



## تأثیر کروسین زعفران و دوکسوروپیسین بر ژن های مسیر سیگنالینگ آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) در رده سلولی سرطان اپیدرموموئید انسان (KB)

فرشته نیک فطرت: کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

سعید قربیان: استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران (نویسنده مسئول) [s\\_ghorbian@iau-ahar.ac.ir](mailto:s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir)

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

دوکسوروپیسین،  
کروسین،  
PTEN  
،AKE

سلول سرطان KB

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۲۱  
تاریخ چاپ: ۹۹/۰۵/۲۵

**زمینه و هدف:** سرطان دهان ششمین سرطان شایع در جهان بوده و دومین سرطان کشنده است. یکی از راههای اصلی درمان این سرطان شیمی درمانی و ایمونوتراپی است. اما برخی از تومورها بعداز این که تحت تأثیر شیمی درمانی قرار گرفتند، احتمال عود مجدد آنها وجود دارد. بسیاری از دانشمندان اعتقاد دارند مصرف انتی اکسیدانت ها هم زمان با مصرف شیمی دارو، ممکن است اثرات دارو ها را خنثی نمایند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر کروسین زعفران بر عملکرد ضد سرطانی داروی دوکسوروپیسین بر روی ژن های مسیر سیگنالینگ آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) در رده سلولی سرطان اپیدرموموئید انسان (KB) می باشد.

**روش کار:** سپس با استفاده از روش MTT assay تکثیر و یا مرگ سلولی در بیمار با کروسین و داروی دوکسوروپیسین مورد بررسی قرار گرفت. تست DNA Ladder و DAPI برای نشان دادن آپوپتوز سلولی انجام شد. پس از استخراج RNA تام و تهیه cDNA، میزان تغییرات بیان ژن های مرتبط با رشد و آپوپتوز سلولی (PTEN/AKT1) به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته ها:** بررسی ما نشان داد که دوکسوروپیسین دارای اثر مهاری بر روی سلول های سرطان دهان بوده، و توانایی القا ژن PTEN و نیز مهار بیان ژن AKT1 را دارد. علاوه بر این نتایج نشان داد که استفاده هم زمان از کروسین و داروی دوکسوروپیسین تأثیر دارو را افزایش داده است.

**نتیجه گیری:** کروسین زعفران می تواند علاوه بر اثرات مستقیم انتی اکسیدانتی، اثرات ضد سرطانی هم بصورت سینergic با داروی دوکسوروپیسین بر روی رده سلول سرطانی KB داشته باشد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منع حمایت کننده:** دانشگاه آزاد واحد اهر

### شیوه استناد به این مقاله:

Nikfetrat F, Ghorbian S. Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB). Razi J Med Sci. 2020;27(5):197-209.

\* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB)

Fereshteh Nikfetrat, MSc, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

DOI: [Saeid Ghorbian, Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran](https://doi.org/10.30477/rjms.2020.100001)

(\* Corresponding author) s\_ghorbani@iau-ahar.ac.ir

### Abstract

**Background:** Oral cancer is the sixth most common cancer in the world and the second deadliest cancer. One of the main ways to treat this cancer is chemotherapy and immunotherapy. However, some tumors may recur after being treated with chemotherapy. Many scientists believe that using antioxidants at the same time as chemotherapy may counteract the effects of drugs. To date, several therapeutic effects of saffron have been revealed, which are mainly related to effects on the antioxidant and anti-inflammatory properties of saffron. Doxorubicin is a tetracycline antibiotic that has anti-neoplastic activity and is considered as anti-cancer agents in chemotherapy in the treatment of cancer. The phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) is a tumor suppressor gene, which involved in regulating the cell cycle and may consider as the target of many cancer drugs. The AKT Serine/Threonine Kinase 1 (AKT1) gene encodes the enzyme serine/threonine kinase, which a crucial role in the transmission of cell growth signals, possibly acting through the IGF1 receptor. Oral cancer is one of the most common cancers. Saffron crocin and doxorubicin have a great effect on the prevention and treatment of cancer with an increase in the expression of apoptotic genes. However, assessment of the effects of saffron crocin with doxorubicin on the cell signaling pathway of the AKT1 and PTEN genes in the human oral epidermoid (KB) cancer cell line is necessary. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of saffron crocin along with doxorubicin chemistry on the apoptotic cell signaling pathway (PTEN / AKT1) in human oral epidermoid (KB) cancer cell line.

**Methods:** In this case-control study, firstly, the KB cell line obtained from the Pasteur Institute Cell Bank of Iran, cultured in RPMI-1640 medium which containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 mg/ml of the antibiotics penicillin and streptomycin, then incubated under 5% carbon dioxide at 37 °C. Some KB cells were cultured in each well (12,000 to 10,000 cells per well) and after 24 hours, then controlled wells and an appropriate amount of doxorubicin was added to the each of wells. After time, the medium inside the wells was discarded and each well was replaced with 200 µl of fresh medium and 50 µl of MTT solution (2 mg / ml dissolved in PBS). Untreated cells were used as controls. The dishes were incubated at 37 °C for 4 hours in the dark. Cell proliferation or death of cells treated with crocin and doxorubicin were evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and DNA-ladder assays were also performed to demonstrate the cell apoptosis. To extract RNA, the cells were lysed by trisol and transferred into DNase/RNase-free microtubes. RNA is converted to cDNA by the reverse transcriptase enzyme. M-MLV Reverