



اثر کتوپروفن بر سرطان تخمدان القاء شده توسط DMBA (۱۲و۷ دی متیل بنزو آنتراسن) در موش صحرایی ماده

کیوان کرامتی^۱، فهیمه حبیبی^{۲*}، ابوالفضل باباخانی^۳، مهری مهرانپور^۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان تخمدان با اینکه شیوع چندان زیادی ندارد اما یکی از عوامل مهم مرگ و میر در زنان محسوب می‌گردد. با توجه به نقش آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) در کانسر و تولید پروستاگلندین نوع E₂ در ایجاد ضایعات توموری، به کارگیری مهار کننده‌های COX در ممانعت از ایجاد سرطان موثر بنظر می‌رسد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر کتوپروفن به عنوان مهار کننده غیر انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز در بروز سرطان تخمدان در موش‌های صحرایی ماده بود.

مواد و روش کار: در این پژوهش از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه اول گروه نرمال بود، گروه دوم فقط تزریق DMBA 7,12 Dimethyl benz(a) anthracene را داشتند، گروه سوم تحت تزریق DMBA + Saline واقع شدند و گروه‌های بعد مورد تزریق مقادیر مختلف کتوپروفن قرار گرفتند. به منظور القاء سرطان از DMBA استفاده شد، که مستقیماً به داخل تخمدان حیوان تزریق گردید. در این تحقیق وزن تخمدان و خصوصیات هیستوپاتولوژیکی تخمدان در تمام گروه‌های آزمایشی مورد سنجش و بررسی قرار گرفت. و در انتها اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS16 و آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شد.

یافته‌ها: در این پژوهش وزن تومور در گروه‌های دریافت کننده کتوپروفن به شدت کاهش یافت، به طوری که وزن تخمدان در گروه‌های مورد تزریق کتوپروفن به ترتیب 0.037 ± 0.004 و 0.033 ± 0.001 گرم در حالی که در گروه سوم میانگین 0.152 ± 0.008 بود. در برش‌های میکروسکوپی نیز، کاهش رشد تومور را در گروه‌های دریافت کننده کتوپروفن نشان داده شد.

نتیجه گیری: این تحقیق تأثیر مثبت این ترکیب را در درمان سرطان تخمدان تأیید می‌کند، اگرچه مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

واژه های کلیدی: سیکلواکسیژناز، سرطان تخمدان، کتوپروفن، رت

۱- استادیار فیزیولوژی، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد دامغان، دامغان، ایران

۳- استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

* نویسنده مسئول: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان

تلفن: ۰۵۱۱-۶۲۲۱۷۸۴ پست الکترونیک: Fahimeh77000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۶

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان می‌باشد که بر اثر عوامل مختلفی، مانند: مواد جهش‌زا و مواد شیمیایی سرطان‌زا در محیط به وجود می‌آید. مواد شیمیایی سرطان‌زا از طریق مکانیسم‌های ژنتیکی، اثرات سرطان‌زایی خود را اعمال می‌کنند و از نظر ژنتیکی، اکثریت آنها مستقیماً به محل خاصی در داخل مولکول DNA متصل گردیده و موجب موتاسیون^۱ در سلول‌های سوماتیک و سپس سبب بروز خطاهایی در فرایند رونوشت برداری، تکثیر و تزاید ژن‌ها می‌گردند [۲،۱]. بر طبق تحقیقات انجام شده ممکن است بیش از ۷۵٪ سرطان‌ها دارای منشاء محیطی باشند [۴،۳]. البته آسیب‌های ژنتیکی، تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA، بروز جهش در ژن‌ها، نقش به‌سزایی در سرطان‌زایی دارند [۴]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سیکلواکسیژنازها^۲ در سرطان‌های مختلف افزایش می‌یابند [۵]. ژن COX1 روی کروموزوم 9q قرار گرفته، و یک پروتئین ۶۶ کیلو دالتونی را کد می‌کند. این ژن روی بیشتر بافت‌های طبیعی بدن بیان می‌شود و پروستاگلندین^۳ را می‌سازد که برای هموستاز طبیعی و فیزیولوژیک لازم است. در مقابل ژن آنزیم COX2 روی کروموزوم 1q قرار گرفته است و یک پروتئین ۷۰ کیلو دالتونی را کد می‌کند [۶]. COX2 توسط سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و پروموتورهای تومور القاء می‌شود [۷]. افزایش بیان COX2 در انواع مختلفی از سرطان‌ها دیده شده است. افزایش بروز COX2 می‌تواند از طریق افزایش ژن آنتی آپتوتیک BCL₂ باعث مهار آپپتوز^۴ شود [۸]. از طرفی در بعضی مطالعه‌ها نشان داده شده است که سطح COX2 می‌تواند ارتباط مستقیم با آنژیوژنز^۵ (رگ‌زایی) داشته باشد [۹]. یکی از عوامل مهمی که بر رشد تومور تأثیر می‌گذارد پشتیبانی عروقی تومور است [۱۰]. مطالعات فراوانی مبنی بر اینکه تومورها هیچ‌گاه نمی‌توانند بدون پشتیبانی عروقی رشد کنند وجود دارد

