مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۲, شمـــاره‌ی ۹۴, آذر و دی ۱۳۹۳, صفـحات ۵۲ تا ۶۰

نقش سیستم هم اکسیژناز بر روی رشد تومور ملانوما در موش های نژاد C57Bl6

دکتر فائزه مرتضوی[۱]، دکتر خاطره عبدالملکی[۱]، دکتر امیرعباس صامتی[۲]، دکتر عطیه هاشمیان[۲]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۳]

نویسنده‌ی مسوول: مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشکده‌ی پزشکی اصفهان shaghayeghhaghjoo@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۸/۲۵ پذیرش: ۹۳/۴/۹

چکیده

زمینه و هدف: *شواهدی در مورد رابطه‌ی هم اکسیژناز با بسیاری از سرطان‌ها در دسترس است. هم اکسیژناز با اثر آنتی آپوپتوزی در رشد تومورها نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر هم اکسیژناز بر میتوز سلول‌های تومور ملانوما و اندازه‌ی این تومورها در موش‌های C57BL6 بود.*

روش بررسی: *سلول‌های ملانومای $B_{16}F_{10}$ به ۱۸ موش C57BL6 با سن ۸ هفته به‌صورت زیر جلدی تزریق شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول (n=6)، Zinc Protoporphyrin (Znpp) (مهار کننده‌ی هم اکسیژناز- ۱)؛ گروه دوم (n=6)، Hemin (فعال کننده‌ی هم اکسیژناز- ۱) و گروه سوم (گروه کنترل) (n=6) فقط رقیق کننده تزریق را، به‌صورت یک روز در میان از روز اول مطالعه، طی ۱۶ روز دریافت نمودند. تومورها در روز شانزدهم مطالعه خارج شدند. طول و عرض تومورها اندازه‌گیری شد و فعالیت میتوزی با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی و شمارش سلول‌های Ki-67 مثبت زیر لام مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد وزن و اندازه‌ی تومور و ایندکس میتوزی در موش‌های تیمار شده با Hemin به‌طور معنی‌داری بیش از دو گروه دیگر بود ($P\leq ۰/۰۵$)؛ اما ایندکس میتوزی و اندازه و وزن تومور در گروه دریافت کننده‌ی Znpp و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت.*

نتیجه گیری: *تحریک مسیر هم اکسیژناز-۱ به وسیله‌ی تزریق hemin می‌تواند موجب افزایش رشد تومور ملانوما شود. با این حال مهار این مسیر به وسیله‌ی مهارکننده‌های هم اکسیژناز -۱ ممکن است بر کاهش رشد و اندازه‌ی تومور و ایندکس میتوزی اثری نداشته باشد.*

واژگان کلیدی: *ملانوما، هم اکسیژناز، ایندکس میتوزی*

مقدمه

ملانومـا، کـه از تغییـر شـکل سـلول‌هـای ملانوسـیت در پوست ایجاد می‌شـود، کـشنده‌تـرین سـرطان پوسـت اسـت. خطر ابتلا به ملانوما با افزایش سن زیاد می‌شود. بروز ملانوما در ۲۰ سـال گذشـته دو برابـر شـده اسـت (۱). اسـترس اکسیداتیو (OS) با پاتوژنز سـرطان‌هـا در ارتبـاط اسـت (۲). اسـترس اکـسیداتیو دارای دو پیامـد متـضاد در سـلول‌هـای سرطانی می‌باشد: از یک سو با گسترش و حفظ فنوتیپ سلول تومـوری (H_2O_2) افـزایش و مهـاجرت و چـسبندگی ایـن

۱- دکترای حرفه‌ای پزشکی، کمیته پژوهشی دانشجویان دانشکده‌ی پزشکی، اصفهان
۲- دکترای حرفه‌ای دندانپزشکی، کمیته پژوهشی دانشجویان دانشکده‌ی دندانپزشکی، اصفهان
۳- دکترای فیزیولوژی، دانشیار دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کابردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

