

## تأثير مكملات فيتامين د على حالة مثيلا الجين SLC30A10 على خطوط خلايا سرطان القولون

أ.د. محمد امين كراجيان  
جامعة ازاد / مشهد / ايران

سيف رضا غانم

Mustansiriyah University

[mohammadaakerachian@gmail.com](mailto:mohammadaakerachian@gmail.com)

[saedisaiif1365@gmail.com](mailto:saedisaiif1365@gmail.com)

09056239568

07709609667

### المستخلص :

الخلفية: بشكل عام، يعد سرطان القولون والمستقيم ثالث أكثر أنواع السرطان شيوعاً وثاني أكثر أنواع السرطان فتكاً بعد سرطان الثدي والرئة. لم تتم تغطية ارتباط لسرطانات بالتعبير عن جين خروج بريطانيا من الاتحاد الأوروبي. الميثيل هو نوع فرعي من علم الوراثة اللاجينية وبالتالي يمكن تغييره بواسطة مستقبلات الميثيل أو الأدوية المانحة. وفقاً للدراسات الحديثة، فإن جين SLC30A10 مفرط الميثيل في سرطان القولون والمستقيم ويظهر انخفاضاً في التعبير. من ناحية أخرى، تم إجراء العديد من الدراسات حول التأثير اللاجيني لفيتامين د على الجينات المختلفة المسؤولة عن الأمراض والسرطانات المختلفة. لذلك، هدفتنا في هذه الدراسة إلى دراسة التأثير اللاجيني لهذه المادة في خطوط خلايا سرطان القولون والمستقيم SW48 و HT29 على مثيلة هذا الجين.

الطريقة: أولاً، كمية فيتامين د في حدود 0 إلى 250 ملجم من فيتامين د بعد 24 ساعة وتم حساب IC50 لتكون 95 ملجم / مل. تمت معالجة الخلايا باستخدام وسط DMEM و RPMI لمدة 24 ساعة عند 37 درجة مئوية و 5% ثاني أكسيد الكربون مع 25 ملغم/مل فيتامين د. وبعد استخلاص الحامض النووي واختبارات الجودة والكمية، تم إجراء ثنائي كبريتيد العينات. أخيراً، تم تقييم حالة المثيلة للعينات باستخدام بادئات محددة، PCR في الوقت الحقيقي.

النتائج: أظهرت النتائج أن جرعة 95 ملغم من فيتامين د على خلايا HT29 بمستوى معنوي (قيمة P < 0.05) تقلل من مثيلة الجين SLC30A10.

الخلاصة: من المؤمل أن تسلط هذه النتيجة الضوء على علاج جديد لسرطان القولون. ومع ذلك، فإن إدخال فيتامين د كمكمل دوائي فعال لاتفاقية حقوق الطفل يتطلب المزيد من الدراسات. يوصى بدراسة التأثيرات اللاجينية لفيتامين د على الجينات الرئيسية الأخرى في سرطان القولون مثل APC، TP53، KRAS، NRAS، BRAF في خطوط خلايا مختلفة.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون، علم الوراثة، المثيلة، فيتامين د.

### المقدمة :

في عام 2020، بلغ عدد حالات السرطان في جميع أنحاء العالم 19.3 مليوناً، وبلغ عدد الوفيات بسبب السرطان 9.9 مليوناً، منها 1.9 مليون حالة جديدة من سرطان القولون والمستقيم (بما في ذلك الشرج) و 935 ألف حالة وفاة بسببه في جميع أنحاء العالم. بشكل عام، يعد سرطان القولون والمستقيم ثالث أكثر أنواع السرطان شيوعاً وثاني أكثر أنواع السرطان فتكاً بعد سرطان الثدي والرئة. معدل انتشار هذا المرض في الدول المتقدمة أعلى بـ 4 مرات منه في الدول النامية، بينما لا يوجد فرق كبير في معدلات الوفيات لأن معدل الوفيات أعلى في الدول النامية. هناك ما يقرب من تسع فئات إقليمية لسرطان القولون والمستقيم في جميع أنحاء العالم، معظمها في أوروبا وأستراليا / نيوزيلندا وأمريكا

