Research Paper

The effect of progesterone on caspase 8, 9 and 3 activity and investigation of morphological changes in MCF-7 cells nuclei

Hadis Rostami Motamed[1], Mehrdad Shariati[1], Rahim Ahmadi[2*], Saeed Khatamsaz[1], Mokhtar Mokhtari[1]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

*** Corresponding author e-mail: drrahahmadi@yahoo.com**

Citation: Rostami Motamed H, Shariati M, Ahmadi R, Khatamsaz S, Mokhtari M. The effect of progesterone on caspase 8, 9, and 3 activity and investigation of morphological changes in MCF-7 cells nuclei. Daneshvar Medicine 2020; 28(3):70-74.

Abstract

Background and Objective: : Studies have shown that progesterone is effective in inducing apoptosis in cancer cells. This study aimed to evaluate the effect of progesterone on the activity of caspases 8, 9, and 3 and to investigate morphological changes in MCF-7 cell nuclei.

Materials and Methods: In this experimental study, MCF-7 cells were purchased from the Bank of Pasteur Institute of Iran. The activity of caspases 8, 9, 3 and the morphological changes of the cell nucleus in the cells exposed to the cytotoxic concentration of progesterone (2.5 mg/ml) were evaluated. Data were analyzed using an independent t-test.

Results: The activity of caspases 8, 9, and 3 ($P<0.01$, $P< 0.001$ and $P<0.001$, respectively) in MCF-7 cells exposed to cytotoxic progesterone concentration (2.5 mg/ml) significantly increased compared with the control group. Exposure of MCF-7 cells to the cytotoxic concentration of progesterone (2.5 mg/ml) caused several changes in MCF-7 cell nuclei.

Conclusion: The results of this study showed that progesterone increases caspase 8, 9, and 3 activity in MCF-7 cells.

Keywords: Progesterone, MCF-7, Caspase 8, 9 and 3

Received: 19 May 2020
Last revised: 29 July 2020
Accepted: 10 Aug 2020

مقاله پژوهشی

تأثیر پروژسترون بر فعالیت کاسپازهای ۸، ۹ و ۳ و بررسی تغییرات مورفولوژیک در هسته سلول های MCF-7

نویسندگان: حدیث رستمی معتمد[۱]، مهرداد شریعتی[۱]، رحیم احمدی[۲]*، سعید خاتم ساز[۱]، مختار مختاری[۱]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی **E-mail:drrahahmadi@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: پژوهش ها نشان دادند که پروژسترون بر القا آپوپتوز در سلولهای سرطانی تأثیرگذار است. هدف از این مطالعه تأثیر پروژسترون بر فعالیت کاسپازهای ۸، ۹، ۳ و بررسی تغییرات مورفولوژیک در هسته سلول هایMCF-7 بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، سلول های MCF-7 از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه شدند. فعالیت کاسپازهای ۸، ۹، ۳ و تغییرات مورفولوژیک هسته سلول‌ها در مواجهه سلول ها با غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آزمون تی تست مستقل آنالیز شدند.

نتایج: فعالیت کاسپاز های ۸، ۹ و۳ (به ترتیب P< ۰/۰۱، P< ۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۱) در سلول‌های MCF-7 در مواجهه با غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. هسته سلولهای MCF-7 در مواجهه با غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) تغییرات متعددی نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد پروژسترون سبب افزایش فعالیت کاسپازهای ۸، ۹ و ۳ در سلولهای MCF-7 می گردد.

