکل ۷: میزان اپیتوز سلول‌های رده A375 تحت تاثیر توام دوزهای مختلف لیزر کم‌توان (۲و ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع) و ویتامین D با غلظت ۳۵ میکرومولار در ۲٤ و ٤۸ ساعت.

نتایج حاصل از تست اپیتوز حاکی از آن است که غلظت ۳۵ میکرومولار از تیمار ویتامین D در بازه زمانی ۲٤ ساعت بیشترین افزایش اپیتوز سلولی را منجر شد وتابش دوز انرژی لیزر ۵ و ۲ ژول بر سانتی‌مترمربع در ٤۸ ساعت بیشترین القاء اپیتوز را به همراه داشته

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

و در انجام تست تواماً نشان داده شد که غلظت ۳۵ میکرومولار ویتامین D به همراه دوز انرژی لیزر ۲ و ۵ ژول بر سانتی‌مترمربع باعث افزایش اپیتوز 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(٤٦).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 ٤۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D باعث کاهش میزان کلی ملانوم در یک آزمایش می‌شود(٤٧). محققان دانشگاه لیزر انگلستان 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 ۲۰۱۵با 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 درسال ۲۰۱٦ 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 می‌تواند از روش کار در تقویت اثرات سیستم ایمنی درمانی که از سیستم ایمنی بدن برای یافتن و حمله به سلول‌های سرطانی استفاده می‌کنند، استفاده کرد، همانند کراتونسیت‌ها و ملانوسیت‌ها که دارای ظرفیت تولید خودمختار[۱۳]از D(OH)1.25 و بندر VD هستند. چنین تولید محلی ممکن است نقشی در ایمنی پوستی ذاتی و اکتسابی ایفا کند(٤٨،٤٩).

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 اپیتوز 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 کم‌توان در یک سیستم بیولوژیک برای تقویت بازسازی بافت، کاهش التهاب و تسکین درد استفاده می‌شود. لیزر کم‌توان یه روش درمانی مفید است که از آن برای درمان سرطان پوست می‌تواند استفاده شود(۱). لیزرهای کم‌توان دارای اثرات فتوشیمیایی است که به معنای جذب نور و ایجاد تغییر شیمیایی است(٥۰،٥۱). بیدین و همکارانش در سال ۲۰۱٦ 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 سانتی‌مترمربع بیشترین تاثیر را بر زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی رده (A375) دارد و زنده‌مانایی سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد و همچنین باعث افزایش القاء اپیتوز سلولی شده است و نتایج حاصل تاییدی بود بر مقاله انجام شده در سال ۲۰۱٦ که ذکر شد.

پان و همکاران گزارش دادند که تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر ROS می‌تواند اپیتوز سلولی را برای از بین بردن سلول‌های سرطانی افزایش دهد(٥۲). همچنین مطالعه اخیر نشان داد که ویتامین D با غلظت ٥۰ میکرومولار و دوز انرژی لیزر ۲ و ٥

[۱۳] Autonomous

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

ژول بر سانتی‌مترمربع باعث افزایشROS سلولی شده و سبب افزایش اپپتوز سلولی می‌شود.

مطالعه نادری و همکاران در سال ۲۰۲۱نشان داد که تابش لیزر کم‌توان با دوز انرژی ۵ ژول بر سانتی‌متر، 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 سانتی‌مترمربع باعث افزایش ROS سلول‌های سرطانی شده و در پی آن سلول‌ها را به سمت القاء اپپتوز 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 سانتی‌مترمربع و همچنین تیمار ویتامین Dبا غلظت ۳۵ میکرومولار باعث افزایش تولید ROS و افزایش القاء اپپتوز 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 اپپتوز 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 تواماً مورد بررسی قرار گیرد و همچنین این تاثیر هم‌افزایی ویتامین D و نور لیزر در رده‌های سرطانی مختلف بررسی گردد.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

References:

1. McDaniel B, Badri T, Steele RB. Basal Cell Carcinoma. 2018;

2. Zhai H, Maibach HI. Dermatotoxicology. CRC Press; 2004.

3. Howell JY, Ramsey ML. Cancer, squamous cell of the skin. Treasure Island, FL StatPearls Publ. 2020;

4. Brown TM, Krishnamurthy K. Histology, dermis. StatPearls [Internet]. 2020;

5. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: molecular pathogenesis and therapeutic management. Mol Cell Pharmacol. 2014;6(3):228.

6. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle 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 in (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, Gupte-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, Hayward 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, Roytrakul S, Paemanee 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 tocopherol (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 system in 1, 25 (OH) 2D3-responsive and–Resistant melanoma cells. Cancer Biol Ther. 2007;6(1):48–55.

15. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin 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 Torghabe E, 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 1α, 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, Żmijewski 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, Ryan A, Halliday GM, Mason RS. 1α, 25 Dihydroxyvitamin 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, Gajkowska B, Hansen M. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 stimulates the assembly of adherens junctions in keratinocytes: involvement

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

of protein kinase C. Endocrinology. 1997;138(6):2241–8.

23. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of smoothened by patched-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, Nakayasu M. Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferols. FEBS Lett. 1974;42(1):32–5.

26. Schäfer A, Emmert S, Krupp 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, Gascoyne 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, Silapunt 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, Nilforoushzadeh 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, Jahanshiri 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 p-coumaric acid against human malignant melanoma cells. Melanoma Res. 2020;30(2):136–46.

36. Naderi MS, Razzaghi M, Djavid GE, Hajebrahimi 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.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]

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, Krupna J, Schubert S, Tzvetkov M, Mössner R, et al. Noassociation of vitamin D metabolism-related polymorphisms and melanomarisk as well as melanoma prognosis: a case-control study. Arch DermatolRes. 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, Kiely 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,Gascoyne J, et al. 25-Hydroxyvitamin D2 /D3 levels and factors associatedwith systemic inflammation and melanoma survival in the Leeds MelanomaCohort. Int J Cancer. 2015;136:2890–9

49. Del Puerto, C., Navarrete-Dechent, C., Molgó, M. et al. Vitamin D axis and its role in skin carcinogenesis: a comprehensive review. Appl 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. Biphasic 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 laserirradiation on viability and ROS production in human hair follicle stem cells. Tehran University Medical Journal. 2021; 79(1): 26-32.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-04]