زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۲۵- ۱۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سایتوتوکسیک ناندرولون بر رده سلولی سرطان کولون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹

زهرا اعلایی[۱]، عبدالحسین شیروی[۱*]، رحیم احمدی[۲]، ویدا حجتی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

* مسئول مکاتبات: shiravi738@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۵

چکیده

سرطان کولون از مهمترین سرطان‌ها در سراسر دنیا محسوب می‌شود و سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که هورمون‌های استروئیدی جنسی بر عملکرد دستگاه گوارش و بر تکثیر سلول‌های سرطانی در سطح سلولی و مولکولی تاثیرگذارند. این مطالعه به بررسی اثرات ضد تکثیری ناندرولون بر رده سلولی سرطان کلون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ می‌پردازد. در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های HCT به گروه شاهد (بدون تیمار) و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون تقسیم‌بندی شدند. اثر سیتوتوکسیک هورمون با استفاده از سنجش MTT اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ توسط کیت (Novex) مورد ارزیابی قرار گرفت. زنده‌مانی سلول های HCT در گروه دریافت کننده‌ی غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون نسبت به گروه شاهد دچار کاهش معناداری شد ($p <$ ۰/۰۰۱) در حالی که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ ($p <$ ۰/۰۰۱) و ۸ ($p <$ ۰/۰۱) در رده سلولی HCT تیمار شده با ناندرولون، افزایش معناداری پیدا کرد. یافته‌های این تحقیق نشان دادند که ناندرولون دارای اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی کولون می‌باشد و بخشی از این اثر حداقل از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ حاصل می‌شود.

کلمات کلیدی: ناندرولون، HCT، زنده‌مانی، کاسپاز ۳، کاسپاز ۸، کاسپاز ۹.

مقدمه

سرطان کولون از مهمترین سرطان‌ها در سراسر دنیا محسوب می‌شود (۱۳) و سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد (۵۰، ۵۶). ژنتیک و عوامل محیطی به همراه تغییرات فیزیولوژیک به ویژه تغییر در سطوح هورمونهای جنسی می‌توانند در بروز این سرطان موثر باشد (۴۶، ۵۷). از سویی، آپوپتوز در سرطان یک رویداد کلیدی در حفظ هموستازی کولون است. شاهد شدید آپوپتوز به خصوص برای حفظ هموستازی برای بافت‌های میتوتیک مانند کولون که سلول‌ها به طور مداوم تکثیر می‌شوند و دارای چرخه عمر کوتاه هستند، بسیار مهم است (۷). با افزایش سن و در

معرض قرار گرفتن مواد سرطان‌زا، آپوپتوز به طور چشمگیری سبب ایجاد تغییرات و اصلاح ساختار کولون می‌شود (۳۵). یکی از مسیرهای مهمی که باعث انهدام سلول‌های سرطانی می‌شود، مسیر آپوپتوز است (۲۲). آپوپتوز یک فرایند شدید شاهد شده است که توسط سیگنال‌های مختلفی فعال می‌شود و موجب انهدام سلول هدف می‌شود (۱۷).

در درون سلول‌ها، مسیرهای تنظیمی مثبت و منفی آپوپتوز وجود دارد و تعادل بین این دو مسیر است که تعیین کننده سرنوشت سلول است (۳۷).

آپوپتوز از دو مسیر خارجی (وابسته به گیرنده) و مسیر داخلی (وابسته به میتوکندری) می‌باشد که هر کدام از این مسیرها از کاسپازهای متفاوتی استفاده می‌کنند. کاسپازها جزء خانواده سیستئین آسپارتات پروتئازها و واسطه مهم برای روند آپوپتوز می‌باشند (۳۲). کاسپازهای ۸ و ۱۰ به عنوان کاسپازهای آغازگر مسیر خارجی (۲۰) و کاسپاز ۹ عضو مسیر داخلی می‌باشد و هر دو مسیر در نهایت از کاسپازهای ۳، ٦ و ۷ استفاده نموده و منجر به ایجاد آپوپتوز و انهدام سلول می‌شوند (۱۲، ۵۲).

کاسپازها به صورت آبشاری عمل کرده و مهمترین عضو از این گروه در بخش فرودست که سبب اجرای آپوپتوز می‌گردد، کاسپاز-۳ است (۳۸).

مسیر خارجی آپوپتوز که از طریق گیرنده‌های مرگ آغاز گردیده و منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ می‌شود می‌تواند بطور مستقیم کاسپازهای اجرایی را فعال کند یا این که از طریق پروتئین BID عمل کند (۳۱).

در مسیر داخلی، آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، باعث فعال شدن کاسپاز ۹ با دخالت APAF-1 می‌شود و در نهایت فعال شدن کاسپازهای اجرایی می‌شود (۲۵). بین این دو مسیر ارتباط تنگاتنگی وجود دارد (۳۹). مطالعات نشان داده اند که استروییدهای جنسی نر قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشند. ناندرولون فرم تزریقی استروئیدهای آنابولیزان می‌باشد (۴۳).

استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک، مشتقات مصنوعی مربوط به هورمون جنسی مردانه (تستوسترون) هستند که نقش مهمی در رشد بدن ایفا می‌کنند (۳۳). بررسی نقش هورمون‌های جنسی نر در تکوین، تکثیر و یا مهار رشد و نمو سلول‌های سرطانی از جایگاه تحقیقاتی برجسته و ممتازی برخوردار است. هورمون‌های استروییدی تاثیر مهمی در پیدایش و یا مهار سرطان داشته، می‌توانند در پیشگیری از متاستاز و یا تحریک متاستاز در سلول‌های سرطانی ایفای نقش نمایند (۸، ۱٤، ٤۷، ٥٤). هورمون‌های جنسی استروئیدی بر گیرنده‌های هسته‌ای عمل می‌نمایند (۱۸). بافت‌های کولون گیرنده‌های استروئیدی هسته‌ای عملکردی را بیان می‌کنند (٤۸). گرچه مطالعات در خصوص حضور گیرنده‌های استروییدهای جنسی نر سلول‌های سرطانی کولون در موارد قابل توجهی ضد و نقیض می باشد (٤٤، ٤۹).

بر این اساس، این تحقیق در پی بررسی اثرات ناندرولون بر تکثیر رده سلول‌های سرطان کولون (HCT) در محیط کشت سلولی و ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳، ۸ و ۹ است. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در شناخت ارتباط پاتولوژیک هورمون‌های جنسی و ابتلا به سرطان کولون در انسان مورد توجه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی داروی ناندرولون از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شد. ۱ میلی‌گرم از ناندرولون در ۱ میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکسید، ۱ میلی‌لیتر توین ۸۰ به اضافه ۷ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات (PBS) حل شد. مطابق مطالعات

تجربی قبلی پژوهشگران این تحقیق، رقت‌های مختلف از ناندرولون (۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در میکروتیوب‌های استریل تهیه و از فیلتر سر سرنگی عبور داده شد و در نهایت از این رقت‌ها برای تیمار رده سلولی سرطان کولون استفاده شد. سلول های سرطان کولون از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شدند و سلول‌ها در شرایط استاندارد نگهداری شدند. سپس این سلول‌ها در محیط کشت رشد کامل (RPMI 1640) دارای سرم گاوی جنینی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین تحت اتمسفر ۹۵٪ هوا و دی اکسیدکربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. سلول‌های سرطان کولون به دو گروه شاهد و دریافت کننده غلظت‌های مختلف ناندرولون تقسیم شدند. گروه شاهد هیچ گونه تیماری دریافت نکرد. جهت بررسی اثر سیتوتوکسیک ناندرولون بر سلول‌های سرطانی از روش رنگ سنجی سنجش MTT استفاده شد. در این راستا شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو انجام شده و حدود ۱×۱۰^{٤} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، رقت‌های مختلف از ناندرولون (۱/۲۵،۰/۶۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه و برای هر رقت هشت چاهک از داروی ناندرولون در نظر گرفته شد. بنابراین ۸ بار تکرار تست برای هر رقت انجام گرفت. از طرفی یک ردیف به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد که داروی ناندرولون به آن اضافه نشد. این گروه فقط شامل سلول ها و محیط و FBS می‌باشد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر با دمای درجه ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس هورمون و محیط کشت از چاهک‌ها خارج گردید. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت (۰/۰۵ mg/ml) در تاریکی به پلیت‌ها اضافه شد. پلیت‌ها در فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. محیط رویی حاوی MTT از چاهک‌ها حذف شد و به کریستال فورمازان باقی مانده از MTT هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ماده DMSO اضافه و بعد از پوشاندن چاهک‌ها، (جلوگیری از رسیدن نور) به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. در نهایت جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (DNM-9602G) خوانده شد.

