



Research Article

The Effect of Different Ozone Concentrations on the Expression of β -catenin and HIF-I Genes in the Colon Tissue of BALB/c Mice Treated with Azoxymethane/dextran Sodium Sulfate

Tahmasb Salehi ¹, Mohsen Korani ^{1,*}, Mahvash Jafari ¹, Morteza Izadi ², Ahmad Khonche ³

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Ozone Complementary Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Baqiyatallah Research Center for Gastroenterology and Liver Disease, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* **Corresponding author:** Mohsen Korani, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: mohsenkorani@gmail.com

DOI: [10.52547/nkums.14.2.1](https://doi.org/10.52547/nkums.14.2.1)

How to Cite this Article:

Salehi T, Korani M, Jafari M, Izadi M, Khonche A. The Effect of Different Ozone Concentrations on the Expression of β -catenin and HIF-I Genes in the Colon Tissue of BALB/c Mice Treated with Azoxymethane/dextran Sodium Sulfate. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2022;**14**(2):1-10. DOI: [10.52547/nkums.14.2.1](https://doi.org/10.52547/nkums.14.2.1)

Received: 12 Dec 2021

Accepted: 24 May 2022

Keywords:

Ozone
Azoxymethane
Colon Cancer
 β -catenin
HIF-I

Abstract

Introduction: Colon cancer is known as one of the most current cancers in the world and Iran that high percentage of deadly cancers in the world is related to colon cancer. The use of new method to treat and control of colon cancer in developed societies are on rise. Ozone is used as the new and effective method to treat of different diseases, infections and scars. In this study, the effects of different doses of ozone were investigated on the expression of HIF-I and β -catenin genes in the colon tissue of mice with colon cancer.

Method: This study was performed on 35 male Balb/c mice in 5 groups. One group was randomly considered as healthy group and in the rest of the mice colon cancer was induced using Azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM-DSS). One group was not treated and the other three groups were treated with 10, 20 and 40 μ g/ml doses of O₃, respectively. Then colon tissue was prepared and the change of the expression in HIF-I and β -catenin genes was investigated using Real-time PCR.

Results: Treatment with AOM-DSS dramatically increased the expression of HIF-I and β -catenin genes in comparison to the healthy group ($P < 0.001$), while ozone decreased the expression of these genes in a dose-dependent manner ($P < 0.001$).

Conclusion: Ozone in a specific dose has a therapeutic effect on colon cancer and can be used as a substantial method for colon cancer treatment.



اثر غلظت‌های مختلف ازون بر بیان ژن‌های HIF-1 و β -catenin در بافت کولون موش‌های BALB/c تیمار شده با آزوکسی متان/دکستران سدیم سولفات

طهماسب صالحی^۱، محسن کرانی^{۱*}، مهوش جعفری^۱، مرتضی ایزدی^۲، احمد خنچه^۳

^۱ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات کمک درمانی با ازن، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
^۳ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: محسن کرانی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران. ایمیل: mohsenkorani@gmail.com

DOI: 10.52547/nkums.14.2.1

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳
مقدمه: سرطان کولون یکی از شایعترین سرطان‌های دستگاه گوارش در ایران و جهان می‌باشد که درصد بالایی از موارد منجر به مرگ بر اثر سرطان را در سرتاسر جهان به خود اختصاص می‌دهد. استفاده از روش‌های جدید جهت درمان و کنترل این نوع سرطان در جوامع پیشرفته در حال افزایش است. یکی از روش‌های درمانی جدید استفاده از گاز ازون است که در درمان عفونت‌ها، زخم‌ها و بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و اثربخشی آن به خوبی اثبات شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف گاز ازون بر بیان ژن‌های β -catenin و HIF-1 در بافت کولون موش‌های مبتلا به سرطان کولون بود.	واژگان کلیدی: ازون آزوکسی متان سرطان کولون HIF-1 β -catenin
روش کار: این مطالعه بر روی ۳۵ سر موش نر نژاد BALB/c در ۵ گروه انجام شد. یک گروه به طور تصادفی به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شد و بقیه موش‌ها با استفاده از آزوکسی متان/دکستران سدیم سولفات (AOM-DSS) به سرطان کولون مبتلا شدند. یک گروه تحت تیماری قرار نگرفت و سه گروه دیگر هم به ترتیب با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر ازون تیمار شدند. سپس بافت کولون تهیه شد و تغییرات بیان ژن‌های β -catenin و HIF-1 در بافت توسط روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.	
یافته‌ها: تیمار با AOM-DSS بیان ژن‌های HIF-1 و β -catenin را در بافت کولون نسبت به گروه سالم به طور چشمگیری افزایش داد ($P < 0.001$) و ازون به صورت وابسته به دوز باعث کاهش چشمگیر در بیان این ژنها شد ($P < 0.001$).	
نتیجه گیری: ازون در دوزهای خاص اثر درمانی بر سرطان کولون دارد و می‌تواند به عنوان یک راه حل درمانی در درمان سرطان کولون به کار گرفته شود.	

مقدمه

سن، سابقه فردی پولیپ آدنوماتوز، سابقه بیماری التهابی روده، سابقه خانوادگی سرطان کولورکتال یا پولیپ آدنوماتوز، رژیم غذایی پرچرب و گوشت قرمز، چاقی، مصرف دخانیات، الکل و عدم فعالیت فیزیکی را نام برد [۵].

سرطان کولون به دو نوع ارثی و غیرارثی تقسیم می‌شود. نوع ارثی خود شامل دو نوع سرطان Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) و Familial Adenomatous Polyposis (FAP) می‌باشد. تقریباً ۸۰ درصد موارد غیرارثی و ۲۰ درصد ارثی هستند [۶، ۷]. مسیرهای گوناگونی در تومورهای انسانی و حیوانی شرکت دارند که شناخت کلینیکی و بررسی این مسیرها به منظور جلوگیری و درمان سرطان بسیار حائز اهمیت است. چرا که بعضی از

سرطان اصلی‌ترین عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین عامل مرگ و میر انسانی در کشورهای در حال توسعه است [۱]. خود کفا بودن در تکثیر سلولی، عدم حساسیت به سیگنال‌های مهار کننده رشد، عدم محدودیت در توانایی تکثیر، وقوع آنژیوژنز، تهاجم بافتی و متاستاز از جمله تغییرات فیزیولوژیکی می‌باشند که تقریباً در تمامی انواع تومورهای انسانی یافت می‌شوند در واقع سرطان یک بیماری ژنتیکی است که حاصل تجمع جهش‌هاست [۲]. سرطان در ایران پس از بیماری‌های قلبی - عروقی و سوانح، سومین علت مرگ و میر به شمار می‌آید [۱، ۳]. سرطان کولون سومین سرطان شایع در بین مردان و دومین سرطان شایع در میان زنان می‌باشد [۴]. عوامل خطر مختلفی باعث بروز سرطان کولون می‌شود از این جمله عوامل می‌توان به افزایش

این مسیرها در تمام پردازشهای مربوط به سلول‌های بنیادی سرطانی از جمله، توانایی خودنوسازی، تمایز و گسترش کنترل نشده شرکت دارند و بنابراین شناخت مهارکننده‌های این مسیرها در بخش کلینیکی قابل توجه است [۸].