الشمالية، مع احتلال المجر والنرويج المرتبة الأولى بين الرجال والنساء على التوالي. سرطان المستقيم لديه نفس المعدل تقريباً بكل المناطق، على الرغم من أنه لديه أعلى معدل في شرق آسيا. معدل انتشار سرطانات القولون والمستقيم (بما في ذلك المستقيم) أقل في أجزاء من أفريقيا ووسط شمال آسيا [1]. العوامل الوراثية (أنواع الطفرات الموروثة أو الجسدية) والعوامل اللاجينية (التغيرات الموروثة في التعبير الجيني التي ليست نتيجة للتغيرات في تسلسل الحامض النووي وتشمل آليات المثيلة والأسئلة وما إلى ذلك يمكن أن تزيد من خطر الإصابة بالسرطان. أشار [2] في مرحلة ما بعد الحداثة، تعتبر مثيلة الحامض النووي آلية لاجينية يتم فيها نقل مجموعة الميثيل إلى موضع السيتوزين C5 لتكوين السيتوزين 5-ميثيل. ترتبط زيادة المثيلة في مواقع CpG في المروج بتعطيل الجينات وتثبيط النسخ، في حين ترتبط زيادة المثيلة في مواقع CpG في الجين نفسه بنسخ الجينات النشطة [3]. تلعب الجينات المختلفة دوراً في تطور السرطانات، وأهمها الجينات الورمية الأولية، والجينات الكابتة للورم، وجينات رئيسية محددة في كل سرطان؛ على سبيل المثال، أظهرت الأبحاث السابقة أن الجين SLC30A10 زاد من عملية المثيلة في الأنسجة السرطانية مقارنة بالأنسجة القولون السليمة. أظهرت العديد من الدراسات وجود علاقة قوية بين حالة فيتامين د والنتائج السريرية المختلفة [4، 5]. على سبيل المثال، تم إجراء دراسات حول تأثير فيتامين د على أمراض مختلفة مثل سرطان الرئة [6] والخصية [7] والثدي [8] والغدة الدرقية [8] والقولون [9] وغيرها الكثير. لقد تم الآن إثبات تفاعل هذا الجزيء مع 200 إلى 2600 جين [10] على الرغم من توفر طرق الفحص بما في ذلك تنظير القولون، واختبارات الدم الخفي، والأشعة المقطعية، والتصوير بالرنين المغناطيسي، إلا أنه لسوء الحظ يأتي معظم الأشخاص ويتم تشخيص إصابتهم بالسرطان المتقدم. هناك علاقة مباشرة بين مراحل السرطان والانبثاث إذا كانت العلاقة بين الانبثاث ومعدل البقاء على قيد الحياة عكسية. ينخفض معدل البقاء على قيد الحياة لمدة 5 سنوات من 90% للسرطان المقتصر على الأصل الأولي، إلى 71% للسرطان الذي ينتشر إلى العقد الليمفاوية أو الأنسجة المجاورة أو الأعضاء، وإلى 14% للنقائل البعيدة [11]. ومع ذلك، من المهم دراسة تأثير فيتامين د على مستوى تعبير الجين SLC30A10 في الخط الخلوي (HT29) لسرطان القولون. وهذا أمر مهم لأنه، أولاً، لوحظت سابقاً زيادة في مثيلة الجين SLC30A10 في سرطان القولون والمستقيم. إذا أدى فيتامين د إلى تقليل التعبير عن هذا الجين، فقد يساعد في منع حدوثه لدى الأفراد المعرضين للإصابة ويمنع انتكاسة السرطان بعد العلاج. ثانياً، فيتامين د له تأثيرات مفيدة في علاج وبقاء والتشخيص لمختلف أنواع السرطان، بما في ذلك سرطان القولون، ويمكن تفسير الآلية المحتملة لكيفية تأثير فيتامين د المضاد للسرطان، وبالتالي، لم يتم إجراء دراسة مماثلة. لقد تم إثبات العلاقة بين نقص فيتامين د وسرطان القولون، لكن آلية حدوثه لا تزال غير واضحة. فيتامين د له تأثيرات مضادة للالتهابات وينظم العديد من المسارات الخلوية من خلال مستقبله، مثل التغيرات اللاجينية [12]. وفقاً للدراسات حول تأثير الجرعات المناسبة من فيتامين د على التشخيص بعد علاج السرطان [13]، وأن معدل البقاء على قيد الحياة لمرضى السرطان الذين تلقوا كميات كافية من فيتامين د مقارنة بأولئك الذين يعانون من نقص فيتامين د، كان أعلى. [14، 15]، وقد ثبت أن فيتامين د فعال بشكل خاص في علاج سرطان القولون والبقاء عليه والتشخيص [16]، إذا أظهرت النتائج أن جرعة محددة من فيتامين د لها تأثير على تقليل المثيلة فيمكن تقديم سرطان القولون والمستقيم كدواء مرشح للوقاية من السرطان لدى الأشخاص ذوي الخلفيات الوراثية أو علاج السرطان، وللمساعدة في زيادة معدل البقاء على قيد الحياة لسرطان القولون. يعتبر مثيل الحامض النووي سبباً للتنظيم المختلف للتعبير الجيني أثناء التسرطن [17]. يبدو أن مثيلة الحامض النووي تحدث بقدر ما يحدث في تعطيل الجينات المثبطة للورم. في الواقع،

بالمقارنة مع أنواع السرطان البشرية الأخرى، تحدث مثيلة المروج الجيني بشكل متكرر أكثر في سرطانات الجهاز الهضمي [18]. فيتامين D3 هو أهم أنواع فيتامين د الذي يلعب دوراً فسيولوجياً من خلال المستقبل 1,25 (OH) 2D3، المعروف باسم الكالسيتريول [19].

## 2. الطريقة والمواد

الوسط الزراعي الخلية هي عملية زراعة الخلايا بدائية النواة أو حقيقية النواة في وسط الزراعة. يتم تنفيذ هذه العمليات في المختبر وتحت ظروف خاضعة للسيطرة. يمكن أن تكون ظروف زراعة الخلايا مختلفة بالنسبة لأي كائن حي.

### الوسط الزراعي:

يعد الاختيار الدقيق لوسط الاستزراع لزراعة الخلايا الحيوانية أمراً مهماً للغاية ويمكن أن يؤدي إلى استزراع مثالي بمعدل نجاح مرتفع. يعتمد اختيار وسط الزراعة على نوع الخلية والغرض من زراعة تلك الخلية. وسائط زراعة الخلايا عبارة عن مركبات معقدة من الأملاح والكربوهيدرات والفيتامينات والأحماض الأمينية والسلتائف الأيضية وعوامل النمو والهرمونات والعناصر النزرة. على الرغم من أن الشركات المصنعة لوسائط الزراعة مثل Fischer و Sigma توفر ظروف الزراعة المثالية قد اقترحت بعض خطوط الخلايا في وسائط الزراعة الموجودة، إلا أن هناك حاجة لتحسين ظروف الزراعة على أساس كل حالة على حدة. سبب الحاجة إلى هذا التحسين هو عدم اليقين بشأن هوية الخلية المستخدمة، والتغيير في تكيف الخلية الموجودة مع ظروف الزراعة محددة. ولهذا الغرض، ينبغي أيضاً فحص أداء الوسائط الزراعية المختلفة على خلية معينة بشكل تجريبي. إنه يحتوي على وسط استزراع مناسب، وإمدادات من المغذيات، وعوامل النمو وهرمونات النمو، بالإضافة إلى الضغط الأسموزي المناسب ونظام تعديل الرقم الهيدروجيني المناسب. على الرغم من أن عمليات الاستزراع التي تم إجراؤها على مر السنين تم تنفيذها باستخدام البيئات الطبيعية المشتقة من مستخلصات الأنسجة وسوائل الجسم، إلا أن هناك حاجة إلى توحيد جودة وسائط الاستنبات وزيادة جودتها، ويسبب الطلب المتزايد، تم تطوير الوسائط الكيميائية الاصطناعية. في الوقت الحالي، الفئات الثلاثة الرئيسية لوسائط الزراعة هي "الوسط الأساسي"، و"الوسط المصلي المنخفض"، و"الوسط الخالي من المصل"، والذي سيتم وصفه أدناه.

### RPMI 1640:

تعتمد هذه الوسيلة على وسط McCoy's 5A (الذي طوره McCoy et al. 1959) وتم تعديله للاستنبات طويل المدى للخلايا الليمفاوية في الدم المحيطية. ويتميز بمستويات منخفضة من الكالسيوم والمغنيسيوم ومستويات عالية من الفوسفات. تم إدخال العديد من البيئات في مسار تطوير هذه البيئة مثل RPMI 1629 و RPMI 1630 و RPMI 1634. إنها واحدة من الوسائط الأكثر استخداماً على نطاق واسع في الزراعات المعلقة مثل خلايا الدم والخلايا الليمفاوية والأورام الهجينة. كما أنها تستخدم في الزراعات أحادية الطبقة (الخلايا اللاصقة أحادية الطبقة).