سلول‌ها را در رابطه با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تحریک می‌کند و از سویی دیگر با فعالیت‌های ضد سرطانی و پیری و اپوپتوزیز همراه است (۴و ۳). امروزه تقریبا شواهد قابل استناد درباره‌ی نقش استرس اکسیداتیو در اتیولوژی سرطان‌ها به‌دست آمده است (۵). هم اکسیژناز (Hemeoxygenase) در پدیده‌ی استرس اکسیداتیو نقش کلیدی دارد (۶). در شرایط استرس اکسیداتیو و التهابی به نظر می‌رسد هم اکسیژناز نقش محافظتی از سلول‌ها را داشته باشد و در بعضی از بیماری‌های التهابی مانند التهابات کبد نقش درمانی داشته باشد (۷). بیان این ژن در پاسخ به استرس، هیپوکسی، تابش اشعه‌ی فرابنفش، اثر فلزات سنگین، ROS، نیتریک اکسید (NO)، فاکتورهای رشد آنتی‌اکسیدانی، هورمون‌ها، آنتی‌توکسین‌ها، هِم/همگلوبین و همچنین شیمی درمانی، رادیو تراپی و فتودینامیک تراپی افزایش می‌یابد (۱۱-۸). مطالعات زیادی در رابطه با یافتن ارتباط هم اکسیژناز با سرطان انجام شده است و نتایج حاکی از ارتباط بسیاری از سرطان‌ها مانند لنفوسارکوما، ادنوسارکوما، هپاتوما، سرطان پروستات، سارکوم کاپوزی، سرطان پانکراس و تومورهای مغزی با هم اکسیژناز است (۱۲). این در حالی است که مکانیسم اثر بسیاری از داروهای ضد سرطان ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در سلول می‌باشد (۱۳). بنابراین افزایش بیان HO-1 (افزایش تحمل سلول نسبت به شرایط افزایش استرس اکسیداتیو) می‌تواند در بیماران سرطانی به‌عنوان علت بالقوه مقاومت افراد به درمان‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در نظر گرفته شود (۱۵و ۱۴).

HO-1 در سلول‌های نئوپلاستیک و تومورهای مختلف نقش آنتی آپوپتوزی دارد و به رشد تومورها منجر می‌شود (۱۶). تحقیقات متعددی اثرات آپوپتیک مهارکننده‌های HO-1 را به تنهایی یا به‌عنوان داروهای مکمل شیمی درمانی اثبات نموده‌اند (۱۷). آزمایشات نشان می‌دهد که مهار HO-1 با موادی مانند ZnPPIx، PEG-ZnPP در نمونه‌های حیوانی و رده‌های سلولی سرطانی آدنوکارسینوما، سرطان پانکراس، سرطان روده و لوکمی مزمن میلوئیدی به کاهش توده‌ی تومور و افزایش حساسیت به شیمی درمانی منجر می‌شود؛ در نتیجه به‌عنوان یک راه درمانی در نظر گرفته شده است (۱۹-۱۷، ۱٤، ۲). نکته‌ی قابل توجه این که در سلول‌های مقاوم به درمان با اضافه نمودن مهار کننده‌ی HO-1، سلول‌ها به درمان پاسخ بهتری می‌دهند و امکان مرگ سلول‌های سرطانی بیشتر می‌شود. این اثر در یک رده‌ی سلولی لوکمی مزمن میلوئیدی و در آزمایش با نمونه‌های حیوانی گزارش شده است (۲۰، ۱۷). مهار کننده‌های HO-1 مثل (PEG-ZnPP)-Zn(II)PPIX موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۱، ۱٤). با توجه به این که در خصوص اثر مهار کننده‌ی هم اکسیژناز (Zn(II)PPIX) بر سلول‌های تومور ملانوما اطلاعات کاملی در دسترس نیست، این مطالعه با هدف بررسی اثر مسیر هم اکسیژناز بر میتوز سلول‌های تومور و اندازه‌ی تومورهای ملانوما در موش‌های C57BL6 انجام پذیرفت.

