

## **The cytotoxic effects of Tolmetin on evaluation of Bax and Bcl2 genes expression level in cervical cancer cells (Hela)**

**Noroozi S<sup>1</sup>, Ahmadi R<sup>2</sup>, Pashapour S<sup>3</sup>**

1- Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Eastern Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, I.R. Iran.

3- Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2019/08/3 | Accepted: 2020/01/18

### **Abstract:**

**Background:** Tolmetin ( $C_{15}H_{15}NO_3$ ) is a non-steroidal anti-inflammatory drug that exerts its effects by inhibiting prostaglandins and mainly used in the treatment of acute and chronic arthritis, osteoarthritis, and arthritis. Studies have shown that Tolmetin has anti-carcinogenic effects on different cancer cells. Due to the limited studies on the apoptotic effects of Tolmetin, the present study aimed to evaluate the cytotoxic effects of Tolmetin on the evaluation of Bax and Bcl2 gene expression levels in cervical cancer cells (Hela).

**Materials and Methods:** In this experimental study, the cervical cancer cells were purchased from Pasteur Institute then randomly divided into control group (non-exposure to Tolmetin) and groups exposed to different concentrations of 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/ml of Tolmetin. The cytotoxic effect of Tolmetin was measured using the MTT assay. Also, using Real-Time PCR, expression of BAX, and BCL2 genes was evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA.

**Results:** The concentrations of 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/ml of Tolmetin resulted in cytotoxic effects on Hela cells. And  $IC_{50}$  dose of 5 mg/ml of Tolmetin increased the expression of the apoptotic Bax gene more than the anti-apoptotic BCL2 gene.

**Conclusion:** Tolmetin can possibly cause cell death in cervical cancer cells by inducing the Bax gene and the BCL2 anti-apoptosis gene.

**Keywords:** Tolmetin, Apoptosis, Bax gene, BCL2 gene

**\*Corresponding Author:**

**Email:** drrahmadi@yahoo.com

**Tel:** 0098 912 612 0353

**Fax:** 0098 813 449 4059

**Conflict of Interests: No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2020; Vol. 24, No 1, Pages 31-37*

# بررسی اثرات سیتو توکسیک دارویی تولمین در سطح بیان ژن های Bax و Bcl2 در سلول های سرطانی دهانه رحم (Hela)

ساناز نوروزی<sup>۱</sup> ، رحیم احمدی<sup>۲\*</sup> ، ساناز پاشاپور<sup>۳</sup>

خلاصه:

**سابقه و هدف:** تولمین یک داروی ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAID) است که از طریق مهار ساخت پروستاگلاندین اثر خود را اعمال می کند و اساساً در درمان آرتیت حاد و مزمن، استئوآرتیت و رماتیسم مفصلی کاربرد دارد. مطالعات نشان داده اند که تولمین دارای اثرات آپوپتوز و ضدسرطانی در سلول های سرطانی مختلف می باشد. باتوجه به این که بررسی ها در حیطه اثرات ضدسرطانی تولمین در سلول های سرطانی دهانه رحم بسیار محدود است، این تحقیق با هدف بررسی اثرات سیتو توکسیک تولمین بر بیان ژن های آپوپتوزی Bax و ضد آپوپتوزی Bcl2 در سلول های سرطانی دهانه رحم (Hela) انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این تحقیق تجربی - آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم از انتستیتو پاستور خردباری شد و به گروه های کنترل (عدم مواجهه با دارو) و گروه های در معرض تولمین با دوز های ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲/۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تقسیم بندی شدند. زندگانی سلول ها با روش MTT و میزان بیان ژن Bax و Bcl2 با روش RT-PCR اندازه گیری و داده ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شدند.

**نتایج:** نتایج این پژوهش نشان دادند که دوز های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲/۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تولمین همگی دارای اثر سیتو توکسیک بر سلول های دهانه رحم بوده اند و نیز دوز  $IC_{50}$  ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است که باعث افزایش بیشتر بیان ژن آپوپتوزی Bax نسبت به ژن ضد آپوپتوزی BCL2 شده است.

**نتیجه گیری:** تولمین می تواند با القای وابسته به ژن Bax و ژن ضد آپوپتوزی BCL2 احتمالاً سبب مرگ سلولی در سلول های سرطانی دهانه رحم شود.