**DMEM/F-12:** مزيج (50:50) من وسط هام F12 الغني بمواد كيميائية معينة ووسط DMEM غني بالمواد المغذية ومناسب لاحتياجات أنواع الخلايا المختلفة. وغالباً ما يستخدم كوسيلة أساسية للزراعة الخالية من المصل (Barnes and Sato 1979).

### خط الخلية HT29 و SW48

تم شراء خطوط الخلايا السرطانية الكبيرة HT29 و SW48 من معهد باستور. خطوط خلايا السرطان الغدي هي القولون البشري مع التشكل الظهاري. بالإضافة إلى كونه نموذجاً لأورام الطعوم

الأجنبية لسرطان القولون، يُستخدم هذا الخط الخلوي أيضًا كنموذج لامتصاص الخلايا المعوية ونقلها وإفرازها في الجسم الحي.

تم إجراء التجارب وفقا للتعليمات التالية.  
شروط ذوبان الخلية القابضة المتوسطة

1. قم بإذابة القارورة مع التحريك اللطيف في حمام مائي عند 37 درجة مئوية. لتقليل احتمالية التلوث، تم إبقاء الحلقة الدائرية والغطاء خارج الماء. يجب أن يكون الذوبان سريعًا (حوالي دقيقتين).  
2. بمجرد ذوبان المحتويات، تمت إزالة القارورة من الحمام المائي وتمت إزالة 70% من التلوث عن طريق الغمر أو الرش بالإيثانول. تم إجراء جميع العمليات من هذه المرحلة فصاعدًا في ظل ظروف معقمة شديدة.

3. تم نقل المحتويات إلى أنبوب طرد مركزي يحتوي على 9 مل من وسط الاستزراع الكامل وتم دمجها عند 125 جم لمدة 5-7 دقائق.

4. تم إعادة تعليق كرية الخلايا المكعبة مع وسط الاستزراع ووضعها في دورق استزراع سعة 25 سم<sup>2</sup>. يعد تجنب الكثير من البيئة القلوية أمرًا مهمًا عند استرداد الخلايا. قبل إضافة محتويات القارورة، تم تحضين وعاء الاستزراع الذي يحتوي على وسط الاستزراع الكامل لمدة 15 دقيقة على الأقل عند درجة حموضة عادية (7.6 إلى 7.0).

5. ضع الوسط الاستزراعي في حاضنة مناسبة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية. وقد لوحظ وجود 5% من غاز ثاني أكسيد الكربون في البيئة.  
ظروف الزراعة والتخزين

• يتطلب نموه درجة حرارة 37 درجة مئوية وتركيز 5% ثاني أكسيد الكربون.  
• يجب تخزين النروجين السائل في مرحلة البخار (وليس عند -70 درجة مئوية). التخزين عند -70 درجة مئوية سوف يدمر صلاحيته تغيير وسط الثقافة خطوط الخلايا هذه لزجة، لذا أخرجنا القارورة من الحاضنة، وخرج السائل ببطء تحت الغطاء. أدخل مستنبت جديد، بما في ذلك مستنبت القاعدة و 10% من مصل الأبقار الجنيني، إلى الحجم المناسب للقارورة. تم تغيير وسط الثقافة 2 إلى 3 مرات في الأسبوع.

ممر قمنا بإزالة وسط الزراعة، تم غسل طبقة الخلية لفترة وجيزة باستخدام 0.25% (وزن / حجم) من التريبسين - 0.53 مم EDTA لإزالة جميع آثار المصل المحتوي على التريبسين، أضف 2.0 إلى 3.0 مل من محلول التريبسين-EDTA إلى الدورق وراقب الخلايا تحت المجهر المقلوب حتى يتم تشتيت طبقة الخلايا (عادةً خلال 5 إلى 15 دقيقة) من قوارير Corning® T-75 (الكتالوج). رقم 430641) مناسب لممر هذا الخط الخلوي. (ملاحظة: لمنع الانكماش أثناء انتظار انفصال الخلايا، لا تقم بتحفيز الخلايا عن طريق تسخينها أو هزها.)

تم تعريض الخلايا التي يصعب شم انفصالها إلى 37 درجة مئوية لتسهيل التشتت.  
تم نقل محتويات الدورق إلى أنابيب مناسبة للطرد المركزي، وبعد ذلك تمت إزالة السائل العلوي وتم إذابة الخلايا في كمية صغيرة من وسط الاستزراع ونقلها إلى قوارير جديدة بنسب 1:3 أو 1:8.  
إضافة 0.6 إلى 8.0 مل مستنبت كامل وماصة بلطف لتفريق الخلايا.  
حضنت عند درجة حرارة 37 درجة مئوية.. حضنت.

### عملية التجميد

1. تمت إزالة وسط الزراعة،
2. استخدمنا الترسين لفصل الخلايا من القارورة،
3. تم طرد محتويات القوارير،
4. تم إذابة الخلايا في وسط استزراع كامل يحتوي على 5% DMSO ووضعها في قوارير مناسبة للتجميد.

### تقييم الكمية الفعالة من فيتامين د. MTT ASSAY

يعني MTT العلاجات الجزيئية المستهدفة ويعني العلاجات الجزيئية المستهدفة. طريقة قياس الألوان لدراسة النشاط الأيضي للخلايا. يمكن أن يعكس إنزيم خلية الأوكسدة المؤكسد (P) H) المعتمد على الخلايا الحية في البيئة في ظل ظروف محددة. هذا الإنزيم، صبغ يختزل النترازوليوم أو 4,5) (3-MTT-ثنائي ميثيل ثيازول-2-بيبل) -2,5- بروميد ثنائي فينيل نترازوليوم، وهو أصفر اللون، إلى فورمازان، وهو غير قابل للذوبان وأرجواني. تم إذابة بلورات فورمازان غير القابلة للذوبان باستخدام DMSO وتم قياس محلول اللون الناتج عن طريق الامتزاز بواسطة قطرة نانوية عند 500-600 نانومتر لإظهار قابلية الخلية للخلايا. يتكون من 4 خطوات:

1. تم صب 104 من الخلايا المحضرة باستخدام وسط زرع في 96 طبقاً جيداً بحجم نهائي قدره 100 ميكرو لتر / بئر.
2. المحتضنة لمدة 24 ساعة،
3. بعد تغيير الوسط الزراعي، تمت إضافة الدواء بجرعات مختلفة (0 إلى 250 ملغم/مل)، وحضنت في وقت مناسب يشمل 24/48/72 ساعة للتعرض.
4. بتركيز نهائي قدره 0.45 مجم/مل من محلول MTT، صب 10 ميكرو لتر لكل بئر،
5. احتضان عند 37 درجة لمدة 1-4 ساعات،
6. حل بلورات فورزان باستخدام 100-200 ميكرو متر من DMSO،
7. باستخدام قطرة نانوية عند 570 نانومتر، قمنا بقراءة الامتصاص وحساب IC50.

