

بررسی اثر غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر سطح فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در رده سلولی سرطانی دهانه رحم (Hela)

الناز قدیری (MSc)^۱، رحیم احمدی (PhD)^۲، الهام رستمی (MSc)^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۳- دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، ایران

دریافت: ۹۷/۱۰/۲۲، اصلاح: ۹۸/۲/۳۱، پذیرش: ۹۸/۴/۳

خلاصه

سابقه و هدف: مطالعات نشان داده‌اند که ایبوپروفن در تخریب و مرگ سلول‌ها و بافت‌ها نقش داشته و می‌تواند اثر ضد سرطانی بر سلول‌های دهانه رحم داشته باشد، البته مکانیسم این اثر از نظر سلولی و ملکولی به خوبی شناخته نشده است. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (رده هلا) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی سلول‌های هلا از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه و به گروه‌های شاهد و دریافت کننده ایبوپروفن با دوزهای ۰/۱، ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم در لیتر تقسیم‌بندی شدند. زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT و سطح فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ به روش رنگ‌سنجی بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت. **یافته‌ها:** زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم در مواجهه با دوزهای ۰/۱ (۷۶٪)، ۱ (۶۴٪) و ۱۰ (۱۵٪) میلی گرم در لیتر نسبت به گروه کنترل (۱۰۰٪) دچار کاهش معنی‌دار گردید (به ترتیب $p < 0.05$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.001$). فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در مواجهه با دوز IC50 ایبوپروفن نسبت به گروه شاهد دچار افزایش معنی‌داری شد (به ترتیب $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که داروی ایبوپروفن قادر است در یک مسیر وابسته به دوز باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم شده و این مسیر از طریق فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۸ القا می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ایبوپروفن، کاسپاز ۳، کاسپاز ۸، کاسپاز ۹، سرطان دهانه رحم.

مقدمه

سبب آسیب بافتی شود (۶). مطابق با پژوهش‌های انجام شده ایبوپروفن در آپوپتوز برخی سلول‌ها تأثیرگذار است (۷). در واقع ایبوپروفن از طریق مسیر وابسته به کاسپاز می‌تواند سبب القای آپوپتوز شود (۸). در مقابل برخی تحقیقات نشان می‌دهد که ایبوپروفن دارای ارتباط قابل ملاحظه‌ای با سرطان نبوده (۹) و یا در مواردی می‌تواند باعث ایجاد یا تشدید سرطان گردد. در این راستا نتایج تحقیقات بیانگر آنند که مصرف ایبوپروفن می‌تواند سبب افزایش ریسک مرگ در مبتلایان به سرطان رحم شود (۱۰). همچنین مهارکاتالیز کاسپازها توسط NSAIDها سبب پیشگیری از مرگ سلولی می‌شود (۱۱) که می‌تواند تشدید کننده سرطان باشد. در یک پژوهش که اثر مصرف منظم آسپرین بر کاهش ریسک سرطان ناشی از کاهش التهاب مزمن بررسی شد، هیچ ارتباط معنی‌داری در مصرف آسپرین و سطح مارکرهای التهابی مشاهده نشد (۱۲). باتوجه به شیوع قابل توجه سرطان دهانه رحم در جهان (۱۳) و ایران (۱۴) و نیز با توجه به عوارض جسمی، روانی، اجتماعی و اقتصادی حاصل از ابتلا به سرطان دهانه رحم (۱۵) و همچنین با توجه به نتایج ضد و نقیض در حوزه