ازون گازی با فرمول O_3 است که در اواسط قرن ۱۹ کشف شد. این گاز از سه‌اتم اکسیژن در یک ساختار ناپایدار تشکیل شده و بدون رنگ، سوزش آور و در حالت جامد و یا مایع، انفجاری می‌باشد. ساختار پایه ازون از انسان در برابر اثرات زیانبار پرتو UV محافظت می‌کند. میزان ازون در زمین $20 \mu\text{g/ml}$ است که این غلظت با شرایط زندگی سازگار می‌باشد. اگرچه گاز ازون دارای اثرات خطرناکی است، اما بسیاری از محققان معتقدند که دارای اثرات درمانی بسیار وسیع نیز می‌باشد [۹].

ازون دارای قابلیت شگرفی در جهت اکسیداسیون ترکیبات آلی می‌باشد [۱۰]. اثر سمی آن بر روی سیستم تنفسی به خوبی شناخته شده است [۱۱]. طرفداران استفاده از این گاز در پزشکی معتقدند که در بخش‌های دندان پزشکی، کاهش کلسترول خون و درمان‌های تکمیلی بسیار مؤثر می‌باشد [۱۲، ۱]. این گاز جهت درمان عفونت‌ها، زخم‌ها و ضدعفونی کردن آب آشامیدنی استفاده شده است [۱۳]. ازون ابتدا در اوایل قرن بیستم در پزشکی به کار گرفته شد و برای اولین بار در جنگ جهانی اول برای درمان زخم ناشی از فاقناریا استفاده شد. پس از جنگ در ضدعفونی کردن زخم‌ترمیم زخم هیپاتیت آرتریت روماتوئید فتق دیسک کمر سگته مغزی و سرطان استفاده شد ازون تراپی به تدریج به دلیل ایمنی سادگی و بهای اندک به عنوان یک درمان مدرن پذیرفته شده است [۱۴]. البته در استفاده از ازون باید احتیاط لازم را به عمل آورد زیرا همانطور که اشاره شد به دلیل قدرت اکسید کنندگی که دارد می‌تواند اثرات سمی بر سیستم‌های مختلف از جمله سیستم تنفسی بگذارد.

از آنجا که ازون در پلاسما به سرعت به فرم احیاء پراکسید هیدروژن در می‌آید، می‌توان اثرات درمانی ازون را به پراکسید هیدروژن نسبت داد: مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی به پراکسید هیدروژن بسیار حساس می‌باشند و سبب القای آپوپتوزیس و مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۵-۱۸].

β -catenin به عنوان یک شاخص مهم در پیش بینی و تشخیص سرطان کولون بکار می‌رود [۱۹]. این پروتئین دارای نقش پیام رسانی داخلی است و می‌تواند عامل مهمی در تومور زایی و سرطان کولون باشد. مسیر پیام رسانی Wnt / β -Catenin برای رشد و نمو بافت‌های مختلف در جانوران پر سلولی لازم و ضروری است. فعالیت نامناسب کمپلکس Wnt / β -Catenin موجب سرطان به خصوص سرطان کلورکتال می‌شود. β -catenin مجری مرکزی این مسیر است. در سلول‌های اپی‌تلیال مشخص شده است که در حضور Wnt، β -catenin در هسته سلول تجمع پیدا می‌کند. β -catenin در هسته به فاکتور رونویسی TCF متصل شده و بیان ژن‌های هدف مسیر Wnt را افزایش می‌دهد، در صورتی که Wnt نباشد β -catenin در سیتوپلاسم یوبیکویتینه شده و به وسیله پروتئازوم تخریب می‌شود [۲۰-۲۲].

از آنجا که ازون در پلاسما به سرعت به فرم احیاء پراکسید هیدروژن در می‌آید، می‌توان اثرات درمانی ازون را به پراکسید هیدروژن نسبت داد: مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی به پراکسید هیدروژن بسیار حساس می‌باشند و سبب القای آپوپتوزیس و مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۵-۱۸].

β -catenin به عنوان یک شاخص مهم در پیش بینی و تشخیص سرطان کولون بکار می‌رود [۱۹]. این پروتئین دارای نقش پیام رسانی داخلی است و می‌تواند عامل مهمی در تومور زایی و سرطان کولون باشد. مسیر پیام رسانی Wnt / β -Catenin برای رشد و نمو بافت‌های مختلف در جانوران پر سلولی لازم و ضروری است. فعالیت نامناسب کمپلکس Wnt / β -Catenin موجب سرطان به خصوص سرطان کلورکتال می‌شود. β -catenin مجری مرکزی این مسیر است. در سلول‌های اپی‌تلیال مشخص شده است که در حضور Wnt، β -catenin در هسته سلول تجمع پیدا می‌کند. β -catenin در هسته به فاکتور رونویسی TCF متصل شده و بیان ژن‌های هدف مسیر Wnt را افزایش می‌دهد، در صورتی که Wnt نباشد β -catenin در سیتوپلاسم یوبیکویتینه شده و به وسیله پروتئازوم تخریب می‌شود [۲۰-۲۲].

روش کار

حیوانات

این مسیرها در تمام پردازشهای مربوط به سلول‌های بنیادی سرطانی از جمله، توانایی خودنوسازی، تمایز و گسترش کنترل نشده شرکت دارند و بنابراین شناخت مهارکننده‌های این مسیرها در بخش کلینیکی قابل توجه است [۸].

ازون گازی با فرمول O_3 است که در اواسط قرن ۱۹ کشف شد. این گاز از سه‌اتم اکسیژن در یک ساختار ناپایدار تشکیل شده و بدون رنگ، سوزش آور و در حالت جامد و یا مایع، انفجاری می‌باشد. ساختار پایه ازون از انسان در برابر اثرات زیانبار پرتو UV محافظت می‌کند. میزان ازون در زمین $20 \mu\text{g/ml}$ است که این غلظت با شرایط زندگی سازگار می‌باشد. اگرچه گاز ازون دارای اثرات خطرناکی است، اما بسیاری از محققان معتقدند که دارای اثرات درمانی بسیار وسیع نیز می‌باشد [۹].

ازون دارای قابلیت شگرفی در جهت اکسیداسیون ترکیبات آلی می‌باشد [۱۰]. اثر سمی آن بر روی سیستم تنفسی به خوبی شناخته شده است [۱۱]. طرفداران استفاده از این گاز در پزشکی معتقدند که در بخش‌های دندان پزشکی، کاهش کلسترول خون و درمان‌های تکمیلی بسیار مؤثر می‌باشد [۱۲، ۱]. این گاز جهت درمان عفونت‌ها، زخم‌ها و ضدعفونی کردن آب آشامیدنی استفاده شده است [۱۳]. ازون ابتدا در اوایل قرن بیستم در پزشکی به کار گرفته شد و برای اولین بار در جنگ جهانی اول برای درمان زخم ناشی از فاقناریا استفاده شد. پس از جنگ در ضدعفونی کردن زخم‌ترمیم زخم هیپاتیت آرتریت روماتوئید فتق دیسک کمر سگته مغزی و سرطان استفاده شد ازون تراپی به تدریج به دلیل ایمنی سادگی و بهای اندک به عنوان یک درمان مدرن پذیرفته شده است [۱۴]. البته در استفاده از ازون باید احتیاط لازم را به عمل آورد زیرا همانطور که اشاره شد به دلیل قدرت اکسید کنندگی که دارد می‌تواند اثرات سمی بر سیستم‌های مختلف از جمله سیستم تنفسی بگذارد.

از آنجا که ازون در پلاسما به سرعت به فرم احیاء پراکسید هیدروژن در می‌آید، می‌توان اثرات درمانی ازون را به پراکسید هیدروژن نسبت داد: مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی به پراکسید هیدروژن بسیار حساس می‌باشند و سبب القای آپوپتوزیس و مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۵-۱۸].

β -catenin به عنوان یک شاخص مهم در پیش بینی و تشخیص سرطان کولون بکار می‌رود [۱۹]. این پروتئین دارای نقش پیام رسانی داخلی است و می‌تواند عامل مهمی در تومور زایی و سرطان کولون باشد. مسیر پیام رسانی Wnt / β -Catenin برای رشد و نمو بافت‌های مختلف در جانوران پر سلولی لازم و ضروری است. فعالیت نامناسب کمپلکس Wnt / β -Catenin موجب سرطان به خصوص سرطان کلورکتال می‌شود. β -catenin مجری مرکزی این مسیر است. در سلول‌های اپی‌تلیال مشخص شده است که در حضور Wnt، β -catenin در هسته سلول تجمع پیدا می‌کند. β -catenin در هسته به فاکتور رونویسی TCF متصل شده و بیان ژن‌های هدف مسیر Wnt را افزایش می‌دهد، در صورتی که Wnt نباشد β -catenin در سیتوپلاسم یوبیکویتینه شده و به وسیله پروتئازوم تخریب می‌شود [۲۰-۲۲].

علاوه بر β -catenin ژن دیگری به نام Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α) نیز نقش بسیار مهمی در بافت‌های توموری و پیشرفت آن در پستانداران دارد. HIF سه ایزوفرم دارد

استخراج RNA نام و انجام Real time PCR

تمامی کولون جدا شده در زیر جریانی از ازت مایع، درون هاون چینی استریل شده به صورت پودر درآمد. حدود 50 mg از بافت کولون پودر شده برای استخراج توتال RNA مورد استفاده قرار گرفت. مراحل استخراج توتال RNA به صورت خلاصه شامل مراحل زیر بود. ۱- افزودن یک میلی لیتر Trizol (Invitrogen, آمریکا) به 50 میلی گرم از نمونه بافتی. ۲- افزودن 250 میکرولیتر کلروفرم و انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4 °C و دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه ۳- انتقال فاز روپی حاوی Total RNA به یک میکروتیوب ۴- اضافه کردن ایزوپروپانول به Total RNA ۵- رسوب RNA با ساتریفیوژ کردن در دمای 4 °C و دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه ۶- عمل شستشو با الکل ۷۰٪ و خشک کردن ۷- افزودن 50 μl آب تیمار شده با DEPC به میکروتیوب ۸- نگهداری در ۸۰- درجه سانتیگراد.

جهت ساخت cDNA کیت QuantiTect Rev trnsriptase (Qiagen, آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. در این کیت از پرایمرهای Oligo dT و Random hexamer به طور همزمان استفاده شده که این امر سبب افزایش کارایی در سنتز cDNA از RNA تام می‌گردد. بر اساس دستورالعمل معرف حذف DNA ژنومی بر روی یخ آماده شد، به این صورت که ۲ میکرولیتر از معرف gDNA Wipeout buffer 7X با حجم معادل (میکرولیتر) ۱ میکروگرم از RNA توتال مخلوط گردید و با RNase free water حجم به ۱۴ میکرولیتر رسانده شد، سپس محتویات میکروتیوب به مدت ۲ دقیقه در دمای 42 °C انکوبه گردید و سریعاً روی یخ نگه داری شد. سپس بر روی یخ ۱ میکرولیتر از Quanti script reverse transcriptase، ۱ میکرولیتر از primer mix و ۴ میکرولیتر از Quanti script RT buffer به میکروتیوب اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد. محتویات میکروتیوب ۱۵ دقیقه در دمای 42 °C انکوبه گردید تا cDNA ساخته شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای 95 °C انکوبه شد تا آنزیم Quanti script reverse transcriptase غیر فعال گردید و نهایتاً محصول تولید شده در دمای 20 °C- تا زمان انجام Real timePCR ذخیره شد.

در انتها، جهت تأیید انجام سنتز cDNA، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه یک مرحله، PCR انجام شد. در این مطالعه از کیت Master mix Syber Green (Ampliqon, دانمارک) (برای انجام Real time PCR استفاده شد. به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس با ۱ میکرولیتر cDNA و ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای forward و reverse و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط گردید و سپس در دستگاه ترموسیکلر Real time PCR (RG-6000 Corbbet Thermocycler, استرالیا) طبق برنامه دمایی زیر قرار داده شد. یک سیکل ۱۵ دقیقه‌ای در دمای 95 درجه و ۴۰ سیکل ۱۵ و ۶۰ ثانیه‌ای به ترتیب در دمای 95 و 60 درجه سلسیوس.

توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. پرایمر ها توسط برنامه genscript real time taqman طراحی شدند و سپس در NCBI بلاست شدند همچنین با استفاده از نرم افزار oligo از نظر تشکیل لوپ و دایمر آنالیز شدند.

موش‌های سوری نر نژاد BALB/c با وزن بین 30-20 گرم و سن 7 هفته از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) خریداری و 1 هفته قبل از شروع آزمایش جهت سازگاری نگهداری گردید. حیوانات در دمای اتاق (25 ± 2) با رطوبت نسبی 50 تا 60 درصد و در چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته قرار گرفتند. دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در تمامی مراحل انجام این مطالعه بر طبق دستورالعمل NIH رعایت شد. این تحقیق دارای کد اخلاق به شماره IR.BMSU.REC.1398.069 از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله می باشد.

طراحی مطالعه

حیوانات پس از توزین به طور تصادفی به 5 گروه 7 تایی موش تقسیم شدند:

- ۱- گروه سالم (بدون تیمار با آزوکسی متان و DSS)
- ۲- گروه تیمار شده با آزوکسی متان و DSS
- ۳- گروه تیمار شده با آزوکسی متان و DSS + مخلوط O₃/O₂ با غلظت 10 μg/ml
- ۴- گروه تیمار شده با آزوکسی متان و DSS + مخلوط O₃/O₂ با غلظت 20 μg/ml
- ۵- گروه تیمار شده با آزوکسی متان و DSS + مخلوط O₃/O₂ با غلظت 40 μg/ml

حیوانات در گروه‌های ۲ الی ۵ آزوکسی متان (Sigma Aldrich, آمریکا) به صورت زیر جلدی با دوز 10 mg/kg، هفته‌ای یک بار و به مدت 3 هفته دریافت نمودند و سپس یک هفته بعد از دریافت آخرین دوز آزوکسی متان به مدت 3 هفته توسط آبی که حاوی 1 درصد نمک DSS (دکستران سدیم سولفات، Sigma Aldrich, آمریکا) بود تیمار شدند [30]. پس از ایجاد مدل با تزریق کارسینوژن، گروه دوم 2 میلی لیتر O₂ و گروه‌های 3 تا 5 هر دو روز یکبار به مدت سه هفته با دوزهای مذکور اوزن با دوز 80 میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بصورت صورت داخل صفاقی درمان شدند. 10 روز پس از آخرین درمان، موش‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین/زیلازین (به ترتیب 0/5 و 2/3 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند، سپس با اتانول 70 درصد شکم حیوان استریل و برش داده شد تا حفره شکمی نمایان شود، سپس کولون از روده کوچک جدا شد و در محلول بافر فسفات (PBS) سرد شسته شدند و از نظر تعداد تومور مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در ازت مایع (180 °C-) سریعاً منجمد و تا زمان انجام آزمایش در 80 °C - نگهداری شدند.

برای تولید آزون از دستگاه آزون ساز (Ozon therapie apparaat Medozon Compact, Medical art Co, HAB 16630 /16632) استفاده شد که مخلوط گازی با 97 درصد اکسیژن و 3 درصد آزون تولید می‌کرد.

تشخیص سرطان کولون

همه موش‌ها به صورت هفتگی از نظر خونریزی رکتال مورد بررسی قرار گرفتند. در انتهای مطالعه موش‌ها کشته شدند و روده آنها از نظر امکان وجود تومور مورد بررسی قرار گرفت و تعداد تومورها که به شکل برآمدگی‌هایی قابل مشاهده بودند، گزارش گردید. تشخیص تومور توسط یک متخصص پاتولوژی انجام گرفت.

فرضیه توزیع طبیعی برای متغیرهای کمی به وسیله آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شد. برای مقایسه نتایج آزمونهای بین گروههای مختلف از تست و One-way ANOVA و Post Hoc Turkey multiple comparison استفاده شد. سطح معنی دار بودن در $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

بیان نسبی ژنهای هدف نسبت به ژن مرجع در حالات مختلف سالم، کنترل و تیمار شده، با فرمول $2^{-\Delta Ct}$ بیان شد [۳۱].

تحلیل داده‌ها

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 18.0 صورت پذیرفت و اطلاعات کمی بصورت میانگین \pm انحراف معیار (S.D) ارائه شدند.

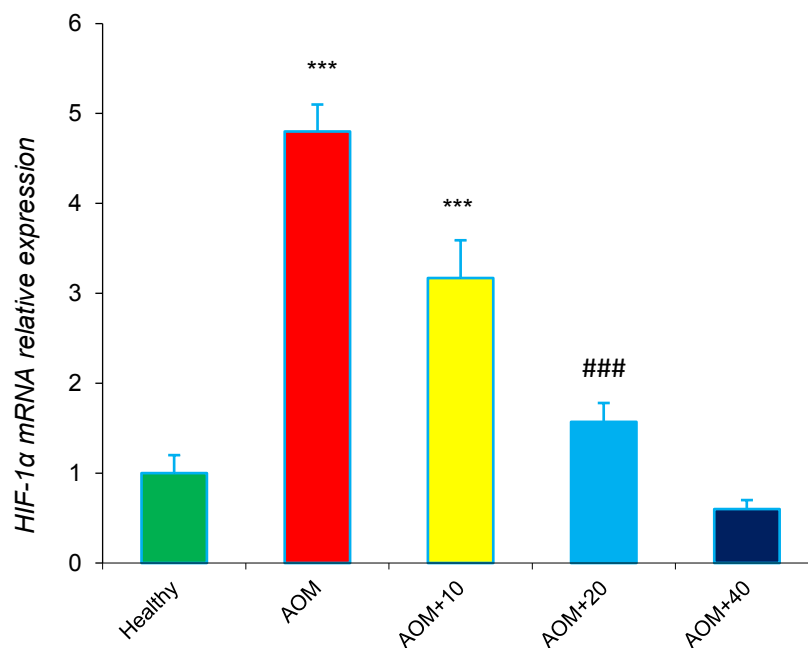
جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد بررسی

Name /Primers Sequences 5'--> 3'	Amplicon size (bp)
HIF-1	214 bp
Forward	5' CACAGGACAGTACAGGATGCTT 3'
Reverse	5' CGTGCTGAATAATACCACTTACAACAT 3'
B-catenin	208 bp
Forward	5' CTAAGCAGGAAGGGATGGAAGG 3'
Reverse	5' GATGGCAGGCTCAGTGATGTC 3'
β-actin	154 bp
Forward	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3'
Reverse	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'

جدول ۲. بررسی میزان تغییر در بیان ژن HIF-1 α ، β -catenin در مقادیر مختلف ازون

ژن	تغییر مقادیر میزان بیان در ژن بر حسب مقادیر مختلف ازون نسبت به گروه AOM-DSS		
	۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۴۰ میکرو گرم بر میلی لیتر
β-catenin	۱/۱ برابر کاهش	۲/۳۹ برابر کاهش***	۴/۶۸ برابر کاهش***
HIF-1α	۱/۵۱ برابر کاهش***	۳/۰۶ برابر کاهش***	۸ برابر کاهش***

*** $P < 0.001$

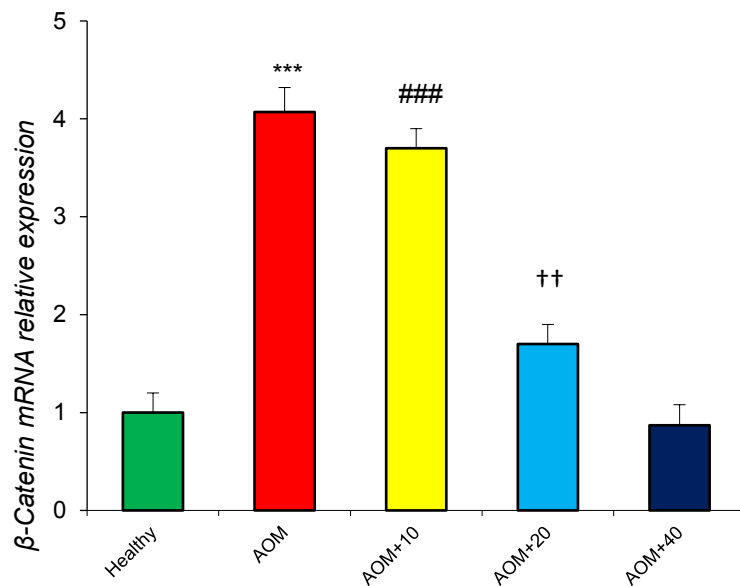


شکل ۱. بیان نسبی ژن HIF-1 α در گروه‌های مورد مطالعه.

AOM= Azoxymethane; AOM+10= Azoxymethane+ 10 μ g/ml ozone; AOM+20= Azoxymethane+ 20 μ g/ml ozone; AOM+40= Azoxymethane+ 40 μ g/ml ozone

*** $P < 0.001$ نسبت به همه گروه‌ها معنی دار است.

$P < 0.001$ نسبت به AOM+40 معنی دار است.



شکل ۲. بیان نسبی mRNA β-catenin در گروه‌های مورد مطالعه

AOM= Azoxymethane; AOM+10= Azoxymethane+ 10μg/ml ozone; AOM+20= Azoxymethane+ 20μg/ml ozone; AOM+40= Azoxymethane+ 40μg/ml ozone

*** P<0/001 نسبت به همه گروه‌ها غیر از AOM+10 معنی دار است.

P<0/001 نسبت به همه گروه‌ها غیر از AOM معنی دار است.

††† P<0/01 نسبت به گروه AOM+40 معنی دار است

نسبت به گروه AOM-DDS ایجاد نمی‌کند (۳/۷±۰/۲) در برابر ۲۵/۴۰±۰/۰۷ (P=۰/۲۹) اما با افزایش دوز از ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر (گروه ۴) بیان این ژن به ۱/۷±۰/۲ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر (گروه ۵) به ۰/۸۷±۰/۲۱ کاهش می‌یابد که این کاهش در هر دو گروه نسبت به گروه AOM-DDS (گروه ۲) از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۰۱). اختلاف بیان این ژن در گروه تیمار شده با دوز ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر (گروه ۴) و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر (گروه ۵) از لحاظ آماری معنی دار است (P<۰/۰۰۱).

یافته‌ها

در مقایسه با گروه تیمار شده با AOM-DSS گروه‌های تیمار شده با همه دوزهای ازون تعداد تومور کمتری داشتند طوری که تعداد تومورها در گروه تیمار شده با AOM-DSS ۹/۷±۷ و در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۳/۳۳±۲، ۳/۵±۱/۴ و ۲/۶±۲ بود (برای همه P<۰/۰۵).

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA HIF-1α

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است بر طبق نتایج به دست آمده، بیان ژن HIF-1 در گروه AOM-DDS (گروه ۲) نسبت به گروه سالم (گروه ۱) به طور چشمگیری افزایش یافته است (۴/۸±۰/۳) در برابر ۰/۲±۰/۱ (P<۰/۰۰۱) و تیمار با دوزهای مختلف ازون (گروه‌های ۳ تا ۵) باعث کاهش چشمگیر در بیان این ژن نسبت به گروه AOM-DDS شده است (برای همه گروه‌ها P<۰/۰۰۱). به گونه‌ای که با افزایش دوز این کاهش بیشتر است. بیان این ژن در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۳/۱۷±۰/۴۲؛ ۱/۵۷±۰/۲۱ و ۰/۱۶±۰/۱ می‌باشد. بین تمامی گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف ازون تفاوت بیان ژن HIF-1 معنی دار است (P<۰/۰۰۱).

نتایج بررسی بیان نسبی mRNA β-catenin

بیان نسبی ژن β-catenin در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیان این ژن در گروه AOM-DDS (گروه ۲) نسبت به گروه سالم (گروه ۱) افزایش معناداری از نظر آماری نشان می‌دهد (۴/۰۷±۰/۲۵) در برابر ۱±۰/۰۲ (P<۰/۰۰۱). تیمار با دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر ازون (گروه ۳) تغییر فاحشی در بیان این ژن

میزان تغییر بیان ژنهای β-catenin و HIF-1α در گروه‌های تیمار شده

میزان تغییر بیان ژنهای β-catenin و HIF-1α در گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف ازون (گروه‌های ۳ تا ۵) نسبت به گروه AOM-DDS (گروه ۲) در جدول ۲ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود با افزایش دوز ازون بیان ژن‌های مورد مطالعه بیشتر کاهش می‌یابد. دوز ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تغییری در بیان ژن β-catenin ایجاد نمی‌کند. کاهش بیان ژن HIF-1α نسبت به β-catenin بیشتر است.

بحث

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین سرطانها در جوامع مختلف می‌باشد، علاوه بر شیمی درمانی و رادیوتراپی که درمان رایج سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولون می‌باشد، درمان‌های مکمل هم مثل ازون تراپی توسط پزشکان به عنوان یک درمان مؤثر، پذیرفته و مورد استفاده قرار گرفته است [۱۴، ۳۲].

کولون، سینه، ریه، پوست، پانکراس، پروستات، کلیه، تخمدان و معده می‌باشند، بیان حداکثری HIF-1 alpha در بافت‌های توموری اولیه و متاستاتیک انسانی مشاهده می‌شود [۳۴، ۳۳].

Dan Cao و همکارانش در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ای بر روی بیان ژن HIF-1 alpha در سرطان کولورکتال انجام دادند. آن‌ها نشان دادند که ژن HIF-1 alpha در حدود ۵۴/۹۳٪ از موارد سرطان کولون بیان می‌شود، بعلاوه، تومورهای احاطه شده با ضایعات نوکروتیک سطح بیان بالایی از بیان پروتئین HIF-1 alpha را نشان دادند [۳۵]. نتایج این تحقیق بیانگر حضور ژن HIF-1 alpha در سرطان کولورکتال می‌باشد که این نتیجه با دستاورد تحقیق ما کاملاً هم‌راستا می‌باشد، به طوری که در تحقیق ما، بیان این ژن در سرطان کولون ملاحظه گردید و نشانگر بیان فعال این ژن در سرطان کولون می‌باشد.