روش بررسی

کشت سلول‌های تومورملانوما: سلول‌های $B_{16}F_{10}$ از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. این سلول‌ها به دلیل یکسان بودن نوع سلول با گونه‌ی موش مورد مطالعه انتخاب شدند. سلول‌ها در محیط کشت M_{199} حاوی سرم جنینی گاوی ۱۰ درصد (شرکت Invitrogen،کشور آمریکا)، و آنتی‌بیوتیک‌هایی شامل پنی‌سیلین و استرپتومایسین (100 µg/ml Gibco آمریکا) کشت داده شدند و زمانی که تراکم سلولی به ۸۰ درصد رسید، برای تزریق به موش آماده شدند. تعداد سلول‌های زنده قبل از تزریق با رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد (۲۲). برای انجام این مطالعه تعداد ۱۸ موش C57BL6 با سن ۸ هفته به‌طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. به همه‌ی موش‌ها در روز صفر مطالعه،

10^6 سلول ملانوما به‌صورت زیر جلدی در پهلوی چپ تزریق شد و موش‌ها به‌مدت ۱۶ روز تیمار شدند. گروه اول (n=6)، ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم (Znpp سیگما، آلمان) مهار کننده‌ی هم اکسیژناز- ۱ (۲۳)، گروه دوم (n=6)، ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فعال کننده‌ی هم اکسیژناز- ۱ (Hemin سیگما، آلمان) (۲۴) و گروه سوم (گروه کنترل)، (n=6) بافرفسفات سالین، از روز اول و به صورت یک روز درمیان دریافت نمودند. موش‌ها هر روز از جهت وجود توده‌ی قابل لمس در محل تزریق بررسی شدند. درصورت وجود توده‌ی ابعاد آن توسط ریزسنج اندازه‌گیری وثبت شد. محققی که تومورها را اندازه‌گیری می‌نمود از گروه موش‌ها بی‌اطلاع بود. موش‌ها در روز ۱۶ مطالعه توسط کتامین (۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) زیرجلدی بیهوش و دچار مرگ آسان شدند (۲۵). در مطالعه‌ی پایلوتی که انجام شد مرگ و میر فزاینده‌ی موش‌ها از روز ۱۶ شروع شد لذا مدت زمان انجام این مطالعه ۱۶ روز تعیین شد. سپس حیوان لاپاروتومی شده، تومور جدا شد و در فرمالین برای آزمایشات بعدی فیکس شد. این مطالعه در سال ۹۰ و در مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام پذیرفت. این طرح مورد تایید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قرار گرفته است.

ایمنوهیستوشیمی: ارزیابی فعالیت میتوزی Ki-67 با رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی انجام پذیرفت. که در آن از آنتی‌بادی بر علیه آنتی ژن Ki-67 استفاده شد. بافت‌ها توموری در ضخامت (۴ میکرونی) برش داده شد و روی لام قرار گرفت. پس از پارافین‌زدایی با گزیلین و دهیدراته شدن با الکل، لام‌ها با آنتی‌بادی اولیه‌ی مونوکولونال (MIB-1) و رقت ۱:۱۰۰ (DAKO دانمارک) بر ضد Ki-67 کلون، به‌مدت نیم ساعت انکوبه شدند. ایندکس Ki – 67 به‌صورت تعداد سلول‌های ki-67 مثبت به تعداد کل سلول‌های نئوپلاستیک و به صورت درصد محاسبه شد.

بر حسب درصد سلول‌های ki-67 لام‌ها را به چهار دسته تقسیم کردیم.