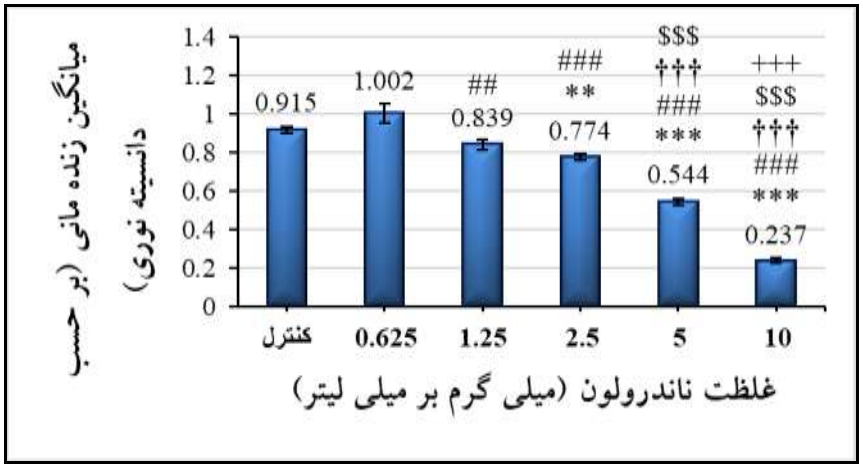
فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با استفاده از کیت آزمایشگاهی (Novex) با توجه به دستورالعمل‌های تولید کننده تعیین شد. سلول ها با غلظت IC50 سایتوتوکسیک ناندرولون تیمار شدند و به طور همزمان گروه شاهد کشت داده شدند. جهت بدست آوردن دوز IC50، دوز بالایی و پایینی از Viablilty ۵۰ را در نمودار اکسل انتخاب نموده و اندازه‌گیری می‌کنیم. سلول‌ها شمارش شدند و در پلیت ٦ خانه با تراکم $۱۰^{٦}\times$ ۵-۳ سلول در هر نمونه قرار گرفتند و متعاقبا" 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 ۵۰-۲۰۰ میکروگرم پروتئین در ۵۰ میکرولیتر بافر لیزسلولی 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 ٤ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۱-۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. نمونه ها 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 شاهد تعیین شد (۵). جهت بررسی‌های آماری، ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرونوف توزیع طبیعی داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و پس از حصول از طبیعی بودن توزیع داده‌ها، اطلاعات مربوط به اثر سیتوتوکسیک داروی ناندرولون با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی و داده‌های مربوط به فعالیت کاسپازها با استفاده از آزمون تی-تست (Student's t-test) در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین گروه‌ها در سطح $\alpha<$۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

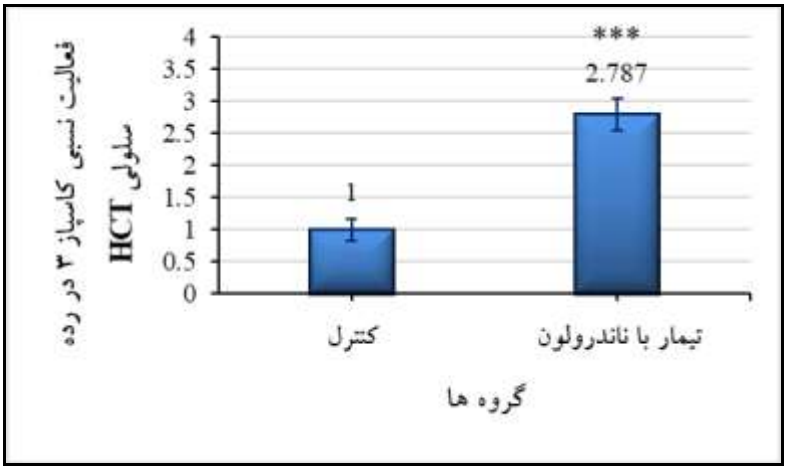
نتایج

نمودار ۱ بیانگر اثرات غلظت‌های مختلف ناندرولون بر زنده‌مانی رده سلولی HCT در مقایسه با گروه شاهد می‌باشند. با توجه به نتایج مندرج در نمودار ۱، در بررسی زنده‌مانی رده سلولی HCT در گروه‌های دریافت کننده‌ی ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون، اختلاف معناداری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد ($p >$۰/۰۵). در حالیکه در گروه دریافت کننده‌ی ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون، کاهش معناداری در زنده‌مانی رده سلولی HCT نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. همچنین در بررسی زنده‌مانی رده سلولی HCT در گروه دریافت کننده‌ی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون، کاهش معناداری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در همین راستا در گروه دریافت-کننده‌ی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون، کاهش معناداری در زنده‌مانی رده سلولی HCT نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نمودارهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نشان‌دهنده درصد فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطان کولون تحت تاثیر ۵/۹۹ میلی-گرم بر میلی‌لیتر (IC50) ناندرولون می‌باشند. در بررسی فعالیت نسبی کاسپاز ۳، ۸ و ۹ در رده سلولی HCT در گروه تیمار شده با ناندرولون، افزایش معنا داری در همه گروه‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($p <$۰/۰۱ و $p <$۰/۰۰۱).

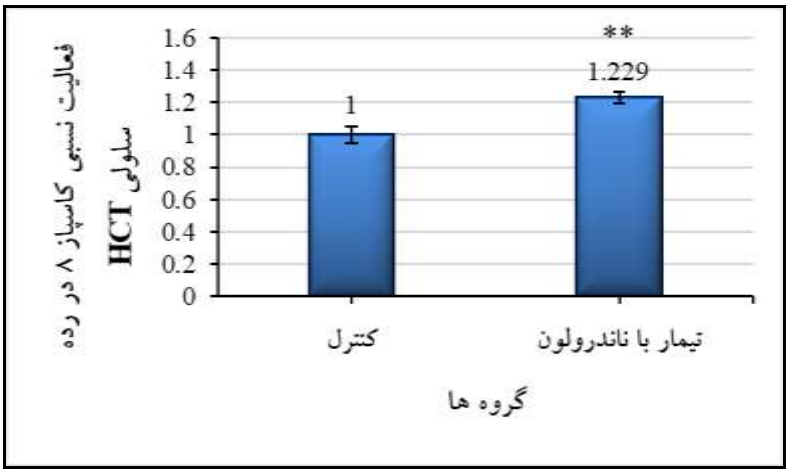


نمودار ۱- مقایسه‌ی اثرات غلظت‌های مختلف ناندرولون بر میزان زنده‌مانی رده سلولی HCT. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیارنشان داده شده‌اند * بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد ($p <$۰/۰۰۱: ** و $p <$۰/۰۱: ***)، # بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده‌ی ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون ($p <$۰/۰۱: ## و $p <$۰/۰۰۱: ###)، † بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده‌ی ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون ($p <$۰/۰۰۱: †††)، $ بیانگر معناداری نسبت به گروه

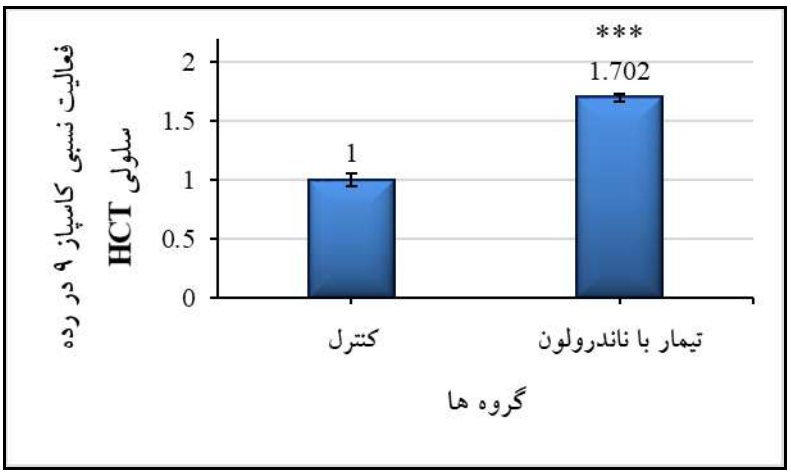
دریافت کننده‌ی ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون (p <۰/۰۰۱ :$$$) و + بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون است (p <۰/۰۰۱ :+++).



نمودار۲ – بررسی اثر ناندرولون بر میزان فعالیت کاسپاز ۳ در رده سلولی HCT. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند * بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد است. علائم ** و *** بیانگر معنادارای نسبت به گروه شاهد به **ترتیب با** p < ۰/۰۱ و p <۰/۰۰۱ می‌باشد.



نمودار۳ – بررسی اثر ناندرولون بر میزان فعالیت کاسپاز ۸ در رده سلولی HCT.



نمودار ٤- بررسی اثر ناندرولون بر میزان فعالیت کاسپاز ۹ در رده سلولی HCT

بحث

با توجه به اهمیت بررسی اثرات آپوپتوزی ناندرولون بر سلولهای سرطانی کولون این مطالعه با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری به پژوهش در مورد اثرات سیتوتوکسیک این دارو بر سلول‌های سرطانی کولون و فعالیت کاسپازهای مرتبط با مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز پرداخته نتایج نشان دادند که علیرغم بی اثر بودن غلظت‌های پایین‌تر (۰/٦۲۵ و ۱/۲۵ میلی-گرم/میلی‌لیتر) ناندرولون بر تکثیر سلول‌های سرطانی کولون غلظت‌های بالاتر ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/میلی-لیتر ناندرولون سبب القای آپاپتوز و مرگ سلولی در سلول های سرطانی کولون گردید و این یافته به لحاظ شناخت ارتباط پاتولوژیک هورمون‌های جنسی نر و سرطان کولون اهمیت بسزایی دارد. همسو با این مطالعه، تحقیقات نشان داده اند که نوروتستسترون-۱۹ آنالوگ ۱ (ناندرولون) دارای اثرات ضد تکثیری قوی بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم نیز می‌باشد (۲۹). همچنین در تحقیقاتی دیگر آندروستون به عنوان یک آندروژن برای توسعه عوامل ضدسرطان مبتنی بر استروئید در نظر گرفته شده است. شواهد زیادی در بدن از اهمیت برجسته این ترکیبات و خواص ضد توموری آن‌ها حکایت دارد. عمل ضد تکثیری قابل توجهی از آنالوگ‌های جدید آندروستون در برابر طیف گسترده‌ای از رده‌های سلولی سرطانی از جمله سرطان پروستات، پستان، دهانه‌ی رحم، تخمدان، سرطان خون، ملانوم، روده بزرگ و سرطان معده وجود دارد (۱، ۲، ۳، ۱۰، ۲۳، ۲٤). در مقابل با یافته-های تحقیق حاضر، نتایج برخی پژوهش‌ها حاکی از آنند که هورمون‌های جنسی نر نه تنها اثر ضد سرطانی ندارند بلکه در مواردی در ایجاد و گسترش سرطان نیز نقش دارند. در این راستا آندروژن‌ها برخی یافته-های تحقیقاتی نشان داده اند که آندروژن‌ها می‌توانند با تحریک رشد در پروستات هستند به عنوان یک عامل ایجاد کننده در سرطان پروستات موثر باشند. با این حال، این مفهوم با برخی از مشاهدات همبستگی ندارد. به عنوان مثال، با افزایش سن افراد، خطر سرطان پروستات به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد در حالی که سطح آندروژن سقوط می‌کند (۱۱، ٤۰). گلوکوکورتیکوئیدها نیز یک گروه از هورمون‌های استروئیدی هستند که، طیف گسترده‌ایی از فعالیت‌های ضد التهابی و سرکوب سیستم ایمنی، از جمله توانایی القاء آپوپتوز را در لنفوسیت‌های T و B اعمال می-کنند (۳۵، ۵۳).

با توجه به نتایج این پژوهش، ناندرولون در دوزهای کمتر، دارای اثرات محافظتی یا تکثیری بر مسیر آپوپتوزی سلول‌هاست، اما در دوزهای بیشتر دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشد. با توجه به مکانیسم‌های داخلی و خارجی مسیر آپوپتوزی احتمالا ناندرولون از طریق فعال سازی مسیر داخلی آپوپتوز فعالیت کاسپاز ۹ را متاثر ساخته است و همچنین بر مسیر خارجی و فعال سازی کاسپاز ۸ تاثیر گذار بوده است.

در مطالعه حاضر، اثرات غلظت سیتوتوکسیک ناندرولون بر میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ را در رده سرطانی کولون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که مواجهه سلول‌های HCT با غلظت ۵/۹۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ناندرولون باعث افزایش معنا دار در میزان فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ و ۹ در این سلول‌ها نسبت به گروه شاهد را بدنبال داشته است و این نتایج با نتایج مطالعات گذشته مبنی بر اثرات سایتوتوکسیک استروئیدها بر میزان فعالیت-

های کاسپاز ۳، ۸ و ۹ بر سلول‌های سرطانی، هم-خوانی دارد.

در طی مطالعات که توسط ویرجیل و همکاران در سال ۲۰۰٤ صورت گرفت نشان داده شد که MIF سبب تحریک فعال شدن کاسپاز ۳ و ۸ و ۹ به عنوان بخشی از یک برنامه مرگ سلولی فعال در سلول‌های سرطان سینه مقاوم به استروژن می‌باشد. در راستای این مطالعه اثر 4-OHT (غیر استروئیدی) سبب مهار فعالیت کاسپاز ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطان سینه مقاوم به استروژن می‌شود (۵۵).

در طی تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۸ توسط گیووا و همکاران اثر ۵ مدل α-19-nortestosterones (3-7) ۱۷ بر سلول‌های سرطان در زنان شامل سرطان تخمدان (A2780)، گردنی (Hela)، سلول‌های سرطان سینه رده‌ی سلولی (MCF7-T47D، MDA-MB-231، MDA-361) صورت گرفت، فعالیت کاسپاز ۳ در غلظت ۵ میکرومتر (در مدت ٢٤ ساعت در انکوباسیون) به صورت وابسته به غلظت افزایش داشته، در صورتی که هیچ تغییری در فعالیت کاسپاز ۸ وجود ندارد. اما کاسپاز ۹ به صورت معناداری افزایش داشته است (۱۹).

به طور رایج، فعال‌سازی مسیر خارجی اپوپتوز استفاده می‌شود که معمولا شامل فعال شدن گیرنده‌های مرگ است. در حالی که فعال‌سازی کاسپاز ۹ نشان‌دهنده دخالت مسیر میتوکندری از آپوپتوز است (۳۰).

از لحاظ مورفولوژیکی سلول‌های آپوپتوتیک با کوچک شدن سلول، تراکم کروماتین هسته تجمع و تخریب (DNA) مشخص می‌شود (۳۷). کاسپازاز خانواده پروتئاز سیستئین، عامل مشترک آپوپتوز ناشی از محرک‌های مختلف است (۹، ٣٤).

شواهد علمی بدست آمده در سال‌های اخیر به وجود گیرنده‌های آندروژن غشایی (mAR) اشاره می‌کند و باعث ایجاد سیگنال‌های سریع و غیر ژنومی می‌شود.

اگرچه هویت دقیق مولکولی mAR هنوز ناشناخته است، اما اقدامات آندروژن غیرژنومی در انواع مختلف سلول گزارش شده است. مانند: ماکروفاژها و سلول‌های T 1 (٦)، سلول‌های LNCaP (۲۸)، T47D (۲۷)، MCF7(۲٦) ، DU145 (۲۱، ٤١)، C6، (١٦)، PC12 (٤) و سلول‌های VSMC (۵۱). سیگنالینگ وابسته به mAR اخیراً در ردیف سلول‌های سرطانی سرطان پروستات و پستان با جزئیات توصیف شده است (۲۹، ٤٢).