واژه های کلیدی: پروژسترون، MCF-7، کاسپاز ۸، ۹ و۳

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۵/۰۸
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۰

مقدمه

هورمون پروژسترون توسط جسم زرد و جفت ترشح می شود (۱). این هورمون نقش مهمی در بسیاری از جنبه های تولید مثل، از جمله تخمک گذاری، تغییرات آندومتر و نگهداری بارداری بازی می کند. اثرات متعدد و پیچیده پروژسترون برروند تولید مثل زنان به دلیل اتصال و فعال شدن گیرنده های پروژسترون (PR)، از جمله زیر واحدهای PR-A و PR-B و گیرنده های غشائی می باشد (۲). پروژسترون نقش مهمی در تکثیر و تمایز سلول های اپی تلیالی پستان نیز دارد (۳). همانطور که پروژسترون موجب تغییرات خاصی در بافت طبیعی پستان در طی روند بلوغ، حاملگی و شیردهی می شود، بر روی بافت های سرطانی پستان نیز تأثیرات عمده ای را اعمال می کند (٤).

از طرفی فرآیند آپوپتوز در پیشرفت سرطان ها از جمله سلول های سرطانی پستان مهم است. از آنجایی که آپوپتوز سلول‌های دارای اختلالات ژنتیکی از قبیل سلول های دارای DNA آسیب دیده را حذف می‌نماید، به این ترتیب از تکثیر غیرقابل کنترل سلول های آسیب دیده جلوگیری می کند (۵). اگرچه ژنهای متعددی در آپوپتوز دخالت دارند، واسطه های کلیدی این فرایند، آنزیمهای کاسپازی می باشند. کاسپازها ، پروتئاز سیستین آسپارتیل هستند و ١٤ عضو از این خانواده شناسایی شده اند. این آنزیم‌ها بر اساس عملکرد و موقعیت و ویژگی های ساختاری به کاسپازهای آپوپتوزی و کاسپازهای التهابی طبقه‌بندی می شوند. عموما" کاسپازهای آپوپتوزی ها به دو گروه تقسیم می شوند: کاسپازهای آغازگر (یعنی کاسپاز-۲، -۸، -۹ و -۱۰) و کاسپازهای اجرائی (یعنی کاسپاز-۳، -٦ و -۷) (٦) .نقش کاسپازها در سرطانها به ویژه در سرطان پستان در سالهای اخیر مورد توجه بوده است. سرطان پستان، شایع ترین نوع تشخیصی از سرطان است که باعث مرگ و میر در زنان در سراسر جهان است و با بیش از ۱/۳ میلیون مورد در هر سال ، ۱۵٪ مرگ و میر ناشی از سرطان را تشکیل می دهد (۷). هورمونهای استروئیدی در انواع مختلف سرطانها می توانند نقش داشته باشند. در این راستا نتایج پژوهش ها نشان دادند هورمون‌های استروئیدی جنسی و گیرنده‌های آن‌ها نقش مهمی در پیشرفت سرطان مثانه دارند (۸). همچنین نتایج مطالعه‌ای نشان داد هورمونهای استروئید جنسی به ویژه استروژن- آندروژن ممکن در پیشرفت سرطان پروستات مهاجم مهم باشند (۹). از سویی پژوهشهای مختلف نشان دهنده ارتباط بین پروژسترون و انواع مختلف سرطانها می باشند. هردو نوع پروژسترون و پروژستین مصنوعی مستقیما تکثیر سلولی را مهار کرده و آپوپتوز سلولی را در سلول های استرومای آدنومایوتیک (ASCs) انسانی القا می‌کنند (۱۰). همچنین برخی از سیگنال های پلی مورفیسم های نوکلوئیدی های (SNPs) کاسپاز ۸ با ریسک نوع خاصی از سرطان پستان مرتبط هستند (۱۱). پژوسترون به وسیله فعال سازی مسیر پیام‌رسانی Fas/ FasL و افزایش سطح فعالیت کاسپاز ۸ باعث آپوپتوز در سلول های اپی تلیالی طبیعی و بدخیم تخمدان انسان نیز می‌شود (۱۲). همچنین نتایج پژوهشی نشان داده‌اند که میزان آپوپتوز ناشی از عملکرد کاسپاز ۳ در بافت سرطانی پستان بیشتر از بافت غیربدخیم پستان است (۱۳). در واقع کاسپازهای ۳ و ۸ از تنظیم‌کننده‌های اصلی پاسخهای آپوپتوزی در بسیاری از سلول های سرطانی و غیرسرطانی می‌باشند (١٤). گرچه نتایج برخی پژوهشها من الجمله پژوهش انجام یافته در مورد بررسی اثرات پروژسترون بر آپوپتوز در سلول های مشتق از تروفوبلاست جنین انسانی نشانگر آن است که پروژسترون مانع از آپوپتوز در این سلول‌ها می شود و این امر با تنظیم کاهشیFas، Fas-L، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ رخ می‌دهد (۱۵).