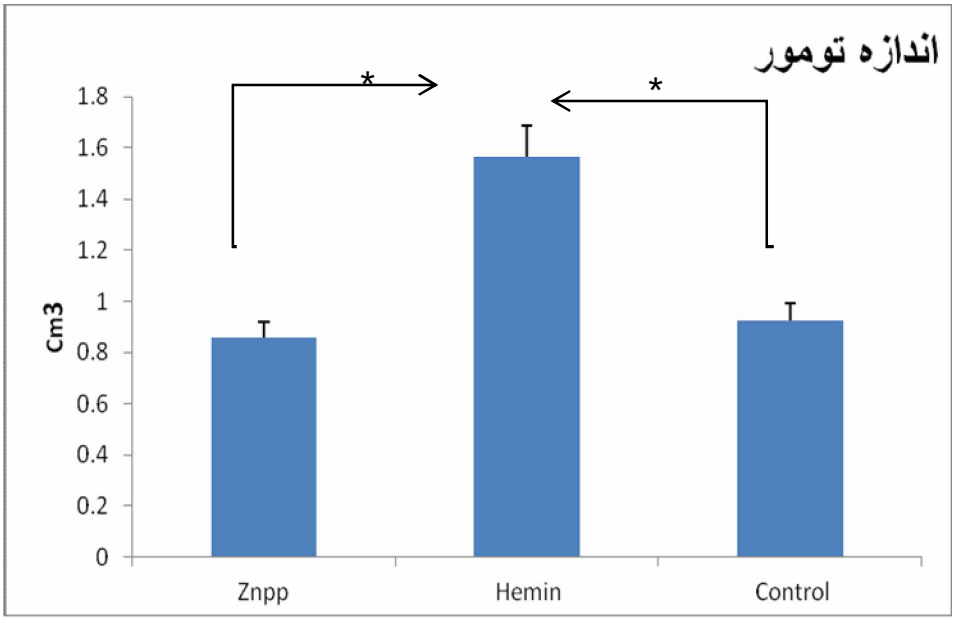
درصد ki-67 مثبت	گرید
%۲۵-۰	0
%۵۰-۲۶	1
%۷۵-۵۱	2
%۱۰۰-۷۶	3

بررسی اندازه‌ی تومور: طول و عرض تومور به وسیله‌ی کولیس (ریز سنج) اندازه‌گیری شد و به‌وسیله‌ی فرمول: $Tumor\ Volume = ((Width2) \times Length) \times 0/52$ محاسبه شد (۲۷و ۲۶). براساس آزمون کلموگروف- اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. در پایان، نتایج با استفاده از آزمون One Way ANOVA و پس آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

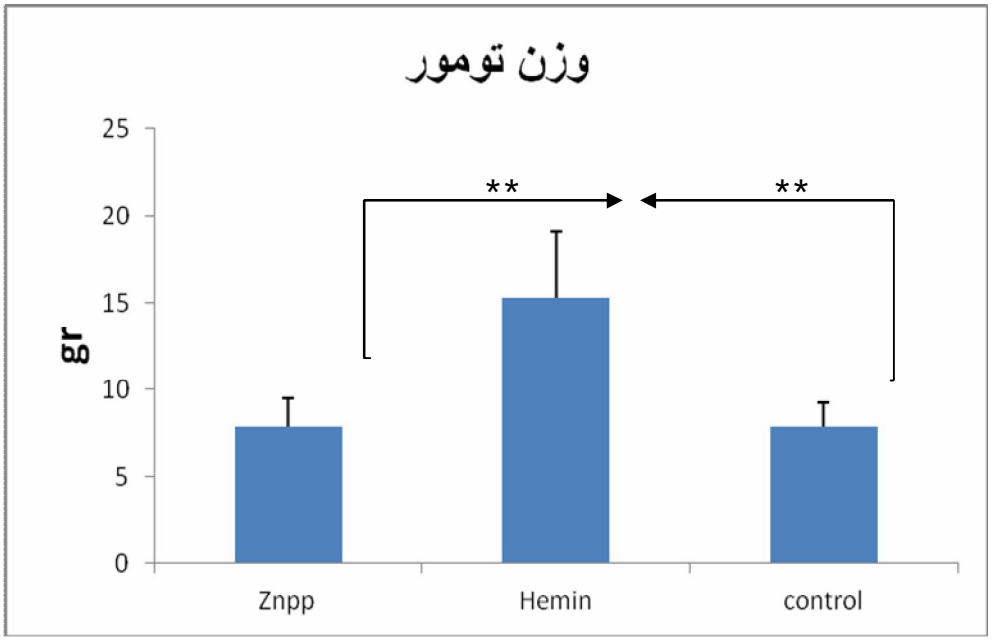
از مجموع ۱۸ موشی که وارد مطالعه شدند دو موش در گروه دریافت کننده‌ی Hemine و یک موش در گروه دریافت کننده‌ی Znpp قبل از روز ۱۶ مردند و از مطالعه خارج شدند. همان طوری که شکل ۱ نشان می‌دهد، وزن و اندازه‌ی تومورها در گروه دریافت کننده‌ی Hemin نسبت به دو گروه دیگر (دریافت کننده‌ی Znpp و گروه کنترل) بیشتر بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود. ($P\leq0/05$) در حالی که اختلاف بین گروه دریافت کننده‌ی Znpp و گروه کنترل در وزن و اندازه تومور، تفاوت معنی‌داری نداشتند. ($P>0/05$). (شکل ۲و ۱). ایندکس میتوزی که به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی منوکلونال ضد ki-67 تعیین شد؛ نشان داد که در تومور موش‌هایی که با Hemin تیمار شده بودند به‌صورت معناداری بیش از دو گروه دیگر بود ($P\leq0/05$). ولی گروه دریافت کننده‌ی Znpp و گروه کنترل