**واژگان کلیدی:** تولمین، آپوپتوز، ژن Bax، ژن BCL2

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، صفحات ۳۱-۳۷

## مقدمه

سرطان دهانه رحم، گونه ای سرطان است که از گردن رحم آغاز می شود. این بیماری به دلیل رشد غیر طبیعی سلول ایجاد می شود و این سلول ها می توانند در دیگر اعضای بدن نیز گسترش یابند [۱، ۲]. در سراسر دنیا، سرطان دهانه رحم دارای شیوع قابل توجهی است. تقریباً هفتاد درصد از موارد سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه رخ می دهد [۳].

بر اساس گزارش سال ۲۰۱۰ سازمان بهداشت جهانی، سالانه حدود یک هزار نفر در ایران به سرطان دهانه رحم مبتلا می شوند و حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد از جمعیت زنان بالای ۱۵ سال در کشور ایران در معرض این سرطان هستند [۴]. سرطان دهانه رحم عموماً به دنبال تغییرات پیش سرطانی در مدتی بیش از ده تا بیست سال پیشرفت می کند [۵، ۶]. ضعف سیستم ایمنی به ویژه به صورت اکتسابی و مصرف داروهای سرکوب ایمنی، عاملی مستعد کننده در ابتلاء به سرطان دهانه رحم است [۷]. نتایج تحقیقات نشان داده اند که داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی مثل تولمین می توانند در پیشگیری یا درمان سرطان دهانه رحم مؤثر باشند. تولمین یک داروی ضدالتهابی غیر استروئیدی (NSAID) است که از طریق مهار ساخت پروستاگلاندین اثر خود را اعمال می کند [۸]. مطالعات نشان داده اند این دارو که اساساً در درمان آرتیت حاد و مزمن، استئوآرتیت و رماتیسم مفصلی کاربرد دارد، می تواند در بهبود سرطان های مختلف نیز مؤثر باشد [۹، ۱۰]. گزارش ها حاکی از آن است که تولمین می تواند در القای آپوپتوز و بیان ژن های Bax و Bcl2 در سلول های سرطانی نقش ایفا نماید. ژن Bcl2 به عنوان یک پروتئون کوژن در سلول های ژرمینال در تنظیم فرآیند

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۳. گروه سمسشناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

## \* لشان نیسلده مسئول:

گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۶۱۲۰۳۵۳ | دوره‌نیمس: ۰۹۱۲۶۱۲۰۳۵۳ | ۰۸۱ (۳۴۴۹۴۰۵۹)

پست الکترونیک: drrahahmadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۵/۱۲ | تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۲

می‌تواند به عنوان اطلاعات بنیادی جهت بررسی‌های کاربردی و کلینیکی مورد توجه قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### محلول‌سازی

داروی مورد استفاده در این پژوهش (تولمین) به شکل پودر خالص (به میزان ۱ گرم از شرکت دارویی فارماشیمی) تهیه شد و غلظت‌های  $0.3\text{, }0.6\text{, }1.25\text{, }2.5\text{ و }10$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده گردید. جهت تعیین غلظت‌ها به ۱ گرم از داروی موردنظر،  $100$  میکرو‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم اضافه شد. همچنین جهت حل شدن بهتر،  $1000$  میکرو‌لیتر از محلول بافر فسفات (PBS) به محلول افزوده شد. آن‌گاه محلول بهوسیله فیلتر سرسرنگی، فیلتر و استریل شد. در ادامه  $9$  میلی‌لیتر محیط کشت (DMEM) دارای سرم گاوی جنینی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به محلول فیلتر شده اضافه گردید تا محلول به حجم  $10$  میلی‌لیتر برسد.

کشت سلول و تیمار سلول‌ها

طی این تحقیق تجربی - آزمایشگاهی، رده سلولی سرطانی دهانه رحم (Hela) از انتیتو پاستور خردباری و به صورت منجمد در تانک ازت با دمای  $-196$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طول این مطالعه، رده سلولی سرطانی دهانه رحم گروه‌های تحت‌تأثیر با تولمین با دوزهای ( $0.3\text{, }0.6\text{, }1.25\text{, }2.5\text{ و }10$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تقسیم‌بندی شدند. میزان زنده‌مانی با روش MTT و میزان بیان ژن Bax و Bcl2 با روش RT-PCR اندازه‌گیری شدند.