با توجه به نقش هورمونهای جنسی در بسیاری از سرطانها خصوصا سرطان پستان و شیوع قابل توجه سرطان پستان در ایران و جهان و عوارض گسترده بالینی و روانی و اقتصادی بر فرد مبتلا و همچنین با توجه به بررسی مطالعات ضدو نقیض در ارتباط با اثر پروژسترون بر

سرطان پستان در سطح سلولی و مولکولی و محدودیت مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات سایتوتوکسیک پروژسترون بر زنده مانی و تغییرات مورفولوژیک هسته های رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و فعالیت کاسپازهای ۹،۸ و ۳ در محیط کشت سلولی پرداخته شد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر می تواند به عنوان مبنایی در جهت پیشگیری و درمان سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

مواد و روش ها

طی این تحقیق تجربی هورمون پروژسترون به صورت پودر از شرکت داروسازی ابوریحان تهران خریداری شد. جهت تیمار سلول ها، رقت سیتوتوکسیک هورمون در میکروتیوپ های استریل تهیه و از فیلتر سرسرنگی جهت استریل عبور داده شد. بر مبنای مطالعات پیشین (١٦). در این پژوهش غلظت ۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر پروژسترون رده سلولی MCF-7 به عنوان غلظت سیتوتوکسیک مورد استفاده قرار گرفت. رده سلولی MCF-7 از انستیتوپاستور تهران به صورت فریز خریداری شدند. سلول‌ها در تانک ازت به آزمایشگاه انتقال و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. این سلول‌ها در محیط کشت (DMEM) رشد دارای سرم جنین گاوی (FBS) نگهداری شدند و در انکوباتور ۵ درصد CO2 دار و در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد.

فعالیت کاسپاز های ۳، ۸، ۹ در رده سلولی MCF-7 با استفاده از کیت آزمایشگاهی (Abnova, Taiwan) و طبق پروتکل شرکت سازنده مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها به دو گروه کنترل و گروه مواجهه با غلظت سیتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر) تقسیم بندی شدند. تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در هر ول پلیت ٦ خانه ای ریخته سه ول را برای گرو کنترل و سه ول را برای گروه تیمار در نظر گرفته شد بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون، سلول ها را با غلظت سیتوتوکسیک پروژسترون) ۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر (به مدت ٢٤ ساعت تیمار کرده سپس سلول ها را تریپسینه کرده و سانتریفیوژ انجام گرفت. به سلولهای ته نشین شده در میکروتیوپ ۵۰ لاندا لایزیزبافر (lasyse buffer) اضافه گردید و سمپلینگ انجام گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار دادیم. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ انجام گرفت. عصاره سیتوزولی را به یک میکروتیوپ دیگر انتقال داده شد. مقدار ٤٩/٥ لاندا Reaction و ۰/۵ لاندا DDT درون یک میکروتیوپ ریخته و با هم مخلوط گردید. باید توجه داشت به ازای هر واکنش این میزان تهیه گردید. ۵۰ لاندا از مخلوط تهیه کرده را درون میکروتیوپ حاوی عصاره سیتوزولی ریختیم. سپس ۵ لاندا سوبسترای کاسپاز اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور قرار دادیم. در نهایت محتویات هر یک از میکروتیوپ ها را به یک ستون از پلیت ٩٦ خانه انتقال داده سپس درون دستگاه الایزاریدر قرار داده و با طول موج ٤٠٥ نانومتر اعدا خوانده شد.