در ایندکس میتوزی تفـاوت معنـاداری نداشـتند (P>0/05) (شکل ۳).



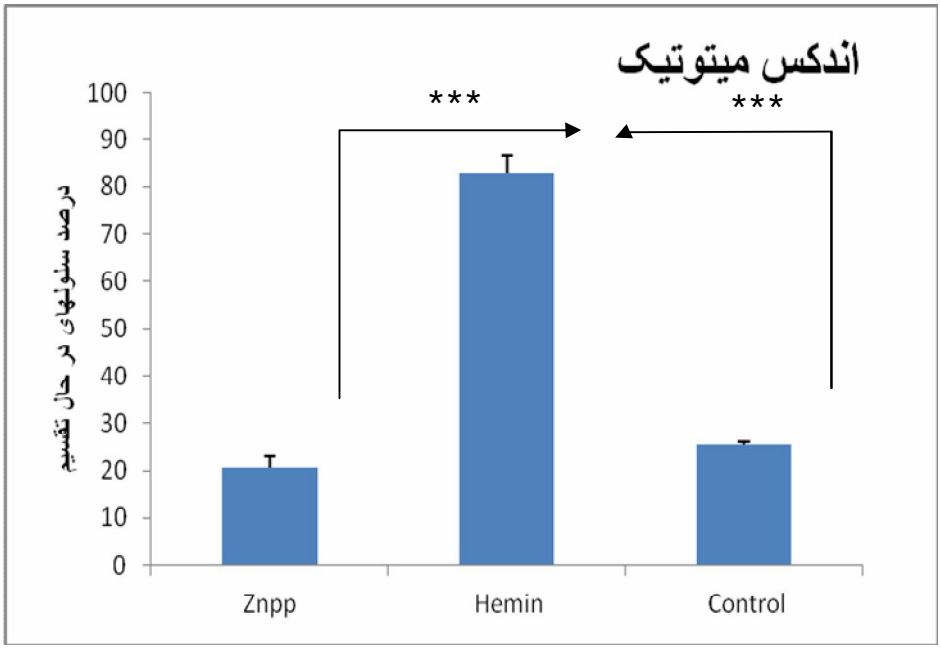
شکل ۱: مقایسه‌ی میانگین اندازه‌ی تومور در سه گروه دریافت کننده‌ی Znpp و Hemin و گروه کنترل

** تفاوت اندازه‌ی تومور بین گروه دریافت کننده‌ی Znpp و کنترل با گروه دریافت کننده‌ی Hemine معنادار است.*



شکل ۲: مقایسه‌ی میانگین وزن تومور در سه گروه دریافت کننده‌ی Znpp و Hemin و گروه کنترل

