زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۴۵- ۳۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات آپوپتوزی تستوسترون بر سلول‌های سرطانی ریوی (A549)

آزیتا تیشه‌یار[۱]، رحیم احمدی[۱*]، مینو محمودی[۱]، عبدالرضا محمدنیا[۲،۳]

۱- گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳-گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات: Drrahahmadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۴

چکیده

هورمون‌های استروئیدی جنسی می‌توانند بر تکثیر سلول‌های سرطانی در سطح سلولی و مولکولی اثرگذار باشند. در این مطالعه به بررسی اثرات آپوپتوزی تستوسترون بر سلول‌های سرطانی ریوی (A549) در محیط کشت سلولی پرداخته شد. این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، اثر سیتوتوکسیک هورمون تستوسترون بر سلول‌های غیرسرطانی Hek293 و سلول‌های سرطانی A549 با استفاده از تست MTT سنجیده شد. با استفاده از Real Time PCR بیان نسبی ژن‌های آپوپتوزی Bax و ضدآپوپتوزی Bcl2 در سلول‌های A549 در مواجهه با دوز IC50 تستوسترون ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از روش آماری آزمون واریانس یکطرفه بین گروه‌ها مقایسه شدند. مواجهه سلول‌های A549 و Hek293 با دوز بالای تستوسترون (۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) سبب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها شد ($p < ۰/۰۱$). دوز IC50 تستوسترون سبب کاهش معنادار سطح بیان ژن ضدآپوپتوزی Bcl2 در سلول‌های A549 شد ($p < ۰/۰۱$)، اما تغییر معناداری در سطح نسبی بیان ژن آپوپتوزی Bax ایجاد نکرد. غلظت سیتوتوکسیک تستوسترون با مهار سطح بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl2 سبب القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی ریه می گردد. بر این اساس، تستوسترون در دوز مناسب دارای اثرات ضد سرطانی بر علیه سلول‌های سرطانی ریه است.

کلمات کلیدی: تستوسترون، آپوپتوز، سرطان ریه، Bax، Bcl2.

مقدمه

امروزه سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان است (۲۴). از میان سرطان‌ها، می‌توان از سرطان ریه به عنوان عامل اصلی مرگ در مردان و دومین عامل اصلی مرگ در میان زنان نامبرد (۱۹، ۱۵). در سرطان تعادل بین تکثیر سلول و آپوپتوز بهم می-خورد، در نتیجه ارتباط مستقیمی بین بیان ژن‌های Bax و Bcl2 و فرایند سرطانی شدن وجود دارد (۱۸). بنابراین بررسی تغییرهای بیانی این ژن‌ها می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی یا تشخیصی در مطالعه‌های سرطان به شمار رود. در رابطه با ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، ژن Bcl2 به عنوان ژن ضد آپوپتوزی و ژن Bax به عنوان یک ژن آپوپتوزی عمل می‌کند (۲۳). در تحقیقاتی که اخیرا صورت گرفته، اثر هورمون‌های استروئیدی جنسی بر ژن‌های در ارتباط با سلول‌های