ستجش (Microculture Tetrazolium Test) MTT

در این راستا جهت ستجش MTT ابتدا با شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو  $1\times 10^4$  سلول از سلول‌های سرطانی Hela در هر چاهک بدستribut با محیط کشت DMEM (America, GIBCO, Invitrogen) دارای سرم گاوی جنینی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. بعد از  $24$  ساعت با غلظت‌های  $0.3\text{, }0.6\text{, }1.25\text{, }2.5\text{ و }10$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولمین تیمار شدند. بعد از  $24$  ساعت مواجهه با تولمین، محیط رویی خارج گردید و سپس  $80$  میکرو‌لیتر محیط کشت تازه و  $20$  میکرو‌لیتر از محلول America, MTT (GIBCO, Invitrogen) اضافه شد. پس از قرار دادن پلیت‌ها به مدت  $4$  ساعت در انکوباتور، تخلیه‌ی کامل محیط کشت انجام شد و  $200$  میکرو‌لیتر محلول دی‌متیل سولفوكساید به هر چاهک

آپوپتوز سلولی دخالت می‌نماید. این ژن یک ژن ضدآپوپتوزی می‌باشد و در صورت کاهش میزان بیان آن، فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شروع می‌شود. از سوی دیگر، پروتئین Bax یا پروتئین X وابسته به Bcl2 پروتئین تنظیم‌کننده آپوپتوز می‌باشد که با ژن Bax رمزگذاری می‌شود. ژن Bax عضو خانواده ژن Bcl2 بوده، تنظیم‌کننده آپوپتوز می‌باشد. همچنین افزایش نسبت ژن Bax به ژن Bcl2 در القای آپوپتوز کلیدی دارد [۱۱-۱۳]. بررسی‌ها نشان می‌دهند داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی یک گروه مهم از داروهای پرصرف جهان هستند و از میان آن‌ها تولمین یکی از مهم‌ترین داروهای است که می‌تواند به عنوان داروی ضدسرطان مطرح باشد [۱۴, ۱۰]. یافته‌های تحقیقی ثابت کرده‌اند که داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی بر درمان سرطان‌های سیستم تولیدمثلی، بهویژه رحم نیز مؤثرند [۱۵]. همان‌طور که مطالعات نشان داد، تعدادی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌توانند در القای آپوپتوز از طریق تغییر سطح بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در سرطان‌های مختلف، بهویژه سرطان دهانه رحم، اثر قابل توجهی داشته باشند. در این راستا، مطالعات نشان داده‌اند تولمین به عنوان یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌تواند اثر درمانی بر سرطان‌ها، بهویژه سرطان‌های دستگاه تولیدمثلی، داشته باشد [۱۵-۱۸]. در مقابل، برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند که بعضی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی دارای اثرات قابل ملاحظه مهاری بر سرطان‌ها نمی‌باشند و می‌توانند منجر به ایجاد ضایعات گوارشی شوند و احتمالاً می‌توانند در ایجاد سرطان‌های گوارشی و کبد نقش داشته باشند [۱۶]. همچنین در برخی تحقیقات دیگر مشخص شده بعضی از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی بر درمان سرطان رحم تأثیری ندارد [۱۷]. در این خصوص نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که شماری از داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی بر سرطان‌های دستگاه تولیدمثلی و سرطان دهانه رحم اثر قابل توجهی ندارند [۱۹-۲۱]. در مجموع با توجه به گسترده‌گی و شیوع سرطان دهانه رحم در جهان و ایران [۴, ۳] و نیز تحمیل عوارض جسمانی، روانی، بالینی و اقتصادی قابل توجه حاصل از ابتلا به سرطان دهانه رحم [۷] در بیماران مبتلا و همچنین نتایج ضدوقایع در خصوص اثرات تولمین بر سرطان دهانه رحم [۱۰, ۱۸-۲۲] و نیز محدودیت مطالعات قبلی در حوزه اثرات تولمین بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات غلظت سیتو توکسیک تولمین بر بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم اجرا شد و نتایج حاصل از این پژوهش ضمن ارائه یافته‌های جدید

## نتایج

سنجه MTT (Microculture tetrazolium test) درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم در مواجهه با دوزهای  $0/3$ ,  $0/6$ ,  $0/25$ ,  $1/25$ ,  $5$  و  $10$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولمین کاهش معناداری یافت و در این راستا با افزایش غلظت تولمین، درصد زنده‌مانی نیز دچار کاهش بیشتری شد (نمودار شماره ۱).