*** تفاوت وزن تومور بین گروه دریافت کننده‌ی Znpp و کنترل با گروه دریافت کننده‌ی Hemine معنادار است.*



شکل ۳: مقایسه‌ی میانگین ایندکس میتوزی در سه گروه دریافت کننده‌ی Znpp و Hemin و گروه کنترل

****** تفاوت ایندکس میتوزی تومور بین گروه دریافت کننده‌ی Znpp و کنترل با گروه دریافت کننده‌ی Hemine معنادار است.***

بحث

هم اکسیژناز در سلول‌های نئوپلاستیک و تومورهای مختلف، نقش آنتی آپوپتوزی دارد و باعث رشد تومورها می‌شود (۱۸و ۱۶). تحقیقات متعددی اثرات آپوپتوتیک مهار کننده‌های HO-1 را به تنهایی یا به‌عنوان داروهای مکمل شیمی درمانی اثبات نموده‌اند (۱۷)، با این وجود نقش هم اکسیژناز در پیشرفت تومور هنوز کاملا واضح نیست، و در این زمینه نتایج ناسازگار یا کاملا متضاد وجود دارد (۱۲). Znpp موثرترین مولکول در کاهش بیان هم اکسیژناز است. این مولکول در کمبود آهن افزایش می‌یابد. Znpp به عنوان مهارکننده‌ی هم اکسیژناز می‌تواند برای سلول‌های سرطانی سایتوتوکسیک و سایتواستاتیک باشد (۲۸). در بررسی ما Znpp نتوانست اثری بر روی اندازه و وزن تومورها داشته باشد. این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت‌های شرایط آزمایشگاهی (In vitro) با بدن موجود زنده (In vivo) باشد؛ اگر چه در شرایط آزمایشگاهی مهار کننده‌ی هم اکسیژناز (Znpp) می‌تواند اثرات سایتوتوکسیک و سایتواستاتیک داشته باشد (۲۹). در مطالعه‌ی ما که یک مطالعه‌ی In vivo بود مهارکننده‌ی هم اکسیژناز نتوانست وزن، اندازه‌ی تومور را در موش‌ها کاهش دهد. در این مطالعه Znpp اثری بر ایندکس میتوزی ملانوما نداشت. مطالعه‌ی Hirai و همکاران بر روی تومور LL/2 ریه‌ی موش به این نتیجه رسید که Znpp به‌صورت معناداری بروز تومور را در موش‌ها نسبت به گروه کنترل کم می‌کند (۲۱). اختلاف این مطالعه با مطالعه‌ی ما می‌تواند به علت تفاوت در تومور مورد مطالعه باشد. ایندکس میتوزی در گروه دریافت کننده‌ی Znpp با گروه کنترل هم تفاوت معناداری نداشت. افزایش بیان هم اکسیژناز در هایپوکسیا، هایپراکسیا، شوک‌های گرمایی، H_2O_2 و فرابنفش دیده شده است (۳۱و ۳۰). علاوه بر این Hemin هم می‌تواند موجب افزایش بیان هم اکسیژناز شود (۳۲). وقتی رده سلول‌های سرطانی پروستات در معرض دزهای غیر سمی Hemin قرار گرفت، بیان Ho-1 در سطح