سرطانی بررسی شده است (۱۱). مطالعات نشان می-دهند که هورمون‌های استرویید جنسی نقش بسزایی در تکوین بسیاری از سرطان‌ها دارند (۵). در مطالعات انجام شده نتایج بسیار ضد و نقیض در این زمینه است. به عنوان مثال، نتایج تحقیقات بیانگر آن است که هورمون‌های استروئید مردانه باعث بروز سرطان-های آدنوما و تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی آدنوما می شوند (۲٤). در حالی که در مقابل نتایج برخی تحقیقات، بیان کننده اثر مهاری تستوسترون بر رشد و نمو برخی سلول‌های سرطانی است (۸). همچنین یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهند با وجودی که دهیدرواپی اندروسترون دارای اثر ضد آپوپتوزی بر سلول‌های سرطانی کولون است، اما تستوسترون باعث مقابله با این اثر در سلول‌ها می‌شود (۱). از طرف دیگر، هورمون‌های استرویید جنسی، به خصوص تستوسترون می‌توانند سبب تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی و یا موجب مهار رشد و تکثیر آنها شود. همچنین این هورمون‌ها می‌توانند در پیشگیری از متاستاز و یا تحریک متاستاز در سلول‌های سرطانی ایفای نقش کنند (٦). نتایج مطالعات زیادی، نشانگر ارتباط میان تجویز هورمون‌های استروئید جنسی و بیان ژن‌های Bcl2، Bax می باشند (۱۲). پژوهش های مختلفی ارتباط‌های گوناگون پروژسترون با انواع سلول‌های سرطانی بیان می کند، پروژسترون از طریق گیرنده‌های سیتوزولی موجب تحریک مسیر آپوپتوز شده و می تواند سبب مهار تکثیر سلولی گردد. در مطالعاتی که انجام شده ، مشاهده شده در سرطان‌های پروستات و سینه در مواجهه با پروژسترون منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی شده‌اند. البته اثرات سیتوتوکسیک مشتقات پروژسترون بر سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، به طور معناداری از هم متفاوت است، همینطور در تحقیقی که به بررسی اثرات پروژسترون بر تکثیر سلول‌های کولون در محیط کشت سلولی پرداخته شد، نتایج نشانگر آن بودند که پروژسترون دارای اثرات ضد تکثیری بر این سلول‌ها می‌باشد (۳). با توجه به اینکه علیرغم طیف گسترده-ای از مطالعات سلولی و مولکولی در زمینه سرطان ریه انجام شده، هنوز هم مکانیسم‌های درگیر در پیدایش و یا مهار این سرطان کاملا آشکار نیست؛ در این راستا طبیعی است که به دلیل مشخص نبودن بخش عمده‌ای از مکانیسم‌های درگیر در این سرطان، روش‌های درمانی و دارویی نیز از نقصان قابل ملاحظه‌ای برخوردار باشد. بدین ترتیب، مطالعه درباره این سرطان، به خصوص در سطح سلولی و مولکولی، به منظور کشف مکانیسم‌های درگیر، اهمیت ویژه ای دارد. بر این اساس با توجه به تاثیرات تحریکی یا مهاری تستوسترون بر تکثیر سلول‌های سرطانی و همچنین اثر آن بر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی (۸) این مطالعه به هدف بررسی اثرات آپوپتوزی تستوسترون بر سلول‌های سرطانی ریوی به پژوهش درباره اثرات سیتوتوکسیک تستوسترون و متعاقباً اثر دوز IC50 تستوسترون بر آپوپتوز در در رده سلولی سرطانی ریه (A549) در محیط کشت سلولی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی از دانشگاه علوم پزشکی همدان با شناسه اخلاق IR.UMSHA.REC. 1399.342 دریافت شد. هورمون تستوسترون به صورت پودر خالص از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شد. بر اساس تجربیات قبلی انجام شده (۲)، جهت حل کردن پودر خالص تستوسترون، ۱ میلی‌گرم پودر هورمون، یک میلی‌لیتر DMSO و ۱ میلی‌لیتر محلول توین ۸۰ به ۷ میلی‌لیتر محلول PBS اضافه شد و با استفاده از حلال‌های مناسب که قابلیت

نفوذ در محیط کشت سلولی داشته باشند، غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از هورمون مورد استفاده قرار گرفت. سلول سرطانی ریه (A549) و سلول غیرسرطانی جنینی کلیه (Hek293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فریز تهیه شد. نمونه در تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شده و در شرایط استاندارد نگهداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ که دارای سرم گاوی جنینی FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین/ استرپتومایسین) ۱ درصد است نگهداری شدند و در محیط حاوی CO2 ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس رشد کردند. در این تحقیق، از رده سلولی غیرسرطانی کلیوی رویانی جنینی (Hek293) به عنوان نمونه شاهد برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک احتمالی هورمون تستوسترون بر سلول‌های غیرسرطانی استفاده شد.

اثرات سیتوتوکسیک سلولی هورمون بر رده‌های سلولی Hek293 و A549 با استفاده از تست MTT بررسی شد و دوز IC50 هورمون با استفاده از رگرسیون خطی محاسبه گردید. جهت ارزیابی بیان ژن‌های Bax و Bcl2 از تکنیک PCR Real Time (ABI StepOne; Applied Biosystems, Foster City, CA) استفاده شد (۷). در این راستا، ۵۰۰۰۰۰ سلول از سلول‌های A549 در هر خانه از پلیت ٦ خانه ای کشت داده شده و محیط کشت و FBS افزوده گردید و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. در روز بعد غلظت IC50 هورمون به محیط‌های کشت اضافه شد و به مدت ٢٤ ساعت تیمار شدند. در ادامه، سانتریفیوژ انجام شده، سلول‌ها جمع‌آوری و توسط PBS شستشو داده شدند. RNA کل با استفاده از کیت مخصوص (RNeasy Plus Mini Kit 50; Qiagen, Valencia, CA) استخراج گردید و توسط کیت استاندارد (Takara, Tokyo, Japan) به cDNA رونویسی معکوس شد. در مرحله بعد، با استفاده از پرایمرهای مخصوص ژن‌های Bax, BCL2 و ژن Housekeeping (GAPDH) (جدول ۱)، سطح نسبی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با استفاده از فرمول RQ= $2^{-\text{Delta Delta CT}}$ محاسبه شد. در نهایت داده ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS18، آزمون کولموگروف- اسمیرنوف (جهت توزیع طبیعی داده‌ها) و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شدند. سطح معنی‌داری p <۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

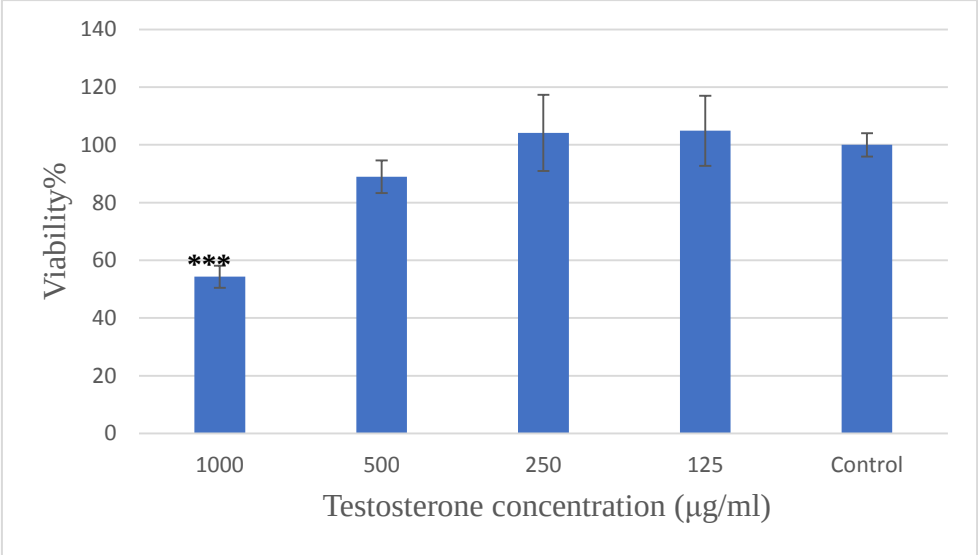
جدول ۱- پرایمر ژن‌های Bax,Bcl2 و GAPDH

Gene		Primer sequences
Bax	forward:	5' CGGCAACTTCAACTGGGG 3'
	Reverse:	5' TCCAGCCCAACAGCCG 3'
Bcl2	forward:	5' GGTGCCGGTTCAGGTACTCA 3'
	Reverse:	5'TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG 3'
GAPDH	forward:	5' CCCACTCCTCCACCTTTGAC 3'
	Reverse:	5'CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA3'

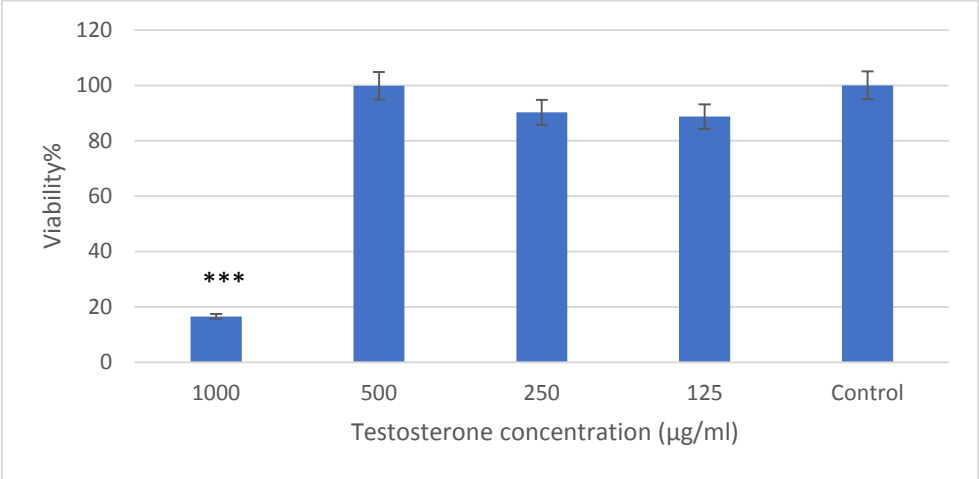
نتایج

میزان زنده‌مانی سلول‌های Hek293 که تحت تاثیر هورمون تستوسترون با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفته‌اند در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. در مقابل مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر هورمون تستوسترون سبب کاهش معنادار زنده-مانی سلول‌های Hek293 در مقایسه با گروه شاهد گردید (p < ۰/۰۱). (نمودار۱). میزان زنده‌مانی