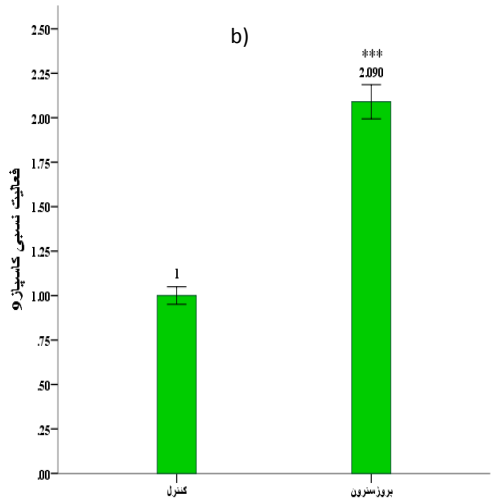
برای بررسی مورفولوژی هسته سلول‌ها، سلول‌ها را به دو گروه کنترل و گروه مواجهه با غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون تقسیم بندی کردیم. تعداد ۵×۱۰۵ سلول درون دو ول پلیت ٦ خانه کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت انکوبه کرده. یک ول را برای گروه کنترل و یک ول را برای گروه تیمار با غلظت سیتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر) در نظر گرفته شد. سلول‌ها را به مدت ٢٤ ساعت تیمار کرده سپس سانتریفوژ کرده و بعد از آن سلول ها را روی لام ریخته و با استون ۸۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس کرده و درون یخچال قرار داده سپس استون را خارج، ۵ ماکرو گرم رنگ هوخست۳۳۳٤۲ اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده، رنگ را خارج کرده و با بافرفسفات سالین (PBS) شستشو داده و با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan) تصویربرداری انجام گرفت.

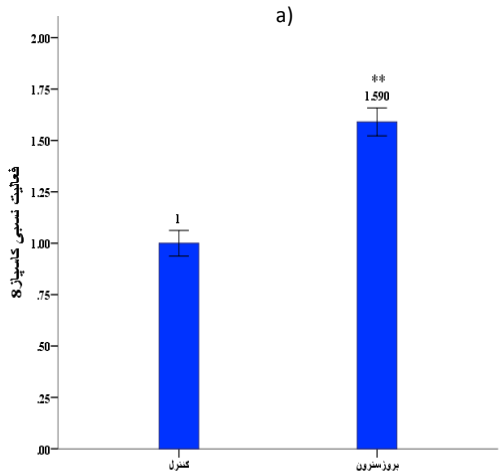
در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS21 و اکسل آنالیز شدند. با استفاده از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف، وضعیت نرمال بودن داده ها بررسی شد و با توجه به توزیع نرمال از آزمون تی تست مستقل جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. اختلاف بین گروهها در سطح P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

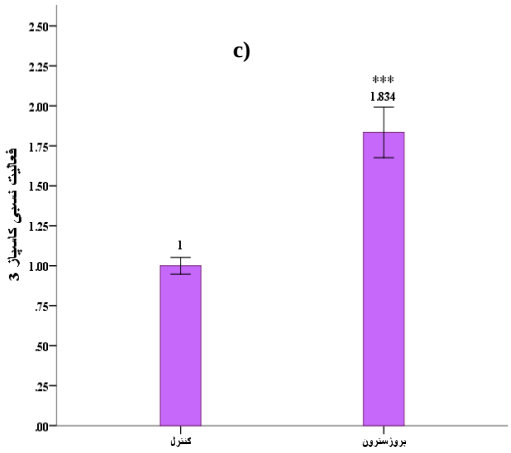
یافته ها

در این مطالعه نمودار شماره ۱، بیانگر فعالیت کاسپاز۸، ۹ و ۳ در سلولهای MCF-7 دریافت کننده غلظت سیتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم / میلی لیتر) در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

با توجه به نمودار (۱a,b)، فعالیت کاسپاز های ۸ و۹ در رده سلولی MCF-7 در گروه دریافت کننده غلظت سیتوتوکسیک (۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر) پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت (به ترتیب P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۱) علاوه بر این در نمودار (۱c) فعالیت کاسپاز ۳ در گروه دریافت کننده غلظت سیتوتوکسیک (۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر) پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل نیز افزایش معنی داری داشت (P<۰/۰۰۱).