## بررسی بیان ژن‌های BCL2 و BAX

بیان نسبی ژن BAX و BCL2 در گروه تیمارشده با دوز  $IC_{50}$  داروی تولمین دارای افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد بود ( $P < 0/01$ ) (نمودارهای ۲ و ۳). از طرفی نسبت بیان ژن BCL2 به BAX برابر  $1/4$  می‌باشد که نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری است ( $P < 0/01$ ) (نمودار شماره ۴). در مورد افزایش هر دو ژن باید توجه داشت که هر دو دچار افزایش شده‌اند؛ اما به دلیل القای مرگ‌سلولی افزایش ژن ضدآپوپتوزی BCL2 در مقابله با ژن آپوپتوزی BAX ناتوان بوده و از این جهت مرگ‌سلولی رخ داده است. (نمودار شماره ۴)

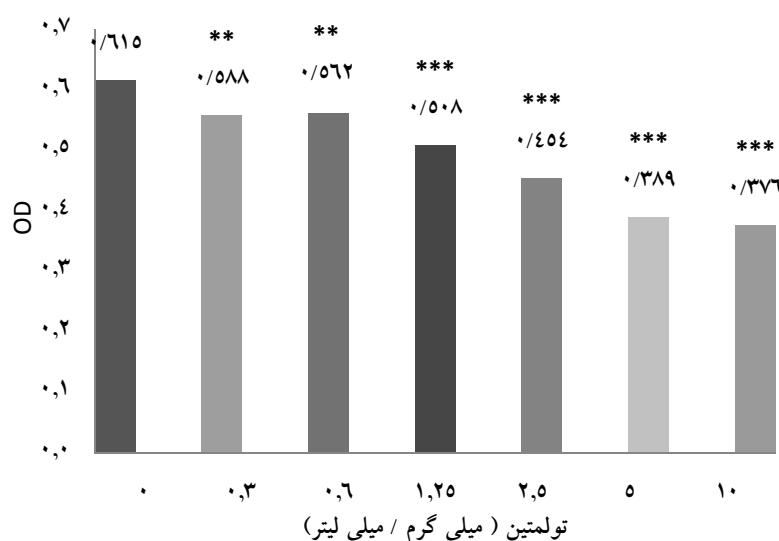
جدول شماره ۱ - توالی پرایمرهای ژن‌های Bcl2 و Bax

	ژن	پرایمر
Bax	Forward: ۵'-CGGCAACTTCAACTGGGG- -3'	
	Reverse: ۵'-TCCAGCCCCACAGCCG-3'	
Bcl2	Forward: ۵'- GGTCCGGTTCAAGGTACTCA - 3' Reverse: ۵'- TTGTGCCCTCTTGAGTCG-3'	

اضافه شد. پس از حل شدن کامل کربستال‌های فورمازان ارغوانی توسط حلال دی‌متیل سولفوکساید، جذب نمونه‌ها در طول موج  $570$  نانومتر با دستگاه الایزا سنجیده شد.

بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl2

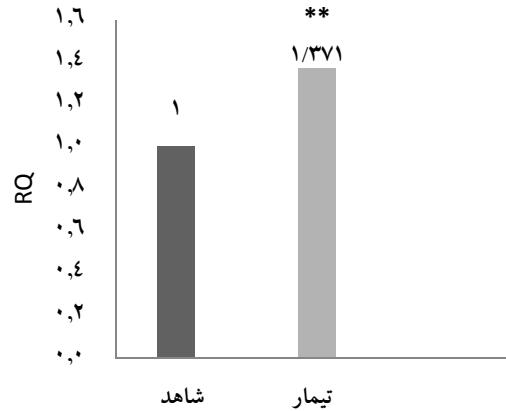
جهت بررسی بیان ژن‌ها از طریق RT-PCR، سلول‌های سرطانی در دیش‌ها به تعداد  $500000$  سلول کاشته شدند. سپس سلول‌ها به مدت  $12$  ساعت انکوبه شدند. پس از آن به مدت  $24$  ساعت با غلظت‌های سیتو توکسیک تیمار شدند، در ادامه بعد از انجام عمل سانتریفیوژ، سلول‌ها جمع‌آوری و به وسیله بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. RNA توتال با استفاده از کیت مخصوص (Roche, 1828 665, Germany) RNA توتال به وسیله کیت استاندارد ۰۱۲ ۰۴ ۳۷۹ ۰۱۲ (Roche, 04 379 012, Germany) به  $cDNA$  ۰۰۱ مونت کردند. پس از آن جهت ارزیابی بیان ژن از پرایمرهای مخصوص ژن‌های Bax و Bcl2 استفاده گردید جدول شماره ۱ [۲۳]. همچنین مولکول PCR گزارشگر فلوروست (سایبرگرین) برای مشاهده پیشرفت PCR به کار رفت. در نهایت، بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta CT$  محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (جهت توزیع طبیعی داده‌ها)، آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند. سطح معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در نظر گرفته شد. این پژوهش در معاونت دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان از نظر کد اخلاقی مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده است.