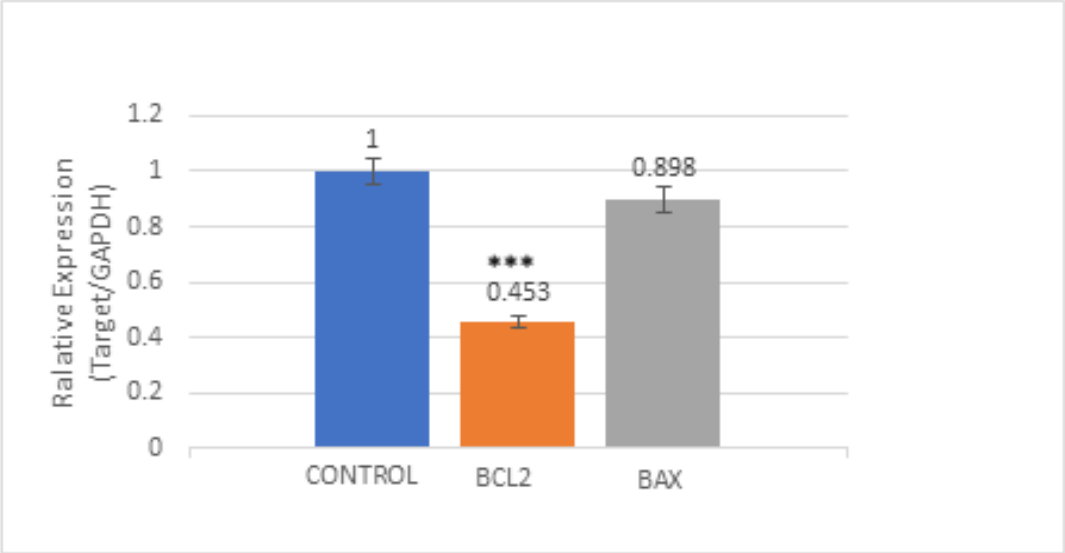
سلول‌های A549 که تحت تاثیر هورمون تستوسترون با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفته‌اند در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. در مقابل مواجهه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون تستوسترون سبب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ریه (A549 در مقایسه با گروه شاهد گردید (p <۰/۰۰۱)(نمودار۲). همچنین با استفاده از رگرسیون خطی دوز IC50 تستوسترون محاسبه گردید. بر این اساس دوز ۷۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان دوز IC50 در نظر گرفته شد. بیان نسبی ژن ضد آپوپتوز Bcl2 در سلول سرطانی A549 دریافت کننده دوز IC50 تستوسترون نسبت به گروه کنترل دارای کاهش بیان معنی‌داری شد (p < ۰/۰۰۱). از سویی دیگر، بیان نسبی ژن آپوپتوز Bax در سلول سرطانی A549 دریافت‌کننده دوز توکسیک تستوسترون نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌داری نشد (نمودار ۳).



نمودار ۱- مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف تستوسترون بر میزان زنده‌مانی سلول‌های Hek293. * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل (P ‹۰.۰۰۱ ***).



نمودار ۲- مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف تستوسترون بر میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ریه A549. * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل (P ‹۰.۰۰۱ ***).



نمودار ۳- اثر دوز سیتوتوکسیک تستوسترون بر بیان نسبی ژن‌های Bax, Bcl2 در سلول A549، نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است و حاصل ۳ بار تکرار می باشد. *بیانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل است (*** P ‹۰.۰۰۱).