[۱۰]. ادامه رشد نئوپلاسم^۶ اولیه و متاستاز^۷ بستگی به خون‌رسانی کافی به آن منطقه دارد، تومورهای بدخیم دارای عروق زیادی هستند و رشدشان سریع است و در نهایت گسترش سیستم عروقی احتمال تهاجم سلول‌های توموری را از طریق وارد شدن به جریان خون و انتشار به اندام‌های دیگر افزایش می‌دهد [۱۱ و ۱۲]. به طور کلی، سیکلواکسیژنازها در همه مراحل تومورزایی بدخیم، نظیر افزایش تکثیر سلولی، کاهش آپپتوزیس، رگ‌زایی و تحرک سلول‌های سرطانی نقش دارند [۱۳]. با توجه به اینکه کتوپروفن یک ترکیب ضد التهاب غیراستروئیدی است و به عنوان مهار کننده سیکلواکسیژناز عمل می‌کند [۱۴] و از آنجایی که آنزیم‌های سیکلواکسیژناز به عنوان یک عامل مهم در گسترش سرطان تخمدان^۸ هستند [۱۵] [۱۵] این پژوهش به منظور ارزیابی نقش کتوپروفن^۹ به عنوان مهار کننده آنزیم‌های سیکلواکسیژناز در بروز سرطان تخمدان بر روی موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار^{۱۰} انجام گرفت.

روش کار

این پژوهش از نوع تجربی است در این تحقیق از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار که از انستیتو پاستور کرج خریداری شده بودند با میانگین وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم استفاده گردید. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، دما ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد بدون آلودگی صوتی بوده و تغذیه حیوانات به وسیله خوراک مخصوص موش (پلت)^{۱۱} انجام گرفته است. موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند، پس از بیهوش نمودن حیوان با داروی بیهوشی کتامین^{۱۲} و زایلزین^{۱۳} که بر اساس وزن حیوان به صورت درون صفاقی^{۱۴} تزریق گردید حیوان مورد عمل جراحی واقع

6. Neoplasm
7. Metastasis
8. Ovary cancer
9. Ketoprofen
10. Wistar
11. Plet
12. Ketamin
13. Xylazin
14. Intra Peritoneal

1. Mutation
2. cyclooxygenase
3. Prostaglandin
4. Apoptosis
5. Angiogenesis

و آنالیز واریانس یک طرفه و به کارگیری تست توکی انجام گردید. برای این منظور اطلاعات خام هر گروه آزمایشی به صورت ستونی وارد و انحراف معیار استاندارد تعیین می‌شد تا اختلاف بین گروه‌ها به صورت مجزا تعیین گردد، تمام آنالیزها با توجه به سطح معنی‌دار $P < 0/05$ انجام شد.