### IC50

التركيز المثبط النصف الأقصى (IC50) هو مقياس لفعالية المادة في تثبيط وظيفة بيولوجية أو كيميائية حيوية محددة. IC50 هو قياس كمي لكمية مادة مثبطة معينة (مثل الدواء) المطلوبة للتثبيط، في المختبر لعملية بيولوجية محددة أو مكون بيولوجي بنسبة 50%.

للحصول على IC50، يمكنك استخدام برنامج Excel والبرامج الخاصة، والتي يمكن استخدامها بعضها عبر الإنترنت. طريقة استخدام برنامج Excel بها نسبة خطأ أعلى لأن الأعداد العشرية يتم طرحها وتقسيمها، وأخيراً يجب رسم الرسم البياني والحصول على معادلة الخط بمساعدته، وأخيراً يتم حساب ميل الخط نفسه والقيمة التي فيها 50% من الخلايا هي قيم حية. يتم حساب هل، وهو نفس IC50.

### علاج الخلايا بفيتامين د ودراسة مثيلة الجين SLC30A10

بعد معالجة الخلايا بفيتامين د، تم استخراج الحامض النووي من الخلايا باستخدام مجموعة Zymo وفقاً لتعليمات المجموعة، وتم نقل العينات إلى مُجمد سلبي 80 بعد وضع العلامات.

### استخراج الحامض النووي

تم إجراء استخراج الحامض النووي من الخلايا باستخدام مجموعة Zymo وفقاً لتعليمات المجموعة تقييم كمية ونوعية الحامض النووي المستخرج



من أجل تحديد تركيز الحامض النووي المستخرج والتأكد من نقائه، تم فحص الامتصاص البصري للحامض النووي المستخرج بجهاز قطرة النانو عند الأطوال الموجية 260 و 280 نانومتر. بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام 1% من هلام الاغاروز الكهربائي لتقييم جودة الحامض النووي المستخرج. تحديد نقاء الحامض النووي

يوفر الطول الموجي للامتصاص البالغ 260 نانومتر وحده معلومات قليلة عن نقاء العينة وجودتها. في ظل وجود تلوث البروتين، والتلوث بالمذيبات العضوية والأملاح والكربوهيدرات، تتغير كمية الامتصاص بشكل كبير. ولذلك فإن حساب نسبة الامتزاز من 260 إلى 280 ونسبة 260 إلى 230 يحدد مدى نقاء الأحماض النووية المستخرجة.

بالنسبة لعينات الحامض النووي الريبي (RNA) فإن النسبة من 260 إلى 280 تساوي  $1 \pm 2$  وبالنسبة لعينات الحامض النووي (DNA) النسبة من 260 إلى 280 تساوي 1.8. التركيزات من 260 إلى 280 أقل من 1.8 يشير بشكل عام إلى تلوث البروتين أثناء عملية الاستخراج. إحدى المشاكل في استخراج الحامض النووي الريبي (RNA) والحامض النووي (DNA) هي الإزالة غير الكاملة للبروتينات من مستخلص الخلية. يزيد البروتين من الامتصاص عند 280 طولاً موجياً، وبالتالي تقل نسبة 260 إلى 280 ويفقد الحامض النووي الريبي (RNA). للحصول على أمثلة من الحامض النووي الريبي (RNA) والحامض النووي (DNA). يجب أن تكون نسبة 260 إلى 230 أعلى من 2 وأقل من 2.4. تشير النسبة الأقل من 260 إلى 230 إلى التلوث بالسكريات.

يجب أن تكون نسبة 260 إلى 240 لبعض الأحماض النووية حوالي 1.4، وتستخدم هذه النسبة لتحديد كمية الأملاح. عندما تكون نسبة 260 إلى 240 أقل من 1.4، يجب غسل الأحماض النووية عدة مرات باستخدام 70% إيثانول وأخيراً باستخدام 95% إيثانول.

#### تحديد نوعية الحامض النووي المستخرج

تم إجراء الترحيل الكهربائي لعينات الحامض النووي على هلام الاغاروز 1% باستخدام الترحيل الكهربائي الأفقي لمدة نصف ساعة بجهد 80 فولت. هلام الاغاروز

لضمان نقاء الحامض النووي المنقى، الكهربائي يتم بـ 3 ميكروليتر من الحامض النووي الجينومي المستخرج على هلام الاغاروز 1%.

المواد والمعدات اللازمة

TAE العازلة الكهربائية

DNA Greener العارض الأخضر Agros

عازلة للخدمة الشاقة (X6)

خزان كهربائي، لوحة ومشط هلام مزود الكهرباء طريقة يتم وزن وحل مسحوق الاغاروز بمساعدة الحرارة والتحرك المستمر في حجم مناسب من المخزن المؤقت TAE X 1.

بعد التوضيح، تتم إزالة المحلول من مصدر الحرارة ويترك ليبرد إلى درجة حرارة الغرفة.

يتم وضع المشط في مكانه ويضاف محلول الاغاروز إلى اللوحة. بعد أن يتصلب الجل، تتم إزالة المشط بلطف. تم وضع لوحة تحتوي على الجل داخل خزان الرحلان الكهربائي وتمت إضافة مخزن مؤقت لتغطية بضعة ملليمترات من سطح الجل. تتم إضافة المخزن المؤقت للوزن (X6) إلى العينة بمقدار 0.2 من حجم العينة (تجدد الإشارة إلى أن المخزن المؤقت للوزن يحتوي أيضاً على العارض الأخضر، وهو مطلوب للكشف عن الحامض النووي) ويتم نقله إلى البئر. يكون.