بحث

اگرچه مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که هورمون‌های استرویيدی در آپوپتوز سلول‌های سرطانی نقش دارند (۸،۵،۱) اما هنوز اثر آپوپتوزی هورمون تستوسترون بر سلول‌های سرطانی ریه یکی از چالش‌برانگیزترین موضوعات تحقیقی است. بر این اساس مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک Real Time PCR به بررسی اثرات آپوپتوزی تستوسترون بر سلول‌های سرطانی ریوی (A549) پرداخته، تا نشان دهد آیا هورمون تستوسترون می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلول سرطانی ریه (A549) شود و با تاثیر بر چه ژن‌هایی می تواند این اثر را بر جای بگذارد. در این مطالعه به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک تستوسترون بر سلول‌های غیرسرطانی، اثرات غلظت‌های مختلف تستوسترون بر سلول‌های غیرسرطانی (Hek293) به عنوان سلول‌های شاهد در مقابل سلول‌های سرطانی ریه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان می دهند که بر خلاف دوزهای پایینتر، تنها دوز بالای تستوسترون (۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) سبب کاهش معنادار زنده‌مانی سلول غیر سرطانی کلیوی جنینی (Hek293) می‌گردد. موافق با یافته‌های این تحقیق، برخی تحقیقات نشان می‌دهند که آندروژن‌ها می‌توانند سبب مهار و یا کاهش تکثیر سلول‌های غیر سرطانی شوند. در این راستا، نتایج تحقیقات نشان می دهند که آندروژن‌ها می‌توانند موجب مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال شوند (۱۳). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد آندروژن‌ها می‌توانند تکثیر اندوتلیال (۱۳)، لوله‌ی کلیوی انسان (۱۷) و سلول‌های غیر سرطانی عضله صاف عروقی را مهار کنند (۱٤). از سویی، تستوسترون دارای اثر ضد تکثیری بر برخی سلول‌های ماهیچه صاف می باشد (۱٤).

گرچه و در مقابل، مطالعاتی وجود دارند که نشان می‌دهند تستوسترون ممکن است تکثیر سلول‌های غیر سرطانی را تقویت کند. مشخص شده است که سیگنالینگ گیرنده آندروژن نقش مهمی در تکثیر سلول‌های کلیوی دارد (۱۷). علاوه بر این، تستوسترون باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی

مزانشیمی می شود (٤). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد هورمون تستوسترون فقط در دوز بالا (۱۰۰۰میکروگرم/ میلی‌لیتر) می‌تواند سبب کاهش زنده‌مانی سلول سرطانی ریه شود. همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، دیگر مطالعات نشان داده اند هورمون تستوسترون دارای اثرات مهاری بر تکثیر سلول‌های مختلف سرطانی، از جمله سرطان پستان است (۸). همچنین هورمون‌های استرویید جنسی می‌توانند باعث مهار رشد برخی سرطان‌ها از مسیرهای مختلف آپوپتوزی و غیرآپوپتوزی شوند (۹).

در مقابل، برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند سطوح بالای آندروژن‌ها ممکن است ریسک سرطان را افزایش دهند (۲۲). نتایج مطالعه‌ای در سال ۲۰۱٤ نشان داد سطوح افزایش یافته تستوسترون پلاسما با خطر بالای ابتلا به سرطان و مرگ زودرس پس از سرطان مرتبط است (۲۰، ۲۱). تحقیق دیگری نشان داده است سطوح بالای تستوسترون ممکن است ریسک ابتلا به سرطان ریه و پروستات را افزایش دهد (۲۵).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که اثر غلظت IC50 تستوسترون با کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl2 سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه شده است، حال آنکه مطالعات قبلی تصویر روشنی از این امر را ارائه نداده بودند. از سویی دیگر، علیرغم انتظار معقول غلظت IC50 تستوسترون بر بیان ژن آپوپتوزی Bax تاثیر معناداری نداشت. در این راستا، نتایج برخی تحقیقات نیز نشان‌دهنده اثر مهاری تستوسترون بر رشد و نمو بعضی سلول‌های سرطانی می‌باشد (۸). تحقیقات نشان داده‌اند هورمون‌های استروئید جنسی می‌توانند در مهار سرطان پستان نقش داشته باشند (۵). یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهند تستوسترون می‌تواند در آپوپتوز سلول‌های سرطان کولون نقش موثری داشته باشد (۱). یافته‌های مطالعات پیشین بیانگر آن است که اثرات تستوسترون بر سلول سرطانی می‌تواند در مسیر ژنومی اعمال شده و مسیر آپوپتوز را تحت تأثیر خود قرار دهد و از این طریق بر بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و ضدآپوپتوزی Bcl2 تأثیرگذار باشد. تستوسترون با اتصال به گیرنده‌های خود و از مسیر ژنومی سبب بیان tRNA های ویژه‌ای می‌شود که به دنبال آن، این مولکول‌ها نقش به سزایی در تکثیر برخی سلول‌های سرطانی دارند (۱۰).