هرچند بیان بالای ژن HIF-1 alpha می‌تواند سندی بر سرطان کولون و ابتلای به این عارضه باشد، ولی بیان این ژن HIF-1 alpha تحت تأثیر عوامل مختلفی می‌تواند قرار بگیرد، به عبارتی می‌توان گفت، این ژن متأثر از عواملی است که می‌تواند سطح بیان آن را در سرطان تحت تأثیر قرار دهد. لذا می‌توان گفت، بیان این ژن در فازهای متفاوت سرطان کاملاً متفاوت است. در این زمینه در سال ۲۰۱۹ مطالعه‌ای توسط منصور ریحانه نصیری و همکارانش بر روی بیماران ایرانی صورت گرفت، نتایج این مطالعه نشان داد اگرچه سطح بیان ژن HIF-1 alpha در مراحل سرطان کولورکتال حالت افزایشی داشته، اما در بررسی گروه‌ها به صورت دو به دو، افزایش میان گروه‌ها معنی دار نبود. به عبارتی دیگر اینگونه می‌توان عنوان کرد، بیان ژن HIF-1 alpha به طور معنی داری در بین گروه نمونه نرمال و مرحله متاستاز +۳ افزایش می‌یابد، اما در بین نمونه نرمال و مرحله ۱ و ۲ این افزایش معنی دار نمی‌باشد. در نتیجه این امر می‌توان به این مهم اذعان کرد که، HIF-1 alpha در مسیرهای گوناگون و شرایط متفاوت افزایش می‌یابد و بیان ژن HIF-1 alpha بستگی به شرایط بیمار، شکل زندگی و بسیاری عوامل دیگر دارد. این امر می‌تواند توجیه مناسبی در راستای نوسان در عدم بیان ژن HIF-1 alpha در شرایط مختلف باشد [۳۶].

همانطور که در نتایج تحقیقات گوناگون نیز دیده می‌شود، در انواع مختلف سرطان‌ها، زمانی که بافت توموری شروع به افزایش سایز می‌کند، میزان بیان ژن HIF-1 alpha نیز افزایش می‌یابد. در سرطان کولون و کولورکتال نیز، مشابه با دیگر تومورهای سرطانی سفت، با افزایش میزان هایپوکسی، میزان بیان ژن HIF-1 alpha نیز افزایش می‌یابد، ولی از نظر تشخیصی در مراحل متفاوت سرطان بیان آن ممکن است متفاوت باشد. در تأیید آن می‌توان به مطالعه دیگری در این حوزه اشاره کرد که در آن مشخص گردید، بیان HIF-2 نسبت به HIF-1 نقش مهمتری در تشخیص مرحله سرطان کولورکتال دارد [۳۷]. در راستای این امر می‌توان به آزمایش Kaplan-Meier اشاره کرد که در آن مشخص گردید، ژن HIF-1 alpha ژن مناسبی در بررسی میزان بقای بیماران و همچنین تشخیص سطح اولیه بیماری نمی‌باشد [۳۸].

البته HIF-1 در ضایعات پری نوپلاژی و پیش سرطانی مثل آدنومای کولون، کارسینومای مجاری پستان و نوپلاژی اینتراپیتلیال پروستات هم افزایش می‌یابد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که HIF-1 هم ممکن است در مراحل ابتدایی سرطان زایی نقش داشته باشد و حتی قبل از

HIF-1 و β -catenin دو ژن مهم دخیل در ایجاد و متاستاز سرطان کولون می‌باشند، بنابراین این دو ژن اهداف درمانی مناسبی برای درمان سرطان کولون محسوب می‌گردند، بیان این ژنها تحت تأثیر ازون قرار می‌گیرد اما تاکنون مطالعه‌ای که تأثیر ازون بر بیان ژنهای مذکور در سرطان کولون را بررسی کرده باشد در دسترس نیست لذا تحقیق حاضر بر روی این میزان بیان این ژنها و اثرات گاز ازون بر میزان بیان آن‌ها در مدل حیوانی سرطان کولون متمرکز شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان دو ژن HIF-1 و β -catenin گروهی که با AOM-DDS تیمار شده بودند نسبت به گروه سالم در سطح بالایی صورت می‌گیرد که مویید نقش این ژنها در ایجاد و یا پیشرفت سرطان کولون می‌باشد همچنین تیمار با AOM-DDS منجر به ایجاد تومور در کولون موش‌ها شد. تیمار با گاز ازون، بیان این دو ژن را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. تیمار با غلظت‌های مختلف ازون (گروه‌های ۳ تا ۵) سبب کاهش چشمگیر در بیان ژنهای HIF-1 و β -catenin نسبت به گروه AOM-DDS (گروه ۲) شد به استثنای گروه سوم که علی‌رغم کاهش بیان در β -catenin نسبت به گروه AOM-DDS (گروه ۲) معنادار نبود که نشان می‌دهد بیان β -catenin در غلظت‌های بالاتری از ازون تحت تأثیر قرار می‌گیرد. همچنین تیمار با AOM-DDS (گروه ۲) منجر به ایجاد تومور در کولون شد و تیمار با غلظت‌های مختلف ازون (گروه ۳ تا ۵) تعداد تومورها را کاهش داد. به نظر می‌رسد ازون از طریق کاهش در سطح بیان ژنهای دخیل در ایجاد و یا پیشرفت سرطان مانند HIF-1 و β -catenin باعث از بین رفتن سلولهای توموری می‌شود.

HIF-1 یک ژن شناخته شده در سرطان است که بیان آن تحت تیمار با ازون کاهش می‌یابد. Mary و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اثر دوزهای مختلف گاز ازون را بر روی مرگ سلول‌های Hella در بازه‌های زمانی مختلف بررسی کردند. در این تحقیق در دوز $10 \mu\text{g/ml}$ در ابتدا مرگ سلولی واضحی مشاهده نشد، ولی بعد از ۶ ساعت میزان مرگ سلولی به $15/2$ درصد و بعد از ۴۸ ساعت به $37/8$ درصد رسید. در دوز $20 \mu\text{g/ml}$ بعد از ۲۴ ساعت مرگ سلول به $37/5$ ٪ و پس از ۴۸ ساعت به $51/5$ ٪ رسید، در دوز $30 \mu\text{g/ml}$ مرگ سلولی پس از ۲۴ ساعت به 41 ٪ و پس از ۴۸ ساعت به $74/2$ ٪ رسید و در دوز $40 \mu\text{g/ml}$ میزان مرگ سلولی بعد از ۲۴ ساعت 76 ٪ و بعد از ۴۸ ساعت به $93/3$ ٪ رسید [۲۷]. نتایج این مطالعه نشان داد که ازون وابسته به دوز سبب مرگ سلولهای Hela می‌شود که نتایج آن کاملاً هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

در مطالعه‌ای دیگر اثرات انتخابی گاز ازون بر روی ممانعت از رشد سلول‌های سرطان انسانی بررسی شد و مشخص گردید، به کار گرفتن مقدار $0/3$ ، $0/5$ و $0/8$ واحد از ازون در هر میلیون به ترتیب، رشد سلول‌های سرطانی را ۴۰، ۶۰ و ۹۰ درصد کاهش می‌دهد. این تحقیق نقش بسیار واضح ازون در سرکوب ژن‌های دخیل در سرطان را نشان می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر که روند افزایشی مقدار ازون را در کاهش بیان ژن‌های دخیل در سرطان کولون نشان می‌دهد، مطابقت کامل داشت [۲۴].