به نظر می‌رسد که فعال‌سازی mAR باعث آپوپتوتیک رگرسیون عمیق سلول‌های سرطانی پروستات در شرایط in vitro و در داخل بدن (۲۱، ۲۷) و رشد سرکوب سلول و تحرک سلولی می‌شود (۲٦، ۲۷). سرانجام، جدیدترین مطالعات حاکی از کلیدی بودن تاثیرگذاری آن برای حمایت از بقای ژن-های آپوپتوز مانند AKT، NF-κB، Bad، Fas و caspase-3 در تنظیم پاسخ آپوپتوز ناشی از فعال‌سازی mAR در سلول‌های سرطانی پروستات است (٤١).

تشخیص داده شده کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ به عنوان آغازگرهای آپوپتوز بالادست باعث ایجاد فعالیت کاسپازهای پائین دست ۳، ٦ و ۷ می‌شوند (۳۸).

با این حال مطالعات اخیر، مدارک قابل توجهی از تقابل بین این دو مسیر مرگ را نشان می‌دهد، بخشی نیز با واسطه کاسپاز ۳ فعال می‌شود، که پس از فعال شدن کاسپاز ۳ می‌تواند، آپوپتوز را با فعال کردن کاسپاز ۸ و ۹ به عنوان بخشی از یک چرخه فیدبک مثبت تقویت کند (۱۵، ٤٩).

علی‌رغم اهمیت بسیار زیاد هورمون‌های جنسی نر در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون، پژوهش‌ها در مورد اثرات آپوپتوزی ناندرولون در سلول‌های سرطانی کولون بسیار محدود بوده و مکانیسم سلولی این امر، به ویژه در خصوص اثرات

آن بر فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی، در حد کفایت گزارش نشده است.

در مجموع و با توجه به نتایج بررسی‌های پیشین،دوز سیتوتوکسیک ناندرولون فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ را متأثر می سازد در مطالعه‌ی حاضر کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ افزایش معناداری داشتند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان دادند که غلظت‌های بالای هورمون ناندرولون می‌تواند اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی کولون اعمال نماید و سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون گردد که این اثر از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ میانجیگری می‌شود و احتمالاً سبب فعال‌سازی کاسپاز آغازگر مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترا مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می‌باشد.

منابع

1- Acharya P.C., Bansal R. 2013. Synthesis and Antiproliferative Activity of Some Androstene Oximes and Their O-Alkylated Derivatives. *Arch. Pharm*, 347: 193–199.

2- Ajduković J.J., Djurendić E.A., Petri E.T., Klisurić O.R, Ćelić A.S., Sakač M.N., Dimitar S.J., Katarina M.P.G. 2013. 17(E)-picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: antiproliferative activity and molecular docking studies. *Bioorg Med. Che*, 21: 7257-7266.

3- Ajduković J.J., PenovGaši K.M., Jakimov D.S., Klisuric, O.R., Jovanović-Šanta S.S., Sakac M.N., Aleksic L.D., Djurendic E.A. 2015. Synthesis, structural analysis and antitumor acti-vity of novel 17α-picolyl and 17(E)-picolinylidene A-modified androstane derivatives. *Bioorg. Med. Chem*, 23: 1557-1568.

4- Alexaki V.I., Charalampopoulos I., Kampa M., Nifli A.P., Hatzogou A., Gravanis A., Castanas E. 2006. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 98: 97-110.

5- Amani N., Shariati M., Ahmadi R., Khatamsaz S., Mokhtari M. 2019. The Cytotoxic Effects of Testosterone on Gastric Cancer Cell Line (AGS) and Evaluation of Caspase-3, -8, and -9 Activity. *Qom Univ Med Sci Journal*, 13(6): 9-17. [Persian].

6 - Benten W.P., Lieberherr M., Giese G., Wrehlke C., Stamm O., Sekeris C.E. 1999. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J*, 13:123–133.

7- Campisi J., Yaswen P. 2009. Aging and cancer cell biology, *Aging Cell*, 8(3) : 221-225.

8- Chen R., Cui J., Wang Q., Li P., Liu X., HU H., Wei W. 2015. Antiprolifrative effects of anastrozole on MCF-7 human breast cancer cells invitro are significantly enhanced by combind treatment with testosterone undecanoate. *Mol Med Rep*, 12(1): 769-75.

9- Cohen G.M. 1997. caspase: the executioners of apoptosis, *Biochem J*, 15; 326(Pt 1): 1–16.

10- Cui J., Liu L., Zhao D., Gan C., Huang X., Xiao Q., Binbin Qi., Lei., Huang Y. 2015. steroids Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle. *Steroids*, 95: 32.3.

11- Dai W.S., Kuller L.H., LaPorte R.E., Gutai J.P., Falvo-Gerard L., and Caggiula, A. 1981. The epidemiology of plasma testosterone levels in middle-aged men. *Am. J. Epidemiol*, 114: 804–816.