در تقابل با یافته‌های این تحقیق، نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهند که هورمون‌های استروئیدی نه تنها سبب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی نمی شوند؛ بلکه می‌توانند موجب تحریک سلول‌های سرطانی هم شوند؛ به عنوان مثال در تحقیقات مشخص شده است که هورمون‌های استرویید مردانه می‌توانند سبب بروز سرطان‌های آدنوما و تحریک تکثیر سلول‌های سرطانی آدنومایی شوند (١٦). همچنین تحقیقات نشان می-دهند تیمار سلول‌های گلایوبلاستوما با دی-هیدروتستوسترون موجب جلوگیری از آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد (٢٦).

از نظر مکانیسم عمل اثر سیتوتوکسیک هورمون تستوسترون بر سلول سرطانی ریه به نظر می‌رسد از آن جایی که هورمون تستوسترون می‌تواند به راحتی از غشا عبور نماید و وارد هسته سلول هدف گردد بنابراین قادر است بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز اثر گذارد(۱۰). گرچه عمده مطالعات پیشنهاد می‌کنند که اثرات آپوپتوزی هورمون تستوسترون بر سلول‌های هدف از طریق اتصال به گیرنده‌های غشایی سلول هدف اعمال می‌گردد (۱۰). گرچه تحقیق حاضر از نظر بررسی اثر سیتوتوکسیک هورمون تستوسترون بر بیان دیگر ژن‌های مرتبط با و به ویژه ژن‌های کاسپازی و بررسی غلظت‌های فارماکولوژیک هورمون تستوسترون در سلول‌های A549 دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. از طرفی با توجه به اینکه تستوسترون در غلظت بالای خود علاوه بر اعمال

اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی ریه دارای اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های غیر سرطانی نیز می باشد بنابراین در نظر گرفتن این هورمون جهت مصارف ضد سرطانی با محدودیت قابل توجهی همراه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که تنها غلظت بالای هورمون تستوسترون می‌تواند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه از طریق کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl2 گردد. اگرچه این پژوهش در مرحله بررسی و تحقیق با محدودیت‌هایی به ویژه از نظر بررسی دیگر ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و نیز بررسی پروتئین‌ها و آنزیم‌های درگیر در آپوپتوز همراه بود، در عین حال یافت‌های این پژوهش می‌توانند در مبانی درمانی سرطان ریه مورد توجه قرار گیرند. البته تحقیقات بیشتر سلولی و مولکولی و بالینی مورد نیاز است تا روشن کند که آیا هورمون تستوسترون می‌تواند در درمان تومورهای ریوی در مدل حیوانی یا انسانی نیز موثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج شده از پایان نامه دکتری به شماره ۱۷۱۴۸۵۰۹۹۶۷۴۰۴۶۱۶۲۲۶۳۸۹۱ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی همدان می‌باشد و به پشتیبانی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان انجام گرفته است. بدین وسیله از جناب آقای دکتر عسگری و سایر همکاران آزمایشگاه بیوتکنولوژی جاوید که در اجرای این تحقیق یاری کردند، قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Anagnostopoulou V., Pediaditakis I., Alkahtani S., Alarifi S.A., Schmidt E.M., Lang F., Gravanis A., Charalampopoulos I., Stournaras C. 2013. Differential effects of dehydroepiandrosterone and testosterone in prostate and colon cancer cell apoptosis: the role of nerve growth factor (NGF) receptors. *Endocrinology*, 154(7): 2446-2456.

2. Bigdeli R., Shahnazari M., Panahnejad E., Cohan R.A., Dashbolaghi A., Asgary V. 2019. Cytotoxic and apoptotic properties of silver chloride nanoparticles synthesized using Escherichia coli cell-free supernatant on human breast cancer MCF 7 cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1): 1603-1609.

3. Chávez-Riveros A., Garrido M., Apan M.T.R., Zambrano A., Díaz M., Bratoeff E. 2014. Synthesis and cytotoxic effect on cancer cell lines and macrophages of novel progesterone derivatives having an ester or a carbamate function at C-3 and C-17. *European Journal of medicinal chemistry*, 82: 498-505.