HIF-1 alpha در بین ۱۳ تومور از ۱۹ تومور نسبت به بافت‌های نرمال به میزان بسیار بالایی بیان می‌شود، بافت‌های سرطانی که میزان بیان حداکثری این ژن در آن‌ها ملاحظه گردیده است شامل بافت‌های

catenin به شکل بالایی در سرطان کولون دیده شده که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت بسیار بالایی دارد [۴۵].

از یافته‌های Korinek و همکارانش نتایجی همانند تحقیق ما برمی آید، آن‌ها نشان دادند، β -catenin در رشد نئوپلاستیک کولون دخیل می‌باشد که در این مطالعه میزان تراکم آن در گروه بیمار بیشتر بوده و نشانگر تجمع زیاد این پروتئین در سلول‌های دیسپلاستیک اپیتلیوم کولون می‌باشد. این امر در تحقیق ما نیز با توجه به بیان بالای β -catenin در بافت‌های مبتلا به سرطان کولون موش مشاهده گردید [۴۶].

مطالعاتی که توسط Rosario و Brembeck انجام شد نشان داد، پروتئین β -catenin یک پروتئین چند منظوره است که نه تنها به همراه پروتئین کادهرین در اتصال بین سلولی نقش دارد، بلکه می‌تواند در موارد کارسینوم کولون به عنوان یک شاخص تشخیصی و نیز پیشرفت رشد تومور اهمیت داشته باشد [۴۷]. تمامی مطالعات انجام شده نشان بر اهمیت دو β -catenin و HIF-I در سرطان کولون می‌باشد و نشانگر این حقیقت است که، دو ژن فوق در بافت‌های بیمار در سطح بالایی بیان می‌شوند و با تیمار با عوامل مختلف نظیر گاز ازون، بیان آن‌ها تقلیل می‌یابد، هرچند از نظر تشخیصی اهمیت HIF-I نسبت به β -catenin، با توجه به میزان بیان متفاوت آن در مراحل مختلف سرطان تا حدی کمتر می‌باشد.

نتیجه گیری

بیان ژنهای β -catenin و HIF-I در بافت کولون موش‌های تیمار شده با آزوکسی متان و DSS نسبت به موش‌های سالم افزایش نشان می‌دهد که نشان دهنده دخالت این دو ژن در ایجاد و یا توسعه سرطان کولون می‌باشد. درمان با دوزهای مختلف ازون باعث کاهش بیان این ژن‌ها می‌شود؛ از بین دوزهای مورد استفاده بیشترین تأثیر در کاهش بیان این ژن‌ها مربوط به دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد به صورت کلی می‌توان نتیجه گرفت که تیمار با ازون می‌تواند به عنوان یک راه حل درمانی در درمان سرطان کولون به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.BMSU.REC.1398.069 در دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله به خاطر حمایت مالی جهت انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and Mortality of Various Cancers in Iran and Compare to Other Countries: A Review Article. 2018;47(3):309-316.
- Wang RA, Li QL, Li ZS, Zheng PJ, Zhang HZ, Huang XF, et al. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med.* 2013;17(1):205-211. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01663.x PMID: 23305095
- Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol.* 2009;20(3):556-563. DOI: 10.1093/annonc/mdn642 PMID: 19073863
- Wickham R, Lassere Y, editors. The ABCs of colorectal cancer. Seminars in oncology nursing, Elsevier 2007.
- Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal*

اینکه شواهد بافت شناسی مبنی بر رگزایی و تهاجم وجود داشته باشد بیان آن افزایش می‌یابد [۳۹].

همانطور که مطالعات گوناگون نشان می‌دهد، بررسی میزان نقش HIF در سرطان کولون نیاز به بررسی مختلفی دارد. به طور مثال، در این زمینه می‌توان گفت، ایزوفرم های مختلف HIF، یعنی HIF-2 α و HIF-1 α عملکردهای سلولی مختلفی در سرطان کولون دارند. در این زمینه می‌توان به تحقیقات متنوعی اشاره کرد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Takaaki Imamura صورت گرفت، مشخص گردید، HIF-1 α رشد سلول‌های سرطان کولون SW480 را افزایش می‌دهد. اما از طرفی دیگر مشخص گردید، HIF-2 α رشد آن را متوقف می‌کند. در نتیجه این امر می‌توان بیان کرد، روش‌های درمانی مبتنی بر مواد گوناگون که هدف اصلی آن‌ها ایزوفرم های HIF می‌باشد، نیاز به بررسی ویژگی‌های اختصاصی هر ایزوفرم دارد [۳۹].

پیچیدگی شبکه پیام رسان مولکولی و از کنترل خارج شدن آن در بسیاری از انواع سرطان‌ها معضل بزرگی در راستای تولید و توسعه داروهای ضد سرطان ایجاد کرده است [۴۰]. برای مثال مسیره‌های Hedgehog، Wnt و Notch با فعال کردن عوامل رونویسی موجب بیان بسیاری از ژن‌های ضروری می‌گردند. مسیر Wnt که عمدتاً در مسیر تکاملی و تکوینی نقش دارد با بیان نابجا موجب تومورزایی و بدخیمی می‌شود. ارتباط قوی بین بیان اجزای پیام رسان Wnt با miRNA، نشان دهنده معرفی miRNA‌ها به عنوان اهداف درمانی در برابر متاستاز است [۴۱].

بتاکتینین یک مولکول مرکزی و اصلی در مسیر پیام رسانی داخل سلولی است و بیشتر به عنوان عامل دخیل در سرطان زایی و تومورزایی در انواع سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان معده و کولون شناخته می‌شود. مطالعات پیشین درباره سرطان کولون، ارتباط بین پیدایش بتاکتینین هسته‌ای، و خامت بیماری و بقای ضعیف‌تر بیماران را نشان داده است [۴۲].