پروتئین و mRNA افزایش پیدا کرد. سلول‌هایی که بیان Ho-1 در آن‌ها زیاد شده بود تکثیر و تهاجم بیشتری از خود نشان دادند (۳۳). مطالعه‌ی ما از این یافته حمایت می‌کند زیرا نتایج ما نشان داد که تزریق Hemin موجب افزایش اندازه و وزن تومور می‌گردد و همینطور ایندکس میتوزی را در گروه دریافت کننده‌ی Hemin افزایش می‌دهد. با این وجود مطالعه‌ای اثری مخالف را برای سلول‌های سرطان سینه گزارش کرد (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد افزایش هم اکسیژناز در موش‌های دارای تومور ملانوما می‌تواند تعداد متاستازها را بیشتر کند و بقای آن‌ها را کمتر کند. نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی ما که نشان داد افزایش بیان هم‌اکسیژناز موجب پیش آگهی ضعیف‌تر می‌شود هم‌خوانی دارد. گلینمان و همکاران نشان دادند که با تحریک کردن بیان هم‌اکسیژناز به وسیله‌ی کبالت پروتوپورفیرین Cobalt-Protoporphyrin ((CoPP)) می‌توانند ایندکس میتوتیک را در بافت کبدی که در موش‌ها باززایی کردند، افزایش دهند. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ما که نشان داد با افزایش هم‌اکسیژناز اندکس میتوتیک در تومور ملانوما به صورت معناداری زیاد می‌شود، هم‌خوانی دارد (۳۵). سرعت زیاد رشد تومور و آنژیوژنز بیش از حد تومور و در نتیجه خون ریزی و مرگ زود هنگام موش مدت زمان مطالعه را کاهش داد که از محدودیت‌های این مطالعه بشمار می‌رود. مطالعات بیشتری در این زمینه توصیه می‌شود که با محدود کردن سرعت رشد تومور، اثر مهار کننده و فعال‌کننده‌ی هم اکسیژناز را در محیط In vivo بهتر شناخت.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان دادکه Hemine به عنوان محرک هم اکسیژناز می‌تواند در محیط In vivo رشد سلول‌های توموری ملانوما را افزایش دهد، در حالی که بر خلاف یافته‌های سایر محققان، Znpp اثر معنی‌داری بر کاهش رشد سلول‌های توموری ندارد.

References

1- Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997; 73: 198-203.

2- Chang KW, Lee TC, Yeh WI, et al. Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer*. 2004; 91: 1551-5.

3- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007; 401: 1-11.

4- Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 2335-8.

5- Willett WC, MacMahon B. Diet and cancer--an overview. *N Engl J Med*. 1984; 310: 633-8.

6- Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 1988; 2: 2557-68.

7- Origassa CST, Câmara NOS. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. *World J of Hepatol*. 2013; 5: 541.

8- Doi K, Akaike T, Fujii S, et al. Induction of heme oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in

experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer*. 1999; 80: 1945-54.

9- Maines MD, Abrahamsson PA. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology*. 1996; 47: 727-33.

10- Kiemer AK, Bildner N, Weber NC, Vollmar AM. Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinol.* 2003; 144: 802-12.

11- Henry F, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Induction of antigen presentation by macrophages after phagocytosis of tumour apoptotic cells. *Res Immunol*. 1998; 149: 673-9.

12- Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9: 2099-118.

13- Tiligada E. Chemotherapy: induction of stress responses. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13 Suppl 1: S115-24.

14- Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer*. 2004; 109: 1-8.

15- Yoshida C, Yoshida F, Sears DE, Hart SM, Ikebe D, Muto A, et al. Bcr-Abl signaling through the PI-3/S6 kinase pathway inhibits nuclear translocation of the transcription factor Bach2, which represses the antiapoptotic factor heme oxygenase-1. *Blood*. 2007; 109: 1211-9.

16- Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *International Journal of Cancer*. 2004; 109: 1-8.

17- Mayerhofer M, Gleixner KV, Mayerhofer J, et al. Targeting of heat shock protein 32 (Hsp32)/heme oxygenase-1 (HO-1) in leukemic cells in chronic myeloid leukemia: a novel approach to overcome resistance against imatinib. *Blood*. 2008; 111: 2200-10.

18- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, et al. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2004; 64: 3148-54.

19- Nowis D, Legat M, Grzela T, et al. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene*. 2006; 25: 3365-74.

20- Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res*. 2003; 63: 3567-74.

21- Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, Fujii K, Kuniyasu H. Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *Int J Cancer*. 2007; 120: 500-5.