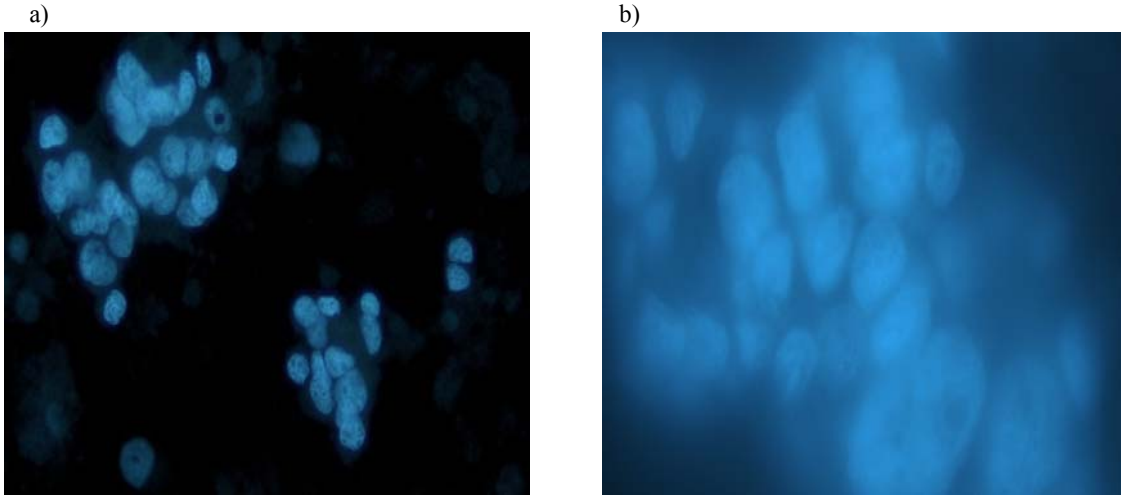




نمودار شماره ۱. اثر غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر) بر فعالیت کاسپاز ۸،۹ و ۳ در رده سلولی سرطان پستان**MCF-7** در مقایسه با گروه کنترل. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند و حاصل سه بار تکرار می باشند. علائم ** و *** بیانگر به ترتیب **P** <۰/۰۱ و**P** < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

شکل۱، نشان دهنده خصوصیات مورفولوژیکی هسته سلول های MCF-7 دریافت کننده غلظت سایتوتوکسیک (۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر) پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 با تیمار سلولها با غلظت سایتوتوکسیک (۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر) پروژسترون تایید شده و مورفولوژی هسته سلول با رنگ هوخست ۳۳۳٤۲ ارزیابی شد. شکل (۱) نشان دهنده ی نشانگر فلورسانس هوخست ۳۳۳٤۲ در سلولها با تیمار یا بدون تیمار با پروژسترون است به ترتیب در گروه کنترل (شکل a: 1) هسته سلول های MCF-7 با خطوط منظم ظاهر و سلول ها درشت تر و به صورت آبی یکنواخت مشاهده می‌شوند اما سلولها در مواجهه با غلظت سایتوتوکسیک (۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر) پروژسترون به دلیل متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان مشاهده می گردد (شکل b: 1) .