سرطان دهانه رحم یک سرطان ناشی از گردن رحم است. در اوایل بیماری، به طور معمول هیچ نشانه‌ای دیده نمی‌شود. علائم بعدی ممکن است شامل خونریزی غیرطبیعی واژن، درد لگن یا درد در طی رابطه جنسی باشد (۱). سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان است. دومین میزان شیوع پس از سرطان سینه را دارد. تخمین زده می‌شود که در سراسر جهان حدود ۱/۴ میلیون زن به سرطان دهانه‌ی رحم مبتلا باشند (۲). گزارش‌ها حاکی از آنند که ایبوپروفن بر روی سرطان اثرگذار است. ایبوپروفن می‌تواند به عنوان یک عامل پیشگیرانه در سرطان پانکراس و یا یک عامل کاهش‌دهنده ریسک سرطان کلورکتال ایفای نقش کند (۳). ایبوپروفن سبب بهبود سرطان سیستم تولید مثل می‌شود و می‌تواند رشد آدنوکارسینومای تخمدان را در ۳۳٪ افراد مهار کند (۴) و بر روی سلول‌های سرطان دهانه رحم نیز اثرگذار است (۵). گزارش‌های علمی نشان داده‌اند که ایبوپروفن در تخریب و مرگ سلول‌ها و بافت‌ها نقش دارد. در یک بررسی که روی موش‌های مبتلا به عفونت استرپتوکوکی انجام گردید، نشان داده شد که ایبوپروفن می‌تواند

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد الناز قدیری دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی - گرایش ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار می باشد.

مسئول مقاله: دکتر رحیم احمدی

آدرس: همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۸۱-۳۴۴۸۱۰۰۰

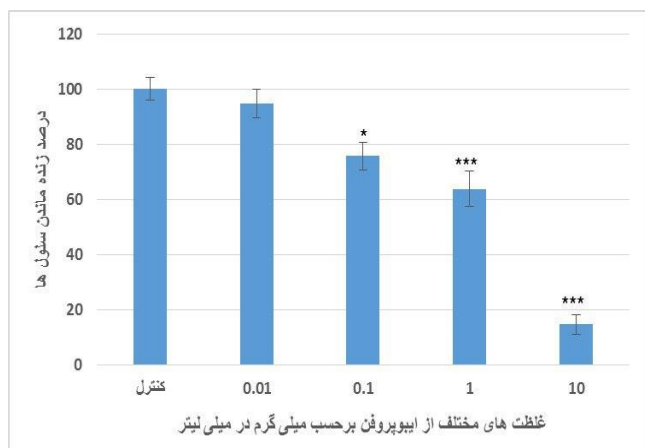
E-mail: drrahamadi@yahoo.com

در ۵۰ میکرولیتر بافر لیزسولی رقیق شد. تعداد نمونه‌ها برای اندازه گیری تعیین شدند و به اندازه کافی بافر واکنشی اضافه گردید. برای هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از بافر واکنشی اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر سوبسترای ۴ میلی مولار اضافه شد و به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

نمونه‌ها در حین انکوباسیون در تاریکی نگه داشته شدند. در نهایت نمونه‌ها در یک خواننده میکروپلیت در طول موج ۴۰۰ نانومتر یا ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند و میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با مقایسه مستقیم با میزان کنترل تعیین شد. جهت بررسی‌های آماری، ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف توزیع نرمال داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و پس از حصول از نرمال بودن توزیع داده‌ها، اطلاعات مربوط به اثر سیتوتوکسیک تستوسترون با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و داده‌های مربوط به فعالیت کاسپازها با استفاده از آزمون Student's t-test در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

درصد زنده‌مانی سلول‌های دهانه رحم در گروه دریافت کننده ایبوپروفن با غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در هر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معنی دار نشد. درصد زنده‌مانی سلول‌های دهانه رحم در گروه دریافت کننده ایبوپروفن با غلظت ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم در هر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معنی دار شد (به ترتیب $p < 0.05$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.001$). همچنین با افزایش غلظت داروی ایبوپروفن میزان زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد و به نظر می‌آید این کاهش وابسته به دوز می‌باشد. بیشترین میزان کاهش زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم که در مواجهه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر قرار گرفته‌اند رخ داده است (نمودار ۱). فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در مواجهه با دوز IC50 ایبوپروفن نسبت به گروه شاهد دچار افزایش معنی‌داری شد (به ترتیب $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.001$) (نمودار ۲).