یافته‌ها

نمودار ۱ مقایسه میانگین و انحراف معیار وزن تخمدان در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد که به عنوان شاخص کمی در نظر گرفته می‌شود نتایج به دست آمده در بررسی‌های ماکروسکوپی نشان‌دهنده این است که میانگین وزن تخمدان در گروه دریافت‌کننده ماده سرطان‌زا در دهمین روز پس از القاء $0/089 \pm 0/013$ بوده که در مقایسه با گروه نرمال با میانگین $0/058 \pm 0/002$ اختلاف معنی‌داری را حاصل کرده است، همچنین میانگین وزن تخمدان در گروه دریافت‌کننده ماده سرطان‌زا به همراه سالین در بیست و یکمین روز بعد از القاء $0/152 \pm 0/008$ بوده که نسبت به گروه دوم بزرگتر است و این اختلاف نیز معنی‌دار است ($P < 0/05$) که نشان دهنده روند رشد و پیشرفت سرطان در این گروه می‌باشد اما گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۱ و ۲ میلی‌گرم کتوپروفن به ترتیب میانگین $0/037 \pm 0/004$ و $0/033 \pm 0/001$ را نشان می‌دهند که میانگین این دو گروه نسبت به گروه دوم و سوم کوچکتر است و اختلاف معنی‌داری با هم دارند در حالیکه این دو گروه نسبت به گروه نرمال اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ($P > 0/05$). همچنین بررسی‌های میکروسکوپی به عنوان شاخص کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت که در این پژوهش یافته‌های کمی را تأیید می‌کند، چنانچه در شکل ۱ یا در گروه نرمال تخمدان همراه با فولیکول گراف نرمال مشاهده می‌شود و در شکل ۲ بافت تومورال Serosis adeno carcinoma در تخمدان مشاهده می‌شود و در شکل ۳ تومور مذکور تهاجم غیر طبیعی به بافت چربی دارد و تومور در حال تکثیر می‌باشد. این در حالی است که در شکل ۳ و ۴ تومور در حال پسروی است، تکثیر سلولی مهار شده و سلول‌های توموری در حال از بین رفتن می‌باشند.

شد، پس از تزریق ماده سرطان‌زا به تخمدان، منطقه برش خورده با استفاده از نخ بخیه با دقت بخیه گردید و سپس به طور کامل محل جراحی ضدعفونی می‌شد.

گروه اول حیوانات هیچ گونه تزریقی نداشتند و گروه نرمال محسوب می‌شدند.

گروه دوم حیوانات برای حصول اطمینان از روش تزریق فقط ماده سرطان‌زا (۱۲ و ۷ دی متیل بنزوانتراسن)^۱ را دریافت کردند که این ماده از شرکت سیگما آلمان تهیه شده بود و پس از مدت زمان ۱۰ روز حیوانات مذکور معدوم و تخمدان مورد تزریق از بدن آنها خارج و مورد توزین و بررسی‌های پاتولوژی قرار گرفت.

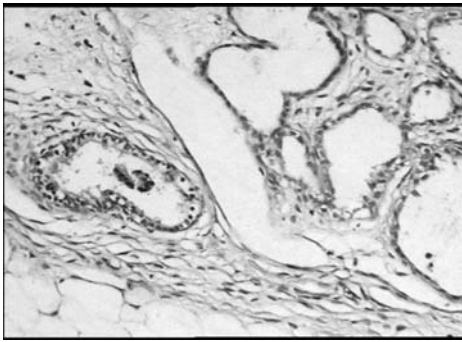
گروه سوم: در این گروه القاء تومور در محل تخمدان توسط ماده سرطان‌زا صورت گرفت اما این دسته از حیوانات از روز دهم به بعد به شکل دو روز در میان تا پایان روز بیستم تزریق عضلانی^۲ سالین^۳ را داشتند.

گروه چهارم یا گروه K₁: این گروه بعد از القاء تومور، از روز دهم به بعد به طور ۲ روز در میان تزریق عضلانی ۱ میلی گرم کتوپروفن تهیه شده از شرکت سیگما را داشتند.

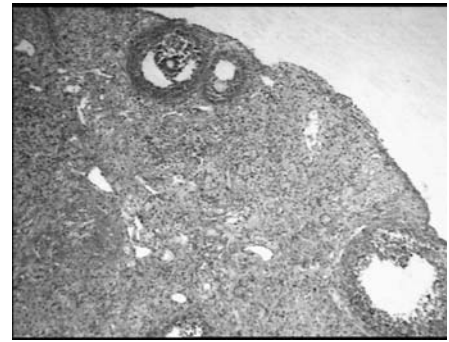
گروه پنجم یا گروه K₂: این گروه بعد از القاء تومور به طور ۲ روز در میان تزریق عضلانی ۲ میلی گرم کتوپروفن را داشتند.