4. Corotchi M.C., Popa M.A., Simionescu M. 2016. Testosterone stimulates proliferation and preserves stemness of human adult mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57(1): 75-80.

5. Farahmandlou N., Oryan S., Ahmadi R., Eydi A. 2019. The Effects of Cytotoxic Dose of Testosterone on Bax, Bcl2, and CD82/KAI1 Genes Expression in Colorectal Adenocarcinoma (HT29) and Brain Glioblastoma Cells (A172). *Qom University of Medical Sciences Journal*, 12(11): 1-9.

6. Finlay-Schultz J., Sartorius C.A. 2015. Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 20(1-2): 39-50.

7. Gholami N., Cohan R.A., Razavi A., Bigdeli R., Dashbolaghi A., Asgary V. 2020. Cytotoxic and apoptotic properties of a novel nano- toxin formulation based on

biologically synthesized silver nanoparticle loaded with recombinant truncated pseudomonas exotoxin A. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4): 3711-3720.

8. Glaser R., Dimitrakakis C. 2015. Testosterone and breast cancer prevention. *Maturitas*, 82(3): 291-295.

9. Han B., Jiang P., Liu W., Xu H., Li Y., Li Z., Ma H., Yu Y., Li X., Ye X. 2018. Role of daucosterol linoleate on breast cancer: studies on apoptosis and metastasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24): 6031-6041.

10. Honda S., Loher P., Shigematsu M., Palazzo J.P., Suzuki R., Imoto I., Rigoutsos I., Kirino Y. 2015. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29): E3816-E3825.

11. Kwak B., Mulhaupt F., Myit S., Mach F. 2000. Statins as a newly recognized type of Immunomodulator. *Nature Medicine*, 6(12): 1399-1402.

12. Li X., Zhang J., Zhu X., Wang P., Wang X., Li D. 2015. Progesterone reduces inflammation and apoptosis in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage through the PI3K/Akt pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(5): 8197.

13. Ling S., Dai A., Williams M.R., Myles K., Dilley R.J., Komesaroff P.A., Sudhir K., 2002. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells. *Endocrinology*, 143(3): 1119-1125.

14. Lopes R.A.M., Neves K.B., Pestana C.R., Queiroz A.L., Zanotto C.Z., Chignalia A.Z., Valim Y.M., Silveira L.R., Curti C., Tostes R.C., 2014. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306(11): 1485-1494.

15. Molina J.R., Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A. 2008, May. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *In Mayo Clinic Proceedings*, 83(5): 584-594.

16. Patman G., 2015. Male hormones increase the incidence of colonic adenomas. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(1); 4-14.

17. Phillip M., Maor G., Assa S., Silbergeld A., Segev Y. 2001. Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats. *Endocrine*, 16(1): 1-6.

18. Saxena A., Viswanathan S., Moshynska O., Tandon P., Sankaran K., Sheridan D.P., 2004. Mcl- 1 and Bcl- 2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B cell chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*, 75(1): 22-33.

19. Torre L.A., Siegel R.L., Jemal A. 2016. Lung cancer statistics. *Lung Lancer and Personalized Medicine*, Springer, pp: 1-19.

20. Qrsted D.D., Nordestgaard B.G., Bojesen S.E. 2014. Plasma testosterone in the general population, cancer prognosis and cancer risk: a prospective cohort study. *Annals of Oncology*, 25(3): 712-718.

21. Verzola D., Gandolfo M.T., Salvatore F., Villaggio B., Gianiorio F., Traverso P., Deferrari G., Garibotto G., 2004. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney International*, 65(4): 1252-1261.

22. Warburton D., Hobaugh C., Wang G., Lin H., Wang R. 2015. Testosterone replacement therapy and the risk of prostate

cancer. *Asian Journal of Andrology*, 17(6): 878-881.

23. Westphal D., Kluck R.M., Dewson G. 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *21*(2):196-205.

24. Wong M.C., Lao X.Q., Ho K.F., Goggins W.B., Shelly L.A. 2017. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific Reports*, 7(1): 1-9.

25. Yao Q., Wang W., Jin J., Min K., Yang J., Zhong Y., Xu C., Deng J., Zhou Y. 2018. Synergistic role of Caspase-8 and Caspase-3 expressions: Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*, 21(4): 899-908.

26. Yu X., Jiang Y., Wei W., Cong P., Ding Y., Xiang L., Wu K. 2015. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumor Biology*, 36(2): 967-972.