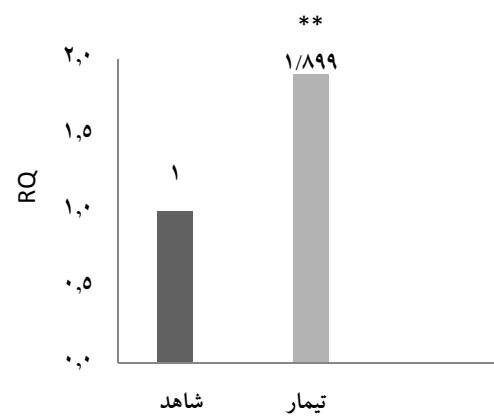
نمودار شماره ۱ - مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف داروی تولمین بر میزان زنده‌مانی رده‌ی سلولی HELA. علامت \* بیانگر مقایسه گروه‌های تجربی با گروه شاهد می‌باشد. ( $*** P < 0/001$ ,  $** P < 0/01$ ,  $*$   $P < 0/05$ )

## بحث

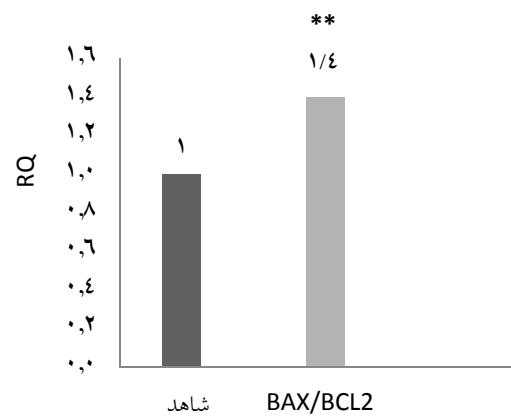
نتایج این تحقیق نشان دادند که دوزهای ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تولمین باعث اثر سیتو توکسیک بر سلول‌های دهانه رحم می‌شود. از سویی با افزایش دوز تولمین، اثر سیتو توکسیک بر سلول‌های دهانه رحم بیشتر می‌گردد. همچنین نتایج این تحقیق بیانگر آن است که تولمین سبب افزایش بیان ژن BAX در سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌شود. موافق با این یافته، نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان می‌دهند که تولمین می‌تواند بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی بهویژه سلول‌های سرطانی دهانه رحم تأثیرگذار باشد. در این راستا، بررسی‌ها نشان می‌دهند که تولمین می‌تواند بر انواع سرطان‌ها اثر سیتو توکسیک داشته باشد. همچنین تولمین می‌تواند باعث بیان ژن‌های آپوپتوزی در انواع سرطان‌ها باشد [۲۴، ۱۰]. در مورد افزایش هر دو ژن باید توجه داشت که هر دو چهار افزایش شده‌اند؛ اما بهدلیل القای مرگ‌سلولی، افزایش ژن ضد آپوپتوزی BCL2 در مقابل با ژن آپوپتوزی BAX ناتوان بوده و از این جهت مرگ‌سلولی رخ داده است. در واقع انواع مختلفی از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی دارای اثرات ضد سرطانی هستند [۲۵]. در تحقیقات انجام شده مشخص شده است که داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی می‌توانند بر انواع سرطان‌های مختلف از جمله سرطان‌های سینه، مثانه، معده، ریه، تخمدان، کولون و سرطان‌های دستگاه تولید مثلی بهویژه سرطان دهانه رحم اثر سیتو توکسیک داشته باشند [۲۴، ۱۴-۲۱]. در این راستا برخی از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی می‌توانند سبب القای بیان ژن آپوپتوزی Bax در انواع سرطان‌های مختلف از جمله سرطان‌های معده، ریه، تخمدان، کولون و سرطان‌های دستگاه تولید مثلی شوند [۲۶، ۲۴-۱۴]. اگرچه در مقابل، مطالعاتی گزارش کرده‌اند که بعضی از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای بر سرطان‌ها نمی‌باشند. در این خصوص، نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که بعضی از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی بر سرطان‌های دستگاه تولید مثلی بهویژه سرطان دهانه رحم مؤثر نمی‌باشند [۱۵-۱۷]. از نظر مکانیسم احتمالی اثر سیتو توکسیک تولمین بر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌توان گفت با توجه به مطالعات قبلی [۲۲-۲۴، ۱۴]. احتمالاً تولمین از طریق مسیرهای میتوکندریایی با اتصال به گیرندهای سلول‌های سرطانی رحم اثر خود را اعمال می‌کند [۲۶]. البته به منظور بررسی دقیق اثرات غلظت سیتو توکسیک تولمین بر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم نیاز به تحقیقات گستردہ‌تر بهویژه در حوزه بیان پروتئین‌ها و ژن‌های آپوپتوزی دیگر، کاسپازها و COX2 می‌باشد. محدوده مورد



نمودار شماره ۲- اثر داروی تولمین بر سطح بیان نسبی ژن BCL2 در رده‌ی سلولی HELA. \* بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد است ( $**P<0.01$ ).



نمودار شماره ۳- اثر داروی تولمین بر سطح بیان نسبی ژن BAX در رده‌ی سلولی HELA. \* بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد است ( $**P<0.01$ ).



نمودار شماره ۴- اثر داروی تولمین بر سطح بیان نسبی ژن BAX /BCL2 در رده‌ی سلولی HELA. \* بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد است ( $**P<0.01$ ).

دهانه رحم می‌باشد و این امر از طریق افزایش بیان ژن آپوپتوزیک وابسته به ژن BAX و ژن ضدآپوپتوزی BCL2 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم اجرا می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با پشتیبانی پژوهانه اختصاص یافته نویسنده مسؤول این مقاله و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق اجرا شده است.

### References:

- [1] Mahmoodi P, Fani M, Rezayi M, Avan A, Pasdar Z, Karimi E, et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *Biofactors* 2019; 45(2): 101-17.
- [2] Koh WJ, Abu-Rustum NR, Bean S, Bradley K, Campos SM, Cho KR, et al. Cervical cancer, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2019; 17(1): 64-84.
- [3] Riahi S, Mokhtari AM, Vali M, Abdzadeh E, Mohseni S, Salehiniya H, et al. The incidence and mortality rate of cervix cancer in Iran from 1990 to 2016: A systematic review and meta-analysis Running title: Cervix cancer in Iran. *J Contemp Med Sci* 2019; 5(1): 315-20.
- [4] Taib S, Ismail N, Mat SN, Shah SA. A Systematic review on factors associated with cervical cancer screening among immigrant women. *Int J Pub Hea Cli Sci* 2019; 6(1): 22-33.
- [5] Sekhon S, Kuroki L, Colditz G. Do cancer survivors understand their risk factors for recurrence and the value of coordinated care between an oncologist and a primary care physician? A survey of endometrial and cervical cancer patients. *J Clin Transl Sci* 2019; 3(1): 121-7.
- [6] Fokdal L, Tanderup K, Pötter R, Sturdza A, Kirchheiner K, Chargari C, et al. Risk Factors for Ureteral Stricture After Radiochemotherapy Including Image Guided Adaptive Brachytherapy in Cervical Cancer: Results From the EMBRACE Studies. *Int J Rad Onc Bio Phy* 2019; 103(4): 887-94.
- [7] Wu J, Ye T, Lv J, He Z, Zhu J. Laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy vs laparoscopic radical hysterectomy in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of clinical efficacy and bladder dysfunction. *J Min Inv Gyn* 2019; 26(3): 417-26. e6.
- [8] Prasher P, Mudila H, Sharma M, Khatri B. Developmental perspectives of the drugs targeting enzyme-instigated inflammation: a mini review. *Med Chem Res* 2019; 28(4): 417-49.
- [9] Jenkins R, Hibberd M. Novel pharmaceutical uses. *Google Patents* 2019; 20(2): 312-316.
- [10] Küçükgüzel SG, Koç D, Çikla-Süzgün P, Özsavci D, Bingöl-Özakpinar Ö, Mega-Tiber P, et al. Synthesis of Tolmetin Hydrazide-Hydrazones and Discovery of a Potent Apoptosis Inducer in Colon Cancer Cells. *Archiv Der Pharmazie* 2015; 348(10): 730-42.
- [11] Dangi AK, Sinha R, Dwivedi S, GUPTA SK, Shukla PS. Cell line techniques and gene editing tools for antibody production: A review. *Front Pharmacol* 2018; 26(9): 630.