22- Amjadi F, Javanmard SH, Zarkesh-Esfahani H, Khazaei M, Narimani M. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related

to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 21.
23- Nowis D, Bugajski M, Winiarska M, et al. Zinc protoporphyrin IX, a heme oxygenase-1 inhibitor, demonstrates potent antitumor effects but is unable to potentiate antitumor effects of chemotherapeutics in mice. *BMC Cancer*. 2008; 8: 197.
24- Devadas K, Dhawan S. Hemin activation ameliorates HIV-1 infection via heme oxygenase-1 induction. *The Journal of Immunology*. 2006; 176: 4252-7.
25- Cesarovic N, Jirkof P, Rettich A, Nicholls F, Arras M. Combining sevoflurane anesthesia with fentanyl–midazolam or s-ketamine in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science JAALAS*. 2012; 51: 209.
26- Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjær A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Medical Imaging*. 2008; 8: 16.
27- Diehn F, Costouros N, Miller M, et al. Noninvasive fluorescent imaging reliably estimates biomass in vivo. *Biotechniques*. 2002; 33: 1250-5.
28- Yang G, Nguyen X, Ou J, Rekulapelli P, Stevenson DK, Dennery PA. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood*. 2001; 97: 1306-13.
29- Murali R, Scolyer RA. Tumor-infiltrating lymphocytes and mitotic index in metastatic melanoma as predictors of patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(13): E46; author reply E7.
30- Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ .Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem*. 2000; 275: 13613-20.
31- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem*. 1987; 262: 12889-92.
32- Lin F, Girotti AW. Hyperresistance of leukemia cells to photodynamic inactivation after long-term exposure to hemin. *Cancer Res*. 1996; 56: 4636-43.
33- Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, et al. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2009; 7: 1745-55.
34- Hill M, Pereira V, Chauveau C, et al. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2, 3-dioxygenase. *The FASEB Journal*. 2005; 19: 1957-68.
35- Glanemann M, Schirmeier A, Lippert S, Langrehr J, Neuhaus P, Nussler A, editors. Cobalt-protoporphyrin induced heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration. Transplantation proceedings. Elsevier; 2005.

The Role of Heme Oxygenase -1 System in Melanoma Tumor Growth of C57Bl/6 Mice

Mortazavi FS[1], Abdolmaleki KH[1], Samety AA[2], Hashemian A[2], Haghjooy Javanmard SH[3]

[1]Isfahan Medical Students, Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[2]Isfahan Dental Students Research Committee, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[3]Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Haghjooy Javanmard SH, Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

E-mail: shaghayeghhaghjoo@yahoo.com

Received: 16 Nov 2013 **Accepted:** 30 Jun 2014

Background and Objective: Some evidence about the relationship between heme oxygenase and many cancers is available. Heme oxygenase has anti-apoptotic effects and contributes to tumor growth. The aim of this study was to evaluate the effect of heme oxygenase on melanoma tumor cells mitosis and tumor size in C57BL/6 mice.

Materials and Methods: B16F10 melanoma cells were injected subcutaneously to 18 C57BL6 mice with 8 weeks of age. Mice were randomly divided into three groups: the first group received Zinc protoporphyrin (Znpp), heme oxygenase inhibitor (n = 6), the second group, hemin (heme oxygenase activator) (n = 6) and the third group((control group) (n = 6)) received diluent injection. They received their injection every other day from the first day of study for 16 days. Tumors were extracted in the 16th day of study. Length and width of tumors were measured and mitotic cell activities were evaluated using immunohistochemistry staining and counting Ki-67 posetive cells.

Results: Our study results showed that size and weight of tumor and mitotic index in treated mice by Hemin were higher than two other groups. ($P \leq 0.05$). But mitotic index, tumor size and tumor weight in the recipient Znpp group and the control group were not statistically different.

Conclusion: Stimulation of Hemeoxygenase-1 pathway by hemin injection can increase melanoma tumor growth. However, inhibition of this pathway by Hemeoxygenase -1 inhibitors may not be effective in reducing tumor growth and size.

Keywords: Melanoma, Heme oxygenase, Mitotic index