نمودار ۱. مقایسه اثر سمیت غلظت های مختلفی از ایبوپروفن بر حسب میلی گرم/میلی لیتر بر رده سلولی هلا در مقایسه با گروه کنترل. * و *** نشان دهنده اختلاف معنی داری با گروه کنترل به ترتیب با $p < 0.05$ و $p < 0.001$ است

پژوهش (۱۶ و ۹ و ۵ و ۴) و محدودیت مطالعات قبلی در رابطه با اثر ایبوپروفن بر عملکرد کاسپازها در سلول‌های سرطانی دهانه رحم؛ لذا این مطالعه به منظور بررسی اثرات غلظت سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم (Hela) انجام شد.

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی ایبوپروفن از شرکت دارویی ابوریحان و سلول‌های سرطانی دهانه رحم (رده هلا) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه و سلول‌ها در شرایط استاندارد نگهداری شدند.

ایبوپروفن در محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰۰٪ با غلظت‌های مختلف به طور کامل حل شده و بعد از عبور از فیلتر سرسرنگی در ویال تیره و دمای ۲۰- ذخیره شد. سلول‌ها در محیط کشت کراتینوسایت فاقد سرم و حاوی پنی سلین (۵۰ واحد/میلی لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ گرم / میلی لیتر) نگهداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت کامل تحت اتمسفر ۹۵٪ هوا و دی‌اکسید کربن ۵٪ در دمای ۳۷ درجه رشد یافتند. سلول‌های هلا به دو گروه شاهد و دریافت کننده ایبوپروفن تقسیم شدند که گروه شاهد تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفت. جهت بررسی اثر سیتوتوکسیک ایبوپروفن بر سلول‌های هلا از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد.

در این راستا سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهک حاوی محیط کشت مناسب با تراکم 3×10^4 سلول/سانتی‌متر مکعب کاشته شدند و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت تازه حاوی ایبوپروفن با غلظت‌های مختلف اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در هر چاهک غلظت‌های مختلف دارو با سه بار تکرار به کار برده شد. در پایان زمان مواجهه با دارو محیط کشت از چاهک‌های حاوی سلول حذف و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به هر چاهک اضافه شد و سپس اجازه داده شد سلول‌ها برای ۲۴ ساعت دیگر رشد کنند. در پایان زمان رشد در هر ول، ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر MTT اضافه شد. پلیت‌ها سپس در فویل آلومینیوم پیچیده شدند و در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه برای ۴ الی ۸ ساعت انکوبه شدند. محیط حاوی MTT از چاهک‌ها حذف شد و کریستال فورمازان باقی مانده از MTT با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلاسیسین به هر چاهک حل شد. بلافاصله جذب در طول موج ۵۷۰ خوانده شد.

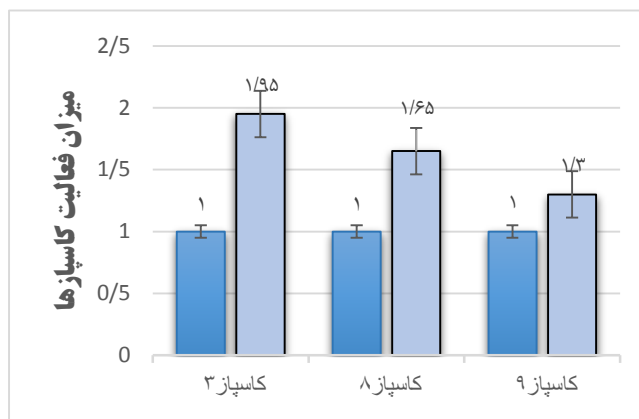
چاهک‌های حاوی محیط و MTT و فاقد سلول به عنوان جای خالی (Blank) در نظر گرفته شدند. همه آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با استفاده از کیت آزمایشگاهی رنگ سنج ApoTarget (Abnova، تایوان) با توجه به دستورالعمل‌های تولید کننده تعیین شد. به طور خلاصه، آپوپتوز در سلول‌های سرطانی هلا با استفاده از ایبوپروفن القاء شد و به طور همزمان گروه کنترل کشت داده شدند. سلول‌ها شمارش شدند و در پلیت با تراکم 5×10^3 سلول در هر نمونه قرار گرفتند و متعاقباً در ۵۰ میکرولیتر از بافر لیز سلولی سرد مجدداً ترکیب شده و بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و برای یک دقیقه در یک میکروسانتریفیوژ مورد سانتریفیوژ قرار گرفتند. سوپرناتانت (عصاره سیتوزول) به یک لوله تازه اضافه و روی یخ قرار داده شد. هر عصاره سیتوزولی به غلظت ۲۰۰-۵۰ میکروگرم پروتئین

القای مرگ سلولی می‌شود که این یافته موافق با یافته‌های قبلی بررسی اثر ایبوپروفن روی سلول‌های سرطانی کیسه صفرا، پروستات، سینه، کلیه و تخمدان می‌باشد. و در این بررسی نشان داده‌شد که ایبوپروفن از طریق فعال‌سازی کاسپاز سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۷). در مقابل برخی یافته‌های تحقیقی نشان می‌دهند که ایبوپروفن می‌تواند سبب القای سرطان یا تکثیر سلول‌های سرطانی گردد. ایبوپروفن با اتصال به آنزیم COX آن را مهار کرده و منجر به کاهش ساخت پروستاگلندین‌ها می‌شود که نتیجه آن آنژیوژنز و رشد تومور در تومورهای اندومتر می‌باشد. در این راستا بررسی‌ها نشان داده‌اند مصرف ایبوپروفن می‌تواند عامل افزایش ریسک مرگ در مبتلایان به سرطان رحم باشد (۱۰). علاوه بر این نشان داده شده که مهار کاتالیز کاسپازها توسط NSAID ها سبب پیشگیری از مرگ سلولی می‌شود. همچنین نشان داده شد هنگامی که سلول‌های هلا مورد تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از NSAID قرار گیرد کاهش فعالیت کاسپازها رخ می‌دهد (۱۱) که می‌تواند تشدید کننده سرطان باشد.

از نظر مکانیسم احتمالی اثر داروی ایبوپروفن بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم می‌توان گفت باتوجه به وجود گیرنده‌های ایبوپروفن در غشای سلول‌های سرطانی (۱۷) به نظر می‌آید در این تجربه ایبوپروفن با اتصال به غشای سلول‌های سرطانی دهانه رحم سبب افزایش فعالیت کاسپازها شده و این امر سبب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم گردیده‌است (۲۰). مطالعه حاضر در محدوده بررسی اثرات ایبوپروفن بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ انجام گرفته و پیشنهاد می‌گردد مطالعات سلولی و ملکولی بیشتر در حیطه بررسی اثرات ایبوپروفن بر ژن‌های آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی و نیز بررسی‌های رنگ آمیزی فلورسنت و میکروسکوپ الکترونی به منظور مطالعه دقیقتر اثر ایبوپروفن بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم مدنظر قرار گیرد. نتایج مطالعه نشان داد که داروی ایبوپروفن قادر است در یک مسیر وابسته به دوز باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم شده و این مسیر از طریق فعال شدن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ اجرا می‌گردد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند به عنوان مبنایی در تحقیقات کاربردی دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار جهت همکاری در این تحقیق و آقای دکتر عسگری که در اجرای این پژوهش همکاری کردند، تقدیر و تشکر می‌گردد.



نمودار ۲. نشانگر درصد فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های دهانه رحم نشان دهنده اثر دوز IC50 ایبوپروفن بر درصد فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در مقایسه با گروه شاهد (عدم مواجهه با دارو) است. با توجه به آنالیز آماری، دوز IC50 ایبوپروفن سبب افزایش معنی دار در گروه دریافت کننده دارو نسبت به گروه شاهد گردیده است (به ترتیب $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.05$)

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد داروی ایبوپروفن می‌تواند اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم داشته باشد و این اثر از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ و القای آپوپتوز اعمال می‌شود. موافق با این یافته مطالعات دیگر نشان می‌دهد ایبوپروفن می‌تواند سبب القای آپوپتوز از طریق مسیر کاسپازی در سلول‌های سرطانی شود. نقش پیشگیرانه NSAID ها در انواع مختلفی از تومورهای بدخیم نشان داده شده است به عنوان نمونه نشان داده شده که ایبوپروفن با غلظت ۲ میلی مولار با القای آپوپتوز می‌تواند نقش پیشگیرانه در سرطان کولون داشته باشد.

در واقع ایبوپروفن با افزایش بیان death receptor 5 (DR5) از طریق مسیر وابسته به کاسپاز سبب القای آپوپتوز می‌گردد. (۱۷). نتایج تحقیقات نشانگر آنند که مصرف NSAID ها ممکن است ریسک سرطان دستگاه تولید مثلی را کاهش دهد (۱۸). مطابق با پژوهش‌های انجام گرفته NSAID ها القاکننده آپوپتوز می‌باشند؛ در واقع چندین نوع مختلف NSAID دارای قدرت القای آپوپتوز می‌باشند اما ایبوپروفن جزء NSAID هایی است که دارای قدرت بالایی در القای آپوپتوز طی مراحل مختلف چرخه سلولی است (۱۹). در یک مطالعه که روی سلول‌های سرطانی معده انجام گرفت نشان داده شد که ایبوپروفن به صورت وابسته به دوز (با دوزهای ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ میکرو مولار) و زمان سبب

The Effects of Ibuprofen Cytotoxic Dose on caspase-3, -8 and -9 Activity level in cervical cancer (Hela) cells

E. Ghadiri (MSc)¹, R. Ahmadi (PhD)^{*2}, E. Rostami (MSc)³

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

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

3.School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 372-77

Received: Jan 12th 2019, Revised: May 21st 2019, Accepted: June 24th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Recent studies have shown that ibuprofen has been implicated in the destruction and death of cells and tissues and can have an anti-cancer effect on cervical cells, although the mechanism of this effect is not well known in cellular and molecular terms. Accordingly, the aim of this study was to investigate the effect of cytotoxic concentration of ibuprofen on the activity of caspases -3-, 8 and -9 in cervical cancer (Hela) cells.

METHODS: In this experimental-laboratory study, Hela cells were prepared from Pasteur Institute Cell Bank and were divided into the control group and groups exposed to 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml of Ibuprofen. Viability of cells was measured by MTT assay. The activity level of caspases-3, -8 and -9 was assessed by colorimetric method.

FINDINGS: The viability decreased significantly in cervical cancer cells exposed to 0.1(76%), 1(64%) and 10(15%) mg/ml of ibuprofen compared to control group (100% $p<0.05$, $p<0.001$ and $p<0.001$ respectively). The caspases-3, -8 and -9 activity level increased significantly in cervical cancer cells exposed to IC50 dose of ibuprofen compared with control group ($p<0.001$, $p<0.001$ and $p<0.01$ respectively).

CONCLUSION: The results of present study showed that ibuprofen is able to reduce the viability of cervical cancer cells in a dose-dependent pathway, and this pathway is induced by activating of caspases-3, -8 and -9.

KEY WORDS: *Ibuprofen, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Cervical Cancer.*

Please cite this article as follows:

Ghadiri E, Ahmadi R, Rostami E. The Effects of Ibuprofen Cytotoxic Dose on caspase-3, -8 and -9 Activity level in cervical cancer (Hela) cells. J Babol Univ Med Sci. 2019; 21: 372-77.