- [12] Liu T, Liang H, Liu L, Gong Y, Ding Y, Liao G, et al. Influence of pristine and hydrophobic ZnO nanoparticles on cytotoxicity and endoplasmic reticulum (ER) stress-autophagy-apoptosis gene expression in A549-macrophage co-culture. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019; 167(1): 188-95.
- [13] Schuetz JM, Grundy A, Lee DG, Lai AS, Kobayashi LC, Richardson H, et al. Genetic variants in genes related to inflammation, apoptosis and autophagy in breast cancer risk. *PloS one* 2019; 14(1): 812-6.
- [14] Ghosh AK. Anti-cancer agents and preparation thereof. *Google Patents* 2019; 12(6): 314-18.
- [15] La CV, Tavani A, Garattini S. Adverse effects of preventive therapy in humans. *IARC Sci Publ* 1996(139): 135-42.
- [16] Tomisato W, Tanaka K-i, Katsu T, Kakuta H, Sasaki K, Tsutsumi S, et al. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commu* 2004; 323(3): 1032-9.
- [17] Neill AS, Nagle CM, Protani MM, Obermair A, Spurdle AB, Webb PM, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, paracetamol and risk of endometrial cancer: A case-control study, systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2013; 132(5): 1146-55.
- [18] Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ, et al. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther* 2012; 11(4): 293-303.

مطالعاتی این تحقیق، تنها در حیطه بررسی اثرات غلظت - سیتوکسیک تولمتین بر بیان ژن‌های Bax و BCl2 در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در محیط کشت سلولی می‌باشد. محققان این پژوهش امیدوارند در آینده امکان بررسی اثرات تولمتین بر بیان پروتئین‌ها و ژن‌های آپوپتوزی دیگر و کاسپازها امکان‌پذیر گردد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که غلظت‌های مختلف تولمتین دارای اثر سیتوکسیک بر سلول‌های سرطانی

- [19] Grabosch SM, Shariff OM, Wulff JL, Helm CW. Non-steroidal anti-inflammatory agents to induce regression and prevent the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 10(4): 2015-220.
- [20] Fong W, To KK. Drug repurposing to overcome resistance to various therapies for colorectal cancer. *Cell Mol Life Sci* 2019; 20(6): 1-24.
- [21] Wong RS. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Adv Pharmacol Sci* 2019; 32(6): 1-9.
- [22] Qi L, Ye J, Xue W, Tian X, Zhang H. The mechanism of aspirin combined with metformin induced apoptosis of thyroid cancer TPC-1 cells. *Chi jou onc* 2019; 41(4): 276-81.
- [23] Bigdeli R, Shahnazari M, Panahnejad E, Cohan RA, Dashbolaghi A, Asgary V. Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using *Escherichia coli* cell-free supernatant on human breast cancer MCF 7 cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47(1): 1603-9.
- [24] Rong Z, Xu Y, Zhang C, Xiang D, Li X, Liu D. Evaluation of intestinal absorption of amtolmetin guacyl in rats: breast cancer resistant protein as a primary barrier of oral bioavailability. *Life Sci* 2013; 92(3): 245-51.
- [25] Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 92(4): 1406-14.
- [26] He Q, Luo X, Huang Y, Sheikh MS. Apo2L/TRAIL differentially modulates the apoptotic effects of sulindac and a COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory agent in Bax-deficient cells. *Oncogene* 2002; 21(39): 6032-26.