يتم ضبط الجهد على 5 فولت لكل 1 سم من طول الجل (80 فولت) ويتم الحفاظ على التيار حتى يصل اللون الرئيسي للبروموفينول الأزرق إلى حوالي 3/2 من طول الجل. ثم تمت ملاحظة الجل في وثيقة الأشعة فوق البنفسجية بواسطة الأشعة فوق البنفسجية. ببسلفيت العينات المستخرجة في هذه الطريقة، يتم تحويل جميع السيتوزينات غير الميثيلية في عينة الحامض النووي الجينومي إلى يوراسيل عن طريق المعالجة بثنائي كبريتيت الصوديوم، ثم مناطق محددة من الحامض النووي مرتبطة بجزر CpG في المناطق التنظيمية للجين المدروس، بطريقة PCR وباستخدام بادئات محددة مصممة ومستنسخة. تم إجراء عملية إزالة الكبريت من الحامض النووي المستخرج باستخدام مجموعة Zymo وفقاً لتعليمات المجموعة. تفاعل PCR في الوقت الحقيقي للتحقيق في مثيلة الجينات في عينات الأنسجة للتحقيق في حالة مثيلة الجين في هذه الدراسة، يتم استخدام تقنية MSP. في هذه التقنية، يتم أخذ عينات الحامض النووي التي تحتوي على

COMPONENTS	CONCENTRATION	VOLUME
Master mix PCR	1x	5 .L
Primer F ( $\beta$ -actin)	10 <u>pmol</u>	0.2 .L
Primer R ( $\beta$ -actin)	10 <u>pmol</u>	0.2 .L
Probe ( $\beta$ -actin)	5 <u>pmol</u>	0.1 .L
Primer F (SLC)	10 <u>pmol</u>	0.2 .L
Primer R (SLC)	10 <u>pmol</u>	0.2 .L
Probe (SLC)	5pmol	0.1 .L
DNA	100 <u>ng</u>	1 .L
H2O	-	UP TO 10 .L

Table 1. 3 materials and values of real PCR reaction

TEMPERATURE (C)	TIME (SECOND)
94	1200
62	5
58	35
93	30

Table 2. 3 Real-time PCR reaction temperature cycle information

### 3. النتائج

تقييم التأثير السمي لفيتامين د على خطين خلويين HT29, SW48 وبحسب نتائج اختبار MTT، فقد وجد أنه مع زيادة تركيز فيتامين د، ينخفض معدل بقاء الخلايا السرطانية على قيد الحياة. تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها من هذا الاختبار بمساعدة برنامج حاسبة البيانات IC50 وكانت قيمة IC50 95 ملغ

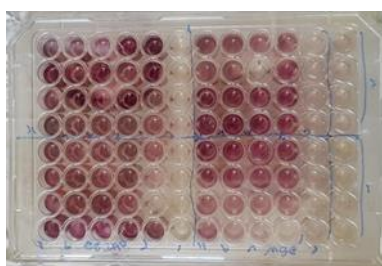


figure 1. 4 MTT assay

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.160	0.140	0.156	0.236	0.286	0.612	0.147	1.333	1.504	0.622	0.604	2.045
B	0.146	0.125	0.482	0.612	0.667	0.699	0.195	0.158	0.833	1.543	0.997	1.377
C	0.137	0.127	0.598	0.552	0.577	1.618	0.171	0.239	2.434	0.850	2.617	1.094
D	0.161	0.132	0.715	0.699	0.647	1.424	0.169	0.686	2.185	1.444	0.643	2.209
E	0.145	0.175	0.640	1.579	1.921	2.417	0.199	1.348	2.767	2.406	2.037	2.759
F	0.131	0.155	0.746	0.781	0.899	2.123	0.134	2.363	2.638	0.550	3.063	1.435
G	0.135	0.146	0.552	0.117	0.892	0.725	0.177	2.497	1.799	1.053	1.316	1.183
H	0.164	0.144	0.715	0.902	0.827	1.476	0.119	1.911	1.249	0.678	1.436	2.158

figure 2 . 4 IC50 results



كمية ونوعية الحامض النووي المستخرج كان استخراج الحامض النووي من جميع العينات ناجحاً. وأظهرت نتائج التحليل الطيفي (الشكل 1) والتفريد للحامض النووي المستخرج على هلام الاغاروز 0.8% (الشكل 2) أن العينات المعينة المستخرجة ذات نوعية وكمية جيدة. وبما أن الحد الأقصى لامتصاص جزيئات الحامض النووي يكون عند الطول الموجي 260 نانومتر ومن ناحية أخرى فإن الحد الأقصى لامتصاص المحاليل البروتينية يرجع إلى وجود الأحماض العطرية عند الطول الموجي 280 نانومتر. لذلك، كانت نسبة امتصاص الضوء عند الطول الموجي 260.280 معياراً مناسباً لتحديد نسبة الحامض النووي / البروتين في العينة، بمعنى آخر، تم استخلاص نقاوة العينة. كما هو مبين في الشكل، تم الحصول على هذه النسبة

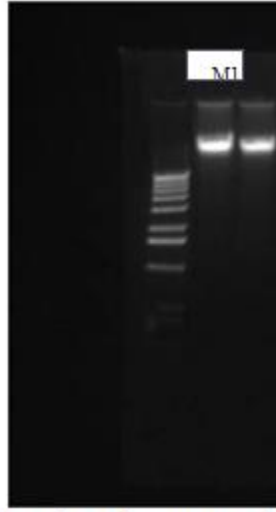


Figure 4. 4 Results of extracted DNA electrophoresis

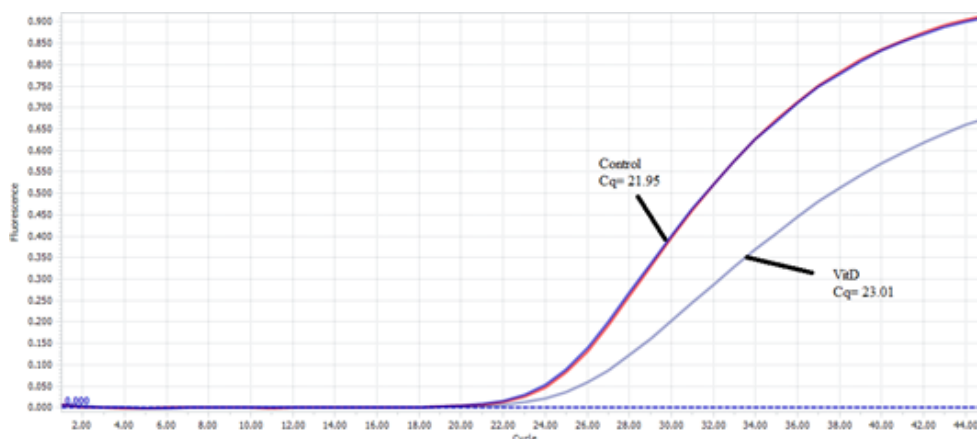
ثم تمت إزالة الكبريت من جميع العينات بنجاح باستخدام (Qiagen (Epitect 96 Bisulfite Kit).  
الإشعال:  
التصميم البادىء  
تم استخدام برنامج 3 Primer لتصميم البادىء وتم فحصهما باستخدام Blast للتأكد من تفرد الاقتران البادىء تم تصميم البرايمر بواسطة شركة بايونير كوريا.  
التحضير البادىء:  
تم طلب البادىء المصمم وتسليمه بالتجميد. لتحضير التمهيدي، مع الأخذ في الاعتبار الكمية الموصى بها من قبل الشركة المصنعة، تمت إضافة الماء المقطر إلى كل البادىء بحيث يكون تركيز البادئات أخيراً في حدود 100 بمول / ماي (تركيز البادىء). تم تحضير محلول التخفيف 10 ميكرومتر واستخدامه كحل عملي. تم تخزين البادىء المذاب عند -20 درجة مئوية.