لازم به ذکر است القای تومور در هر نمونه توسط ۴ میلی گرم به کیلو گرم وزن بدن DMBA که در ۰/۰۲ میلی لیتر روغن زیتون حل شده صورت گرفت. در طول این دوره ۲۰ روزه، وضعیت حیوانات هر روز بررسی می‌شد و در روز بیست و یکم تخمدان‌ها از بدن حیوان خارج شدند. توده استخراج شده از بدن حیوان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شده و پس از آن جهت پروسه فیکساسیون و در نهایت پاساژ بافتی به محلول فرمالدئید ۱۲٪ انتقال یافت. برش‌های میکروسکوپی تهیه و با هم مقایسه شدند، قابل ذکر است که کلیه مقاطع جهت تشخیص تحت نظر متخصص پاتولوژی بوده است. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS16

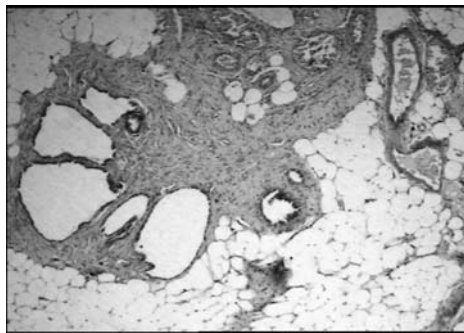
1. 7,12 Di methyl benz (a) anthracene
2. Muscular
3. Saline



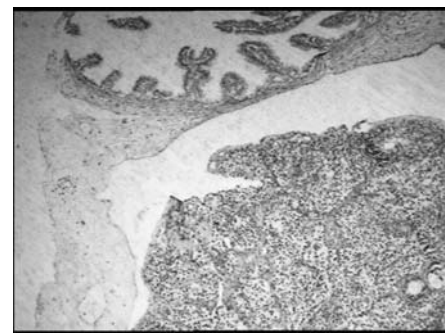
شکل ۲: نمای بافت تخمدان در گروه مورد تزریق DMBA در تخمدان Serosis adeno carcinoma بافت تومورال مشاهده می‌شود.



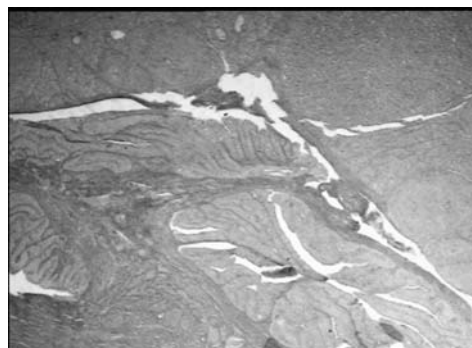
شکل ۱: نمای میکروسکوپی بافت تخمدان نرمال بافت تخمدان، فولیکول گراف و تخمک نرمال مشاهده می‌شود.



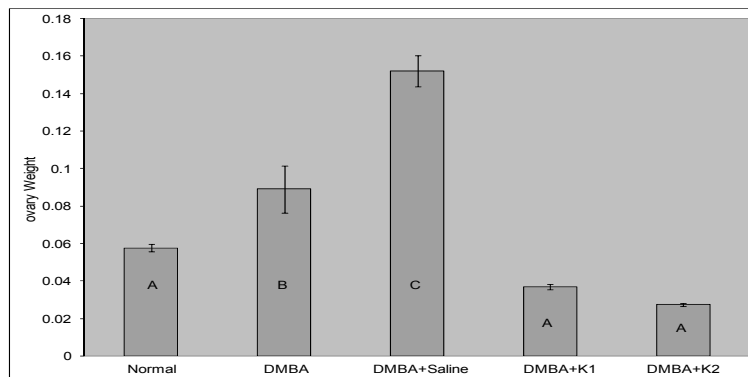
شکل ۴: نمای میکروسکوپی بافت تخمدان در گروه مورد تزریق ۱ میلی گرم کتوپروفن تومور در حال Regristion یا پسروی می‌باشد، تکثیر سلولی مهار شده و سلولهای توموری در حال از بین رفتن هستند.



شکل ۳: درشت نمایی میکروسکوپی بافت تخمدان در گروه DMBA+Saline تومور Serosis adeno carcinoma و تهاجم به بافت چربی دیده می‌شود و سلولهای توموری در حال تکثیر می‌باشند.



شکل ۵: نمای میکروسکوپی بافت تخمدان در گروه مورد تزریق ۲ میلی گرم کتوپروفن تخریب بافت تومورال تخمدان و از بین رفتن کامل تومور مشاهده می‌شود.