براساس نتایج Wanitsuwan و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید، پایداری بیش از حد بتاکتینین به صورت تجمع هسته‌ای آن در پیشگویی نتایج سرطان‌های کولورکتال بسیار حائز اهمیت می‌باشد [۴۳]. Brabetz و همکاران در سال ۲۰۰۰ به پدیدار شدن بیش از اندازه این پروتئین در هسته و ارتباط آن با اندازه نئوپلاسم‌ها اشاره نمودند [۴۴] و Hideki و Yasuhiro در سال ۲۰۰۳ در مورد تراکم بتاکتینین در اپیتلیوم دیسپلاستیک کولون نتایجی را ارائه دادند که با نتایج مطالعه ما کاملاً هم راستایی دارد. در این تحقیق نیز بیان β -

9. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;**2**(1):66-70. DOI: 10.4103/0976-9668.82319 PMID: 22470237
10. Razumovskii S, Zaikov GE. Ozone and its reactions with organic compounds. *Studies in organic chemistry.* 1984:15.
11. Folinsbee L. Effects of ozone exposure on lung function in man: a review. *Reviews Environ Health.* 1981;**3**(3):211-240.
12. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;**216**(3):493-504. DOI: 10.1016/j.taap.2006.06.009 PMID: 16890971
13. Shoemaker JM. Ozone therapy: History, physiology, indications, results. Nottingham, PA.2005. 114 p.
14. Hao K, Tang S, Xie H, Li X, He X. Application of ozone therapy in interventional medicine. *J Interv Med.* 2019;**2**(1):8-11. DOI: 10.1016/j.jimed.2019.05.003 PMID: 34805862
15. Hirpara JL, Clement MV, Pervaiz S. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem.* 2001;**276**(1):514-521. DOI: 10.1074/jbc.M004687200 PMID: 11016925
16. Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, et al. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ.* 2004;**11**(7):737-746. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401389 PMID: 15002036
17. Evens AM, Lecane P, Magda D, Prachand S, Singhal S, Nelson J, et al. Motexafin gadolinium generates reactive oxygen species and induces apoptosis in sensitive and highly resistant multiple myeloma cells. *Blood.* 2005;**105**(3):1265-1273. DOI: 10.1182/blood-2004-03-0964 PMID: 15388578
18. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011;**1**:29. DOI: 10.1186/2045-9912-1-29 PMID: 22185664
19. Doustar Y, Mohajeri D, Fathi Azar F, Namvaran A. Immunohistochemical study of β -catenin in experimental colon carcinoma of rat. *Veterinar Clinic Pathol Quarter Sci J.* 2009;**3**(2):451-458.
20. Smith AJ, Oertle J, Warren D, Prato D. Ozone therapy: a critical physiological and diverse clinical evaluation with regard to immune modulation, anti-infectious properties, anti-cancer potential, and impact on anti-oxidant enzymes. *Open J Molecular Integrative Physiol.* 2015;**5**(3):37. DOI: 10.4236/ojmip.2015.53004
21. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;**36**(1):1-12. DOI: 10.1038/emm.2004.1 PMID: 15031665
22. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2000;**88**(4):1474-1480. DOI: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474 PMID: 10749844
23. Shemirani AI, Haghghi MM, Zadeh SM. Simplified MSI marker panel for diagnosis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;**12**(8):2101-2104.
24. Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science.* 1980;**209**(4459):931-933. DOI: 10.1126/science.7403859 PMID: 7403859
25. Bucci B, Cannizzaro A, Brunetti E, Martinelli M. Ozone treatment inhibits proliferation in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Rivista Italia Ossigeno Ozonoter.* 2006;**5**(2):85-92.
26. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J.* 2012;**31**(12):2714-2736. DOI: 10.1038/emboj.2012.150 PMID: 22617422
27. Mary V, Lahijani H, Khan F. Ozone induced cell death in HeLa cell culture mediated through stimulation of TNF-Alpha. *MOJ Immunol.* 2015;**2**(4). DOI: 10.15406/moji.2015.02.00051
28. Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther.* 2009;**8**(14):1313-1317. DOI: 10.4161/cbt.8.14.8983 PMID: 19502780
29. Barderas R, Villar-Vazquez R, Fernandez-Acenero MJ, Babel I, Pelaez-Garcia A, Torres S, et al. Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Sci Rep.* 2013;**3**:2938. DOI: 10.1038/srep02938 PMID: 24126910
30. Ingram N, Northwood EL, Perry SL, Marston G, Snowden H, Taylor JC, et al. Reduced type II interleukin-4 receptor signalling drives initiation, but not progression, of colorectal carcinogenesis: evidence from transgenic mouse models and human case-control epidemiological observations. *Carcinogenesis.* 2013;**34**(10):2341-2349. DOI: 10.1093/carcin/bgt222 PMID: 23784081
31. Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science.* 2002;**296**(5567):557-559. DOI: 10.1126/science.296.5567.557 PMID: 11964485
32. Simonetti V, Quagliarillo V, Giustetto P, Franzini M, Iaffaioli RV. Association of Ozone with 5-Fluorouracil and Cisplatin in Regulation of Human Colon Cancer Cell Viability: In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Ozone in Colon Cancer Cells Exposed to Lipopolysaccharides. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;**2017**:7414083. DOI: 10.1155/2017/7414083 PMID: 29721026
33. Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, et al. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003;**9**(3):491-494. DOI: 10.3748/wjg.v9.i3.491 PMID: 12632503
34. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;**394**(6692):485-490. DOI: 10.1038/28867 PMID: 9697772
35. Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer.* 2009;**9**:432. DOI: 10.1186/1471-2407-9-432 PMID: 20003271
36. Mansour RN, Enderami SE, Ardeshirylajimi A, Fooladsaz K, Fathi M, Ganji SM. Evaluation of hypoxia inducible factor-1 alpha gene expression in colorectal cancer stages of Iranian patients. *J Cancer Res Ther.* 2016;**12**(4):1313-1317. DOI: 10.4103/0973-1482.199542 PMID: 28169245
37. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res.* 2004;**10**(24):8554-8560. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0946-03 PMID: 15623639
38. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Bertoni F, Kwee I, et al. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol.* 2008;**39**(10):1483-1494. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.02.013 PMID: 18619649
39. Lopez-Lazaro M. Hypoxia-inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;**15**(12):2332-2335. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0369 PMID: 17164353
40. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;**5**(4). DOI: 10.1101/cshperspect.a006098 PMID: 25833940
41. Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Eur J Cancer.* 2015;**51**(12):1638-1649. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.04.021 PMID: 26025765
42. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Develop.* 2000;**14**(15):1837-1851. DOI: 10.1101/gad.14.15.1837
43. Wanitsuwan W, Kannurn S, Boonpattananapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2008;**14**(39):6052-6059. DOI: 10.3748/wjg.14.6052 PMID: 18932285

44. Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G, Kirchner T. Expression of nuclear β -catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *America J Pathol.* 2000;**156**(3):865-870. **DOI:** [10.1016/S0002-9440\(10\)64955-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64955-3)
45. Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis.* 2003;**24**(6):1015-1019. **DOI:** [10.1093/carcin/bgg041](https://doi.org/10.1093/carcin/bgg041) **PMID:** [12807742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12807742/)
46. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* 1997;**275**(5307):1784-1787. **DOI:** [10.1126/science.275.5307.1784](https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784) **PMID:** [9065401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9065401/)
47. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;**16**(1):51-59. **DOI:** [10.1016/j.gde.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.12.007) **PMID:** [16377174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16377174/)