تسلسل الاشعال المستخدمة في هذه الخطوة:

PRIMER	PRIMER SEQUENCE (5'-3 ')	PIECE LENGTH(BP)
SLC-F	GTGTGTTTGAGCGTCGCT	
SLC-R	CGCGATCGTAACCGTAGATA	100
SLC Probe	TGGGCGTTTTATTTCGAGGTTATAG	

Table 1 . 4 Specifications of primers

تقييم تأثير الجرعة على مثيلة الجين SLC30A10 في خطوط الخلايا HT29 و SW48 في خط الخلايا HT29 كانت النتائج كما يلي:  
 يبلغ معدل Cq لجين التحكم 21.95 SLC30A10 وفي حالة الخلايا المعالجة بفيتامين D، كان Cq 23.01. تشير النتائج إلى أن فيتامين D يمكن أن يكون فعالاً في تقليل مثيلة الجين SLC30A10 وهذا الاختلاف ذو دلالة إحصائية (قيمة  $P < 0.05$ ).



الشكل 5. 4 نتائج فرق مثيلة الجينات SLC30A10 في خط الخلايا HT29

الشكل 6. 4 نتائج دراسة اختلافات مثيلة الجينات SLC30A10 في خط الخلية SW48 أخيراً، يمكن القول أنه إذا تم علاج خطي الخلايا HT29 و SW48 في سرطان القولون والمستقيم بـ 95 ملغ من فيتامين د، فيمكن أن يؤثر ذلك على مثيلة الجين SLC30A10 ويمكن اقتراح فيتامين د كمكمل دوائي فعال في سرطان القولون والمستقيم. أب. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات.

#### المناقشة والاستنتاج :

يعد السرطان السبب الرئيسي الثاني للوفاة بعد أمراض القلب والأوعية الدموية في العديد من المجتمعات والسبب الرئيسي الثاني للوفاة بسبب المرض في إيران، والذي تزايد معدل الإصابة به في العقود الأخيرة. سرطان القولون والمستقيم هو سرطان شائع بين الرجال والنساء. تشير الدراسات إلى أن سرطان القولون والمستقيم هو أكثر أنواع السرطان شيوعاً بعد سرطان الرئة والبروستاتا لدى الرجال وبعد سرطان الثدي لدى النساء [34]. سنوياً، تحدث 4000 حالة جديدة من سرطان القولون والمستقيم، وحالة وفاة واحدة بسببه في إيران [35]. في الوقت الحاضر، يعتبر تنظيف القولون

و FOBT هما الطريقتان الوحيدتان لتشخيص سرطان الأمعاء. وبما أن نصف جميع حالات CRC يتم اكتشافها على مستوى متقدم، فمن المفترض أن تزيد المؤشرات الحيوية الجديدة من دقة اكتشاف CRC. يعد التقييم والتشخيص المبكر أمراً ضرورياً في الإدارة السريرية والعلاجية لاتفاقية حقوق الطفل. تم وصف التغيرات في مثيلة الحامض النووي في اتفاقية حقوق الطفل منذ أكثر من 20 عاماً بواسطة Fearon & Vogelstein. بالمقارنة مع الأنسجة الطبيعية، حتى الأورام الغدية تظهر تغيرات في مثيلة الحامض النووي. تم تحديد العديد من تغيرات المثيلة هذه كمؤشرات حيوية محتملة لـ CRC مثل SEPT9 وNDRG4 و[VIM 36].

أبلغت العديد من التجارب السريرية والدراسات الوبائية عن تأثير فيتامين د على الوقاية والعلاج (العلاج الكيميائي) لسرطان القولون. وجدت دراسة حديثة أن المستويات الأعلى من فيتامين د في الدم ارتبطت بانخفاض خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم، مع التركيز الأمل لفيتامين د OH-25 لتقليل خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم بين 30-40 نانوغرام / مل [37]. على المستوى اللاجيني، يرتبط فيتامين د بمستقبله ويؤثر على التعبير عن الجينات الرئيسية التي تقمع الورم. ارتبطت التأثيرات اللاجينية لفيتامين د بنقص الميثيل في الجينات الرئيسية التي تؤثر على تكوين الأورام مثل P12 وPTEN وCDH1 والجينات الكابتة للورم [38]. إن الدليل على قدرة فيتامين د على تغيير مثيلة الحامض النووي جديد جداً (على الرغم من أنه قد يكون متورطاً في تغيير سلبي في نشاط DNMT1). أفادت دراسة حديثة أن تناول فيتامين د كان مرتبطاً بميثيل مروج الجينات DKK1 لدى مرضى CRC [39]. على الرغم من أن التأثير الرئيسي والمهم لفيتامين د على مثيلة الحامض النووي لم يتم توضيحه بالكامل بعد، فقد أظهرت مجموعة لأول مرة أن المستويات الأعلى من فيتامين د المنتشرة ترتبط بانخفاض مثيلة في مروج الجينات [40] SFRP2.