شکل ۱. a) گروه کنترل b) گروه تیمار با پروژسترون (۲/۵ میلی گرم /میلی لیتر)

بحث

نتایج این مطالعه نشان دادند که غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی گرم/ میلی لیتر) در سلولهای MCF-7 سبب افزایش معنی داری در فعالیت کاسپاز های۳، ۸ و ۹ می گردد. موافق با نتایج تحقیق حاضر، یافته های پژوهشی نشان داده‌اند که تیمار سلولهای سرطانی دهانه رحم (هیلا) با پروژسترون سبب مهار رشد تومور از طریق القای آپوپتوز می شود (۱۷). همچنین نتایج تحقیقاتی که در ارتباط با اثر درمان ترکیبی پروژسترون با تاموکسیفین بر رشد و آپوپتوز سلولهای سرطان تخمدان صورت گرفته بیانگر آنند که که پروژسترون باعث القا آپوپتوز و تاموکسیفن سبب توقف G1 می‌شود (۱۸). از طرفی یافته های تحقیقی حاکی از آنند که هر دو هورمون استرادیول و پروژسترون سبب کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز در سرطان کولون می شوند (۱۹). در مطالعه انجام یافته در بیماران مبتلا به سرطان، بیان بالای کاسپاز ۳ مشاهده شده است (۲۰). همچنین نتایج پژوهشی نشان داده‌اند که تیمار سلول های رده لکوییدی با ۵۰ ماکرومول پروژسترون به مدت ۲٤ ساعت باعث فعال سازی کاسپاز ۳ و ۹ گردیده، علاوه بر این سبب فعال سازی کاسپاز ۸ در سلول های لنفوییدی انسان نیز می‌شود (۲۱). بررسیها در خصوص بیان کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سرطان پستان نشانگر نقش معنادار این کاسپازها در سرطان پستان بوده و در واقع کاسپاز ۳ و ۸ از تنظیم‌کننده‌های

اصلی پاسخهای آپوپتوزی می باشند. در این راستا نقش کاسپاز – ۳ در سرطان پستان قابل توجه و برجسته می‌باشد (١٤) گرچه در مقابل یافته های حاصل از پژوهش حاضر برخی نتایج تحقیقاتی نشان داده اند که پروژسترون سبب مهار آپوپتوز در برخی سلول ها از قبیل سلول های مشتق از تروفوبلاست جنین انسانی و باعث تنظیم کاهشی کاسپاز ۳ و ۸ می شود (۱۵). همچنین برخی گزارشها حاکی از آنند که استروژن و پروژسترون می توانند سبب کاهش سطح فعالیت کاسپازها در سلول های سرطان ریه شوند (۲۲).

علاوه بر این در مطالعه حاضر به بررسی اثر غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر) بر مورفولوژی هسته سلولهای سرطان پستانMCF-7 پرداخته شد و از نتایج این مطالعه می توان استنباط کرد که مورفولوژی هسته سلولهای سرطان پستانMCF-7 در مواجهه با غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون (۲/۵ میلی گرم/ میلی لیتر) تغییر پیدا کرده و دستخوش آپوپتوز شده است . در این راستا قطعه قطعه شدن DNA در هسته سلول، تغییرات مورفولوژیک هسته و متراکم شدن کروماتین که با رنگ آمیزی هوخست مشاهده شد، موید رخ دادن آپوپتوز در این سلول ها بود. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون سبب فعال شدن کاسپازهای ۸ و ۹ گردیده و از آنجا که این کاسپازها به ترتیب مربوط به مسیر خارجی و مسیر داخلی آپوپتوز می باشند؛ بنابراین، به نظر می رسد پروژسترون از طریق هر دو مسیر می تواند بر فعالیت کاسپازها در سلولهای MCF-7 تاثیر بگذارد.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که غلظت سایتوتوکسیک پروژسترون با افزایش سطح فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ سبب القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) شده و در این راستا باعث فعال شدن هر دو مسیر بیرونی و درونی آپوپتوز در این سلول ها می گردد.