12- Degree V.S., Boyce- MYung J. 2003. A Decade of caspase, Oncogene, 22(53): 8543-8567.

13- Fatehm S.H., Amini M., 2008. An epidemiologic study of colorectal cancer in Arak during. *Iranian J Surg*, 16(2):11-7.

14- Finaly- Schultz J., Sartorius C.A. 2015. Steroid Hormones, Steroid Receptors, and Breast Cancer Stem Cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 20: 39-50.

15- Fujita E., Egashira J., Urase K., Kuitda K., Momoi T., 2001. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ*, 8: 335-344.

16- Gatson J.W., Kaur P., Singh M., Gatson JW., Kaur P., Singh M. 2006. Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-Kinase/AKt pathways through the unclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology*, 147(4): 2028-2034.

17- Green D.R. 2000. Apoptotic pathway, paper wrasp stone blynts scissors, *Cell*, 102: 1-4.

18- Grodstein F., Martinez E., Elizabet A., Platez E.A., Giovannucci E., Cloditz G.A., Kautzky m., Fuchs c., Stampfer M J. 1998. Postmenopausal Hormone Use and Risk for Colorectal Cancer and Adenoma. *Ann, Intern, Med*, 128: 705-712.

19- Gyovai A., Minorics R.., Kiss A., Mernyák E., Schneider G., Szekeres A., Kerekes E., Ocsovszki I., Zupko I. 2018. Antiproliferative Properties of Newly Synthesized 19-Nortestosterone Analogs Without Substantial Androgenic Activity. *Front Pharmacol*. 9: 825.

20- Hajra K.M., Liu J.R. 2004. Apoptosome dysfunction inhuman cancer. *Apoptosis*, 9: 691-704.

21 - Hatzogluo A., Kampa M., Kogia C., Charalampopoulos I., Theodoropoulos P.A., Aezinis P., Dambaki C., Papakonstanti E.A., Stathopouios E.N., Stournaras C., Gravanis A., Castanas E. 2005. Membrane androgen receptor activation induces apoptosis regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab,* 90(2): 893-903.

22- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of opoptosis, *Nature,* 407: 770-776.

23- Iványi Z., Szabó N., Huber J., Wölfling J., Zupkó I., Szécsi M., Wittmann T., Schneider G. 2012. Synthesis of Dring-substituted (5'R)- and (5'S)-17b-pyrazolinylandrostene epimers and comparison of their potential anticancer activities. *Steroids*, 77: 566-574.

24- Jakimov D.S., Kojic V.V., Aleksic L.D., Bogdanovic G.M., Ajdukovic JJ., Djurendic E.A., Penov-Gaši K.M., Sakač M.N., Jovanović-Šanta S.S. 2015. Androstane derivatives induce apoptotic death in MDA-MB-231 breast cancer cells. Bioorg. *Med. Chem*. 23: 7189-7198.

25- Jiang X., Wang X. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis, *Ann Rev Biochem*, 73: 87-106.

26- Kallergi G., Agelaki S., Markomanolaki H., Georgoulias V., Stournaras C. 2007. Activation of FAK/PI3K/Racl signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells, *Cell Physiol Biochem,* 20: 977-986.

27- Kampa M., Kogia C., Theodoropoulos PA., Anezinis P., Charalampopoulos I., Papakonstanti E.A., Efstathios N Stathopoulos, Hatzoglou A., Stournaras C., Gravanis A., Castanas E. 2006. Activation of membrane androgen receptors potentiates the antiproliferative effects of paclitaxel on human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 10.1158/1535-7163.

28. Kampa M., Papakonstanti E.A., Hatzoglou A., Stathopoulos E.N., Stournaras C., Castanas E. 2002. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeletone. *FASEB J,* 16: 1429-1431.

complex initiates an apoptoticprotease cascade. *Cell*, 91: 479-489.

39- Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis Cell, 94: 491–501.

40- Morley J.E., Kaiser F.E., Perry H.M., Patrick P., Morley P.M., Stauber P.M., B Vellas, Baumgartner R.N., Baumgartner R.N., Garry P.J. 1997. Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism*, 46: 410-413.

41- Papadopoulou N., Charalampopoulos I., Anagnostopoulou V., Konstantinidis G., Föller M., Gravanis A., Alevizopoulos K., Lang F., Stournaras C. 2008. Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3k/Akt/NF-κB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Mol. Cancer*, 7: 88.

42- Papadopoulo N., Papakonstanti EA., Kallergi G., Alevizopoulos K., Stournaras C. 2009. Membrane androgen receptor activation in prosate and breast tumor cells: Molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life*, 61(1): 56-61.

43- Passeri M., Pedrazzoni M., Pioli G., Butturini L., Ruys A.H., Cortenraad M.G. 1993. Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. *Maturitas*. 17(3): 211 -219.

44- Przemyslaw W., Miroslawa B., Ewa W., Michal D., Marek S., Robert EH. 1997. Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas. *Journal of surgical oncology*, 64: 3-11.