*Corresponding Author: R. Ahmadi (PhD)

Address: Department of Physiology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, I.R.Iran

Tel: +98 81 34481000

E-mail: drrahmadi@yahoo.com

References

1. Pathak K, Akhtar N. Nanocarriers for the Effective Treatment of Cervical Cancer: Research Advancements and Patent Analysis. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2018;12(2):93-109.
2. Saei Ghare Naz M, Kariman N, Ebadi A, Ozgoli G, Ghasemi V, Rashidi Fakari F. Educational interventions for cervical cancer screening behavior of women: A systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(4):875-84.
3. Ait Ouakrim D, Dashti SG, Chau R, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Aspirin, ibuprofen, and the risk for colorectal cancer in Lynch Syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(9). pii: djv170.
4. Altinoz MA, Korkmaz R. NF- κ B, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen and NSAID prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma*. 2004;51(4):239-47.
5. Lagunas L, Bradbury CM, Laszlo A, Hunt CR, Gius D. Indomethacin and ibuprofen induce Hsc70 nuclear localization and activation of the heat shock response in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(4):863-70.
6. Weng TC, Chen CC, Toh HS, Tang HJ. Ibuprofen worsens *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in mice. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011; 44(6):418-23.
7. Akrami H, Aminzadeh S, Fallahi H. Inhibitory effect of ibuprofen on tumor survival and angiogenesis in gastric cancer cell. *Tumor Biol*. 2015; 36(5):3237-43.
8. Afzal M, Kazmi I, Khan R, Rana P, Kumar V, Al-Abbasi FA, et al. Thiamine potentiates chemoprotective effects of ibuprofen in DEN induced hepatic cancer via alteration of oxidative stress and inflammatory mechanism. *Arch Biochem Biophys*. 2017;623-624:58-63.
9. Brasky TM, Liu J, White E, Peters U, Potter JD, Walter RB, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer risk in women: Results from the Women's Health Initiative. *Int J Cancer*. 2014;135(8):1869-83.
10. Brasky TM, Felix AS, Cohn DE, McMeekin DS, Mutch DG, Creasman WT, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endometrial carcinoma mortality and recurrence. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(3):1-10.
11. Smith CE, Soti S, Jones TA, Nakagawa A, Xue D, Yin H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are caspase inhibitors. *Cell Chem Biol*. 2017;24(3):281-92.
12. Lang Kuhs KA, Hildesheim A, Trabert B, Kemp TJ, Purdue MP, Wentzensen N, et al. Association between regular aspirin use and circulating markers of inflammation: a study within the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015; 24(5):825-32.
13. Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *J Gynecol Oncol*. 2016; 27(5):e51.
14. Ghahramani M, Alami A, Mohammadzade Moghaddam H, Moodi M. Screening for Cervical Cancer: An Educational Intervention Based on Transtheoretical Models and Health Belief in Women of Gonabad, Iran. *Iran J Obstet Gynecol Infertil*. 2018;21(5):22-32. [In Persian]
15. Pimple S, Mishra G, Shastri S. Global strategies for cervical cancer prevention. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016; 28(1):4-10.
16. Sakonlaya D, Tapanadechopone P, Poomkokruk A, Charoenvilaisiri S. Do NSAID's Inhibit growth of precancerous cervical cells in vitro. *J Med Assoc Thai*. 2012; 95(Suppl 1):S65-73.
17. Todo M, Horinaka M, Tomosugi M, Tanaka R, Ikawa H, Sowa Y, et al. Ibuprofen enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation. *Oncol Rep*. 2013; 30(5):2379-84.

18. Murphy MA, Trabert B, Yang HP, Park Y, Brinton LA, Hartge P, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and ovarian cancer risk: findings from the NIH-AARP Diet and Health Study and systematic review. *Cancer Causes Control*. 2012;23(11):1839-52.
19. Duncan K, Uwimpuhwe H, Czibere A, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, et al. NSAIDs induce apoptosis in nonproliferating ovarian cancer cells and inhibit tumor growth in vivo. *IUBMB Life*. 2012; 64(7):636-43.
20. Upadhyay A, Amanullah A, Chhangani D, Joshi V, Mishra R, Mishra A. Ibuprofen induces mitochondrial-mediated apoptosis through proteasomal dysfunction. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(10):6968-81.