منابع

1. Friberg PA, Larsson DJ, Billig H. Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis. Biology of Reproduction 2009;80(6):1160-7.
2. Sitruk-Ware R. Non-clinical studies of progesterone. Climacteric 2018;21(4):315-20.
3. Zhou L, Zhou W, Zhang H, Hu Y, Yu L, Zhang Y, et al. Progesterone suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis to the brain via membrane progesterone receptor α. International Journal of Molecular Medicine 2017;40(3):755-61.
4. Daniel AR, Knutson TP, Lange CA. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. Molecular and Cellular Endocrinology 2009;308(1-2):47-52.
5. Han S, Lee K-M, Choi J-Y, Park SK, Lee J-Y, Lee JE, et al. CASP8 polymorphisms, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. Breast Cancer Research and Treatment 2008;110(2):387-93.
6. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology 2007;35(4):495-516.

7. Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012 CA. A Cancer Journal for Clinicians 2015; 65: 87-108.

8. Lucca I, Fajkovic H, Klatte T. Sex steroids and gender differences in nonmuscle invasive bladder cancer. Current Opinion in Urology 2014;24(5):500-5.

9. Black A, Pinsky PF, Grubb RL, Falk RT, Hsing AW, Chu L, et al. Sex steroid hormone metabolism in relation to risk of aggressive prostate cancer. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 2014;23(11):2374-82.

10. Yamanaka A, Kimura F, Kishi Y, Takahashi K, Suginami H, Shimizu Y, et al. Progesterone and synthetic progestin, dienogest, induce apoptosis of human primary cultures of adenomyotic stromal cells. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2014;179:170-4.

11. Park HL, Ziogas A, Chang J, Desai B, Bessonova L, Garner C, et al. Novel polymorphisms in caspase-8 are associated with breast cancer risk in the California Teachers Study. BMC Cancer 2016;16(1):14.

12. Syed V, Ho S-M. Progesterone-induced apoptosis in immortalized normal and malignant human ovarian surface epithelial cells involves enhanced expression of FasL. Oncogene 2003;22(44):6883-90.

13. O' Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O' Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. Clinical Cancer Research 2003;9(2):738-42.

14. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. Apoptosis 2017;22(3):357-68.

15. Liu J, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Xu Q, Maruo T. The effects of progesterone on apoptosis in the human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. Molecular human Reproduction 2007;13(12):869-74.

16. Rostami Motamed H, Shariati M, Ahmadi R, Khatamsaz S, Mokhtari M. The Effect of Progesterone on the Viability of MCF-7 Cell Line and Evaluation of Expression of P53, BAX and BCL-2 Genes. Qom University of Medical Sciences Journal 2019;13(7):1-9.

17. Liu Y, Tian L, Yang H, Zhang H. Effects of estradiol and progesterone on the growth of HeLa cervical cancer cells. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2017;21(17):3959-65.

18. Lee J-Y, Shin J-Y, Kim H-S, Heo J-I, Kho Y-J, Kang H-J, et al. Effect of combined treatment with progesterone and tamoxifen on the growth and apoptosis of human ovarian cancer cells. Oncology Reports 2012;27(1):87-93.

19. Sasso CV, Santiano FE, Arboccó FCV, Zyla LE, Semino SN, Guerrero-Gimenez ME, et al. Estradiol and progesterone regulate proliferation and apoptosis in colon cancer. Endocrine Connections 2019;8(3):217-29.

20. Himuro T, Horimoto Y, Arakawa A, Matsuoka J, Tokuda E, Tanabe M, et al. Activated caspase 3 expression in

remnant disease after neoadjuvant chemotherapy may predict outcomes of breast cancer patients. Annals of Surgical Oncology 2016;23(7):2235-41.

21. Kon A, Yuan B, Hanazawa T, Kikuchi H, Sato M, Furutani R, et al. Contribution of membrane progesterone receptor α to the induction of progesterone-mediated apoptosis associated with mitochondrial membrane disruption and caspase cascade activation in Jurkat cell lines. Oncology Reports 2013;30(4):1965-70.

22. Grott M, Karakaya S, Mayer F, Baertling F, Beyer C, Kipp M, et al. Progesterone and estrogen prevent cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. Anticancer Research 2013;33(3):791-800.