45- Schneider G., Kiss A., Mernyák E., Benke Z., Wölfling J., Frank É., Noémi Bózsity N., Gyovai A., Minorics R., Zupkó I. 2016. Stereo controlled synthesis of the four 16-hydroxymethyl-19-nortestosterone isomers and their antiproliferative activities. *Steroids*, 105: 113–120.

29. Kampa M., Pelekanou V., Castanas E. 2008. Membrance- initiated steroid action in breast and prostate cancer, *Steroid*. 73(9-10): 953-960.

30- Kaufmann S.H., Earnshaw W.C. 2000. Induction of opoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 256(1): 42-49.

31- Kim R., Emi M., Tanbe K., Murakami S., Uchida Y., Arihiro K., 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apaptotic *Cell Death Journal pathol*, 208: 319-326.

32- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlan H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. 2001. Death receotor recruitment of caspase-8, *Journal Bid chem, Dec, Epub*, 276(49): 46639-46646.

33 - Kuhn C.M. 2002. anabolic steroids. Recent Progress in Hormone Research. *The Yale journal of biology and medicine*, 57(1):411-434.

34 - Kumar S., Lavin M.F. 1996. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death, *Cell Death Differ*, 3: 255-267.

35- Kofler R., Schmidt S., Kofler A., and Ausserlechner M. J. 2003. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. J. *Endocrinol*, 178(1): 19-27.

36- Kwon A.M., Magnuson B.A. 2007. Aging alters acute apopotic response to azoxymethane in the colon of rats, *Exp Gerontol* , 142: 1154-1161.

37- Liamarkopoulos E., Gazouli M., Aravantinos G., Tzanakis N., Theodoropoulos G., Rizos S., Nikiteas N. 2011. Caspase 8 and caspase 9 gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Gastric Cancer*. 14: 317-321.

38- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula SM., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP depen-dent formation of Apaf-1/Caspase-9

46- Simmang CL., Senatore P., Lowry A., Hicks T., Burnstein M., Dentsman F., et al. 1999. Practice parameters for detection of colorectal neoplasms. The Standards Committee, the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum*, 42(9):1123-9.

47- Simoes B.M., Alferez D.G., Howell S.J., Clarke RB. 2015. The role of steroid hormones in breast cancer stem cells. *Endocr Relat Cancer*, 22(6): T177–T186.

48- Slattery M.L., Sweeney C., Murtaugh M., Ma K.N., Wolff R.K., Potter J.D., Caan B.J., Samowitz w. 2005. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 14(12):2936–42.

49- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.D., Newmeyer DD., Wang H.G., Reed JC., Nicholson DW., Alnemri E.S., Green D.R., Martin S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *Journal Cell Biol*, 144:281-92.

50- Smith R.A, Eschenbach A.c., Wender R., Levin B., Byers T., Rothenberg D., Brooks D., Creasman W., Cohen C., Runowicz C., Saslow D., Cokkinides V., Eyre H. 2001. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: Update of early detection guid-lines for prostate, colorectal and Endometrial cancers. Also: update testing for early lung cancer detection. *CA Cancer detection*, 51:38129-75.

51- Somjen D., Kohen F., Gayer B., Kulik T., Knoll E., Stern N. 2004. Role of putative membrane receptors in the effect of androgen on human vascular cell growth. *J Endocrinol*, 180: 97- 106.

52 - Srinivasula S.M., Amad M., Fenande S., Alnemri T., Alnemri E.S. 1998. autoactivationof procaspase-9 by apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1(7), 949-57.

53- Tuckermann J.P., Kleiman A., McPherson K.G., Reichardt H.M. 2005. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*, 42: 71–104.

54- Valadez-Comes P., German-Castelan, L., Gonzalez A., Velasco-Velazquez M.A., Hansberg-PAstore V., Camacho-Arroyo I. 2015. Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *Journal Steroid Biochem Mol Biom*, 154: 176-85.

55- Virigil T.G., John T.B., Jennifer N.D, Andre M.K., Alan G.P., Patricia V.S. 2004. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells.*Clin Cancer Res*, 10(15):5215-25.

56 - Wickhom p., Lassere Y. 2007. editors The ABCs of colorectal Cancer. *Seminors in oncology nursing*, Elsevier.

57- Winawer S.J., Fletcher R.H., Miller L., Godlee F., Stolar M.H., Mulrow C.D., S H Woolf S.H., Glick S.N., Ganiats TG., Bond J.M., Rosen L., Zapka J.Z., Olsen S.J., Giardiello FM., Sisk J.E., Antwerp R.V., C Brown-Davis C., Marciniak D.A., Mayer RJ. 1997. Colorectal cancer screening: *Clinical guidelines and rationale*. *Gastroenterology*, 112(2), 594-642.

58- Wobbes T.H., Beex L.V.A.M., Koenders A.M.J. 1984. Estrogen and progestin receptors in Colonic cancer. *Dis colon rectu*, 35, 163- 165.