نمودار ۱: مقایسه میانگین وانحراف معیار وزن تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی حروف نا مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ است

بحث

نتایج به دست آمده از مقایسه وزن تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که وزن تخمدان در گروه‌هایی که تزریق کتوپروفن داشتند تقریباً با گروه نرمال یکسان بود در نتیجه تومور در این دو گروه در حال از بین رفتن و پسروی بوده‌اند و این نشان دهنده تأثیر درمانی کتوپروفن است در حالیکه وزن تخمدان در گروهی که تحت تزریق ماده سرطان‌زا بوده افزایش داشته و این افزایش در گروه دریافت کننده ماده سرطان‌زا و سالی‌تا روز بیست و یکم افزایش بیشتری داشته که این نشان می‌دهد که تومورها در حال رشد و تکثیر بوده‌اند، همچنین نتایج میکروسکوپی این پژوهش نشان دهنده این است که در گروه نرمال بافت تخمدان حالت طبیعی داشته اما در گروه دوم و سوم تومور دیده شده و تومورها به بافت چربی دست‌اندازی کرده‌اند در حالیکه گروه‌هایی که تزریق کتوپروفن داشته‌اند مسیر سلولی در آن‌ها مهار شده و تومور در حال پسروی و تحلیل رفتن است. از آنجایی که تومورهای تشکیل شده تا روز دهم، پس از تزریق کتوپروفن یک روند رشد کاهشی را نشان داده‌اند می‌توان احتمال داد کتوپروفن در مهار رشد تومورها نیز نقش به‌سزایی را ایفا می‌کند. از آنجایی که ترکیب مورد نظر یک ترکیب غیر استروئیدی با خاصیت مهارکنندگی غیر انتخابی سیکلواکسیژناز است با توجه به اینکه مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز، رگ‌زایی یا آنژیوژنیز را در

سلول‌های توموری کاهش می‌دهند [۱۶]. می‌توان احتمال داد ترکیب استفاده شده در پژوهش حاضر با مهار این آنزیم‌ها موجب کاهش آنژیوژن گردیده و با توجه به این بالای آنژیوژن در رشد تومور موجب کاهش رشد و سرطانی گردیده است. همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که سیکلواکسیژنازها با افزایش فاکتور رشد اپیتلیومی EGF^۱ موجب افزایش تکثیر سلولی شده و باعث رشد تومور می‌گردند [۱۶]. بنابراین شاید کتوپروفن با مهار سیکلواکسیژنازها از طریق کاهش EGF موجب کاهش تکثیر سلولی و کاهش حجم تومور گردد. مکانیسم دیگری که نقش سیکلواکسیژنازها را در رشد تومور توجیه می‌کند مربوط به نقش سیکلواکسیژنازها در ترشح آروماتاز است. سیکلواکسیژنازها از طریق تولید پروستاگلندین نوع E2 منجر به افزایش آنزیمی به نام آروماتاز می‌گردند، این آنزیم که از آنزیم‌های موجود در سیتوکروم P450 است به نام CYP19 معروف است و قادر است آندروژن‌ها را به استروژن تبدیل کند. از آنجایی که استروژن موجب افزایش رشد تومور می‌گردد [۱۷]. احتمالاً با مهار آروماتاز توسط مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز میزان استروژن کاهش یافته و رشد تومور کمتر خواهد شد.

^۱ Epithelium growth factor

ماحصل این تجربیات در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کتوپروفن با مهار سیکلواکسیژنازها در نتیجه‌ی مهار آنژیوژنز، کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوزیس موجب کاهش رشد تومور می‌گردد. از اهداف این تحقیق می‌توان به افزایش وسعت دانش بشری به منظور کسب اطلاعات بیشتر در ارتباط با پدیده سرطان و دستیابی به شیوه‌ها و داروهای جدید در درمان سرطان نام برد.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی نشان داد که کتوپروفن موجب کاهش وزن تومور و درمان سرطان تخمدان در موش‌های ماده‌ی صحرایی نژاد ویستار شده است. اما به طور قطع نمی‌توان مدعی شد چه مکانیسمی موجب این تغییرات بیولوژیک می‌شود چرا که عوامل متنوعی در نحوه تأثیرگذاری سیکلواکسیژنازها بر موجودات زنده دخیل می‌باشند. بنابراین پژوهش‌های گسترده دیگری برای مکانیسم عمل و چگونگی تأثیر این آنزیم‌ها بر موجودات زنده لازم است تا الگویی مشخص برای درمان بیماران سرطانی به دست آید.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانم که از کلیه اساتید که با رهنمودهای ارزشمند خود، ما را در هر چه بهتر شدن مطالب این مقاله یاری نموده‌اند و همچنین از همکاری صمیمانه پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی استان خراسان شمالی کمال تشکر و قدر دانی را داشته باشیم.