وبحسب ما ورد تم قبول SLC30A10 لتصنيف الأنماط الجينية المثيلة والعلاقات ذات الأصل الجزيئي في اتفاقية حقوق الطفل [41، 42]. [36] من ناحية أخرى، تم الإبلاغ عن تأثير الجين SLC30A10 على سرطانات الكلى [43] القولون والمستقيم [44] البروستاتا [45]. تعد مثيلة الحامض النووي النفاذلي اكتشافاً لاجينياً مهماً في السرطان، وفي الواقع، تم اكتشافها في معظم الأورام، وبالتالي جذبت الانتباه كمؤشر حيوي محتمل. [42] يمكن استخدام الجينات الميثيلة بشكل غير طبيعي كمؤشرات حيوية للكشف المبكر عن سرطان القولون والمستقيم، مثل تصنيف الورم. [41] في دراسة مقارنة، أدى 78 جيناً من حيث مستوى المثيلة إلى إدخال 3 جينات: SLC30A10 (الإفراط في المثيلة / نقص التنظيم)، INHBA (نقص الميثيل / التنظيم) وCLDN1 (نقص الميثيل / التنظيم) [46]. يرتبط SLC30A10 بالنمط الجيني للمثيلة والمستوى الجزيئي لسرطان القولون والمستقيم. وهي: ABCG2، AQP8، SPIB، CA7، CLDN8، SCNN1B، SLC30A10، CD177، PADI2، TGFBI و ذكر أن دراسة هذه الجينات بواسطة PAM (تحليل التنبؤ للمصفوفات الدقيقة) أظهرت أنها مرشحة جيدة لتقدير خطر الإصابة بـ CRC [47]. مثال آخر هو أنه في عام 2020، قدم بينجياو جونج وآخرون مجموعتين من الجينات كجينات محورية (الجينات الأكثر ارتباطاً بالمرض)، والتي تشمل SLC26A3 وSLC30A10. تم تقديم هذه النتيجة كمثبط لعلامة الورم الظهارية في هذا السرطان، ومن المتوقع أن يكون SLC30A10 عاملاً في تصنيف الأورام السرطانية.

ترتبط الأنماط الجينية الميثيلية أيضاً بتطور هذا السرطان على المستوى الجزيئي [42] وفي هذا الصدد في العام، سعى كوينشي ياجي وآخرون إلى التحقيق في التغيرات اللاجينية وتقدمها في سرطان القولون والمستقيم. النمط الجيني هو مثيلة معتدلة ومنخفضة، المجموعة الأولى ذات MSI العالي و BRAF + والمجموعة الثانية مع S KRA + ترتبط بهذا التشخيص المنخفض. وحددوا

SLC30A10 كمرشح لتصنيف النمط اللاجيني (مثيلة) في سرطان القولون والمستقيم وقالوا إن هذا الجين يرتبط بالتطور الجزيئي لـ [48] CRC. وبما أن السرطان وسلائفه، بما في ذلك الأورام الحميدة، هي مرض وراثي، فيبدو أنه يجب اختيار الجوانب التشخيصية من العوامل الوراثية لتكون أكثر فعالية. يبقى الاكتشاف المبكر للسرطان أحد أهم الأعراض نظراً لعلم الوراثة اللاجينية والميثيل الذي يحظى بشعبية كبيرة اليوم، فمن المستحسن دراسة التأثيرات اللاجينية لفيتامين د على الجينات الرئيسية الأخرى في سرطان القولون مثل APC، TP53، KRAS، NRAS، BRAF في الخطوط الخلوية لهذا السرطان. بالإضافة إلى ذلك، لتأكيد نتائج هذه الدراسة، يُقترح دراسة التأثير اللاجيني لفيتامين د على الجين الموجود في SLC30A10 على أنسجة ورم CRC في النماذج الحيوانية (تسعون فأراً).

### References:

1. Sung, H., et al., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 2021. 71 (3): p. 209-249.
2. Bahrami, A., et al., Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status. Journal of cellular physiology, 2018. 233 (5): p. 4033-4043.
3. O'Brien, KM, et al., Vitamin D, DNA methylation, and breast cancer. Breast Cancer Research, 2018. 20 (1): p. 1-11.
4. McCullough, ML, RM Bostick, and TL Mayo, Vitamin D gene pathway polymorphisms and risk of colorectal, breast, and prostate cancer. Annual review of nutrition, 2009. 29 : p. 111- 132.
5. Tabatabaeizadeh, SA, et al., High dose supplementation of vitamin D affects measures of systemic inflammation: Reductions in high sensitivity C - reactive protein level and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) distribution. Journal of cellular biochemistry, 2017. 118 (12): p. 4317-4322.
6. Qian, M., et al., (2012) The Role of Vitamin D on the Prognosis and Incidence of Lung Cancer: A Systematic Review and Meta- Analysis. 2021.
7. Schepisi, G., et al., Vitamin D Deficiency in Testicular Cancer Survivors: A Systematic Review. International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22 (10): p. 5145.
8. Li, Z., et al., Effect of vitamin D supplementation on breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Frontiers in nutrition, 2021.
9. Rinninella, E., et al., Vitamin D and colorectal cancer: Chemopreventive perspectives through the gut microbiota and the immune system. BioFactors, 2021 .
10. Denise John, Phwnc Everything You Need to Know About Vitamin D. 2019 July 28.‘

- 11.RI, S., et al., Colorectal cancer statistics, 2017. CA: a cancer journal for clinicians, 2017. 67 (3): p. 177-193.
- 12.Castellano-Castillo, D., et al., Adipose tissue inflammation and VDR expression and methylation in colorectal cancer. Clinical epigenetics, 2018. 10 (1): p. 1-10.
- 13.Afzal, S., et al., Genetically low vitamin D concentrations and increased mortality: Mendelian randomisation analysis in three large cohorts. Bmj, 2014. 349.
- 14.Maalmi, H., et al., Association between blood 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis. Nutrients, 2018. 10 (7): p. 896.
- 15.Maalmi, H., et al., Relationship of very low serum 25- hydroxyvitamin D 3 levels with long-term survival in a large cohort of colorectal cancer patients from Germany. European journal of epidemiology, 2017. 32 (11): p. 961-971.
- 16.Bahrami, A. and A. Sahebkar, Vitamin D as a Potential Therapeutic Option in Cancer Treatment: Is There a Role for Chemoprevention? Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents), 2020. 20 (18): p. 2138-2149.
- 17.Stefanska, B., et al., Hypomethylation and induction of retinoic acid beta 2 receptor by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells. European journal of pharmacology, 2010. 638 (1-3): p. 47-53.
- 18.Arasaradnam, R., et al., A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. Epigenetics, 2008. 3 (4): p. 193-198.
- 19.Feldman, D., et al., The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nature reviews cancer, 2014. 14 (5): p. 342-357.
- 20.Burrell, AM, et al., Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis and the major histocompatibility complex (MHC). Discovery medicine, 2011. 11 (58): p. 187-196.
- 21.Novakovic, B., et al., Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. Journal of Biological Chemistry, 2009. 284 (22): p. 14838-14848.
- 22.Snegarova, V. and D. Naydenova, Vitamin D: a review of its effects on epigenetics and gene regulation. Folia Medica, 2020. 62 (4): p. 662-667.