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است، آپوپتوز در ترمیم و نوسازی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش‌گر نقش دارد [۱۸]. هر گونه اختلال در روند آپوپتوز، منجر به بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات ایدز دیده می‌شود [۱۹]. داروهای شیمی درمانی سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند [۲۰، ۲۱]. مطالعات نشان داده‌اند که سیکلواکسیژنازها موجب غیر فعال شدن گیرنده‌های مرگ می‌شوند [۲۲] همچنین یکی از مکانیسم‌هایی که سیکلواکسیژنازها توسط آن موجب کاهش و مهار آپوپتوزیس می‌شوند افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوری BCL2 توسط سیکلواکسیژناز است [۲۳] از آنجایی که مهار کننده‌های سیکلواکسیژناز، آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطانی افزایش می‌دهند [۲۴ و ۲۵]. احتمالاً کتوپروفن با مهار سیکلواکسیژنازها موجب افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌گردد.

References

1. Kelsey JL, Gammon MD, Epidemiology of breast cancer, *Epidemiol rev* 1990; 12(7): 228-240.
2. Liu JZ, Milner JA, Age dietary selenium and quantity of 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene influence the in vivo occurrence of rat mammary DNA adducts, *J Nutr* 1992; 122(7): 381-386.
3. Moller P, Wallin H, Knudsen LE, Oxidative stress associated psychological stress and life-style factor, *Chem Bio Interact* 1996; 102: 1-36.
4. Namiki M. Antioxidant /antimutagenes in foods. *Crit Rev. food Sci Nutr* 1990; 29: 273-300.
5. Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol.* 1997; 10: 503-507.
6. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmous DL, Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by mRNA splicing, *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2692-96.
7. Kujubut DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3t3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue, *J Biol Chem* 1991; 266: 12866-72.

8. Hla T, Bailey DB, Liu CH, Schaefer HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and-2 isoenzymes. *IYBCB* 1999;31:551-57.
9. Smith WL, Garavito M, Dewitt DL, Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenase)-1 and -2. *Biolchem J* 1996; 52:33157-60.
10. Mattaj , WF, Englmire L, 1998, Nucleoplasmic Transport , *Rev, Biochem*, 67:265-306
11. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358(19): 2039-49.
12. Tortora G, Melisi D, Ciardiello F, Angiogenesis: A target for cancer therapy, *Curr Pharm Design* 2004; 10: 11-26.
13. Teri L Larkins, Marcheale Nowell, Shailesh Singh, Gary L. Sanford, Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer*, 2006; 6: 181.
14. Mazieres B, (2005) Topical ketoprofen path Druugs in RSD, 6(6): 337-44
15. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SI, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K, 2000, Anti angiogenic and anti tumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitor cancer Res, 60(5): 1306-6.
16. Barnes N. J, N. L. P. Bundred, COX-2 inhibitors in breast cancer, *Breast Cancer Online*. 2005; 8(10): 1-5.
17. Diaz-Cruz ES, Shapiro CL, Brueggemeier RW, Cyclooxygenase inhibitors suppress aromatase expression and activity in breast cancer cells, *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(5): 2563-70.
18. Israels LG, Israels ED. Apoptosis, *The oncologist* 1999; 4:332-9.
19. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 1995; 267:1456-62.
20. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Farzami B. Caspase dependent apoptosis induced by Cladribine in the estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDAMB468, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2003; 14:303-10.
21. Michael A, Anke M. Haugg, Cyclooxygenase-2 Inhibition Induces Apoptosis Signaling via Death Receptors and Mitochondria in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 2006; 66: 7059-7066.
22. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S, Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Iranian biomedical journal*, 2004; 8:7-12.
23. Shimizu D, Peters JH , Vallboehmer D, Kuramochi H, Uchida K, Cyclooxygenase-2 (COX-2) mediated anti-apoptosis may occur via Bcl-2 in the progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22(14): 529-536.
24. Min Hu, Guillermo Peluffo, Haiyan Chen, Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci, U S A* 2009 106(9): 3372-3377.
25. Gee J, Lee IL, Jendiroba D, Fischer SM, Grossman HB, Sabichi AL, Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer, *Oncol Rep* 2006; 15: 471-477.