23. Zhu, H., et al., A genome-wide methylation study of severe vitamin D deficiency in African American adolescents. *The Journal of pediatrics*, 2013. 162 (5): p. 1004-1009. e1.
24. Stefanska, B., et al., Comparative effects of retinoic acid, vitamin D and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues on methylation and expression of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor gene in breast cancer cells. *British journal of nutrition*, 2012. 107 (6): p. 781-790.
25. Fu, B., et al., Epigenetic regulation of BMP2 by 1,25- dihydroxyvitamin D3 through DNA methylation and histone modification. *PloS one*, 2013. 8 (4): p. e61423.
26. Rawson, JB, et al., Vitamin D intake is negatively associated with promoter methylation of the Wnt antagonist gene DKK1 in a large group of colorectal cancer patients. *Nutrition and cancer*, 2012. 64 (7): p. 919-928.
27. Zhou, Y., et al., DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2014. 144 : p. 207- 214.
28. Beckett, EL, et al., Relationship between methylation status of vitamin D-related genes, vitamin D levels, and methyl-donor biochemistry. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 2016. 6 : p. 8-15.
29. Suderman, M., et al., 25-Hydroxyvitamin D in pregnancy and genome wide cord blood DNA DNA methylation in two pregnancy cohorts (MoBa and ALSPAC). *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2016. 159 : p. 102-109.
30. Valencia, RAC, et al., In vitro exposure of human blood mononuclear cells to active vitamin D does not induce substantial change to DNA methylation on a genome-scale. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2014. 141 : p. 144- 149.
31. Hübner, U., et al., Effect of 1 year B and D vitamin supplementation on LINE-1 repetitive element methylation in older subjects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 2013. 51 (3): p. 649-655.
32. Nair-Shalliker, V., et al., The association between personal sun exposure, serum vitamin D and global methylation in human lymphocytes in a population of healthy adults in South Australia. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2014. 765 : p. 6-10.

33. Zhu, H., et al., Correction: Race / ethnicity-specific association of vitamin D and global DNA methylation: Cross-sectional and interventional findings. Plos one, 2016. 11 (9): p. e0162582.
34. Markowitz, SD and MM Bertagnoli, Molecular basis of colorectal cancer. New England journal of medicine, 2009. 361 (25): p. 2449-2460.
35. Azadeh, S., et al., Colorectal cancer in Iran: an epidemiological study. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2008. 9 (1): p. 123-126.
36. Kerachian, MA, et al., Crosstalk between DNA methylation and gene expression in colorectal cancer, a potential plasma biomarker for tracing this tumor. Scientific reports, 2020. 10 (1): p. 1-13.
37. McCullough, ML, et al., Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. J Natl Cancer Inst, 2019. 111 (2): p. 158-169.
38. Stefanska, B., et al., Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components - the implications in cancer prevention. Br J Pharmacol, 2012. 167 (2): p. 279-97.
39. Rawson, JB, et al., Promoter methylation of Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 is associated with opposing tumor subtypes in two large populations of colorectal cancer patients. Carcinogenesis, 2011. 32 (5): p. 741-7.
40. Boughanem, H., et al., Association between variation of circulating 25-OH vitamin D and methylation of secreted frizzled- related protein 2 in colorectal cancer. Clin Epigenetics, 2020. 12 (1): p. 83.
41. Wei, J., et al., Discovery and validation of hypermethylated markers for colorectal cancer. Disease markers, 2016. 2016.
42. Gong, B., et al., Identification of hub genes related to carcinogenesis and prognosis in colorectal cancer based on integrated bioinformatics. Mediators of inflammation, 2020. .
43. Seve, M., et al., In silico identification and expression of SLC30 family genes: an 7expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. BMC genomics, 2004. 5 (1): p. 1-9.
44. Hou, L., P. Liu, and T. Zhu, Long noncoding RNA SLC30A10 promotes colorectal tumor proliferation and migration via miR- 21c / APC axis. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020. 24 (12): p. 6682-6691.
45. Singh, CK, et al., Analysis of zinc-exporters expression in prostate cancer. Scientific reports, 2016. 6 (1): p. 1-13.

46. Kerachian, MA, et al., Crosstalk between DNA methylation and gene expression in colorectal cancer, a potential plasma biomarker for tracing this tumor. Scientific reports, 2020. 10 (1): p. 1-13.
47. Shangkuan, W.-C., et al., Risk analysis of colorectal cancer incidence by gene expression analysis. PeerJ, 2017. 5 : p. e3003.
48. Yagi, K., et al., Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clinical Cancer Research, 2010. 16 (1): p. 21- 33.

### Effect of vitamin D supplementation on the methylation status of the SLC30A10 gene on colon cancer cell lines

#### Abstract:

Background: Overall, colorectal cancer is the third most common cancer and the second most lethal after breast and lung cancer. The association of cancers with expression of the Bcr gene is not covered. Methylation is a subtype of epigenetics and can therefore be altered by methyl receptors or donor drugs. According to recent studies, the SLC30A10 gene is hyper methylated in colorectal cancer and shows decreased expression. On the other hand, many studies have been conducted on the epigenetic effect of vitamin D on various genes responsible for various diseases and cancers. Therefore, in this study, we aimed to study the epigenetic effect of this substance in colorectal cancer cell lines SW48 and HT29 on the methylation of this gene.

Method: First, the amount of vitamin D was in the range of 0 to 250 mg of vitamin D after 24 hours and the IC50 was calculated to be 95 mg/ml. Cells were treated with DMEM and RPMI medium for 24 h at 37°C, 5% CO supplemented with 25 mg/ml vitamin D. After DNA extraction and quality and quantity tests, the samples were bisulfate. Finally, the methylation status of the samples was assessed using specific primers and real-time PCR.

Results: The results showed that a dose of 95 mg of vitamin D on HT29 cells at a significant level (P value < 0.05) reduces methylation of the SLC30A10 gene.

Conclusion: It is hoped that this finding will shed light on a new treatment for colon cancer. However, the introduction of vitamin D as an effective pharmacological supplement for CRC requires further studies. It is recommended to study the epigenetic effects of vitamin D on other key genes in colon cancer such as APC, TP53, KRAS, NRAS, BRAF in different cell lines.

**Keywords:** colon cancer, genetics, methylation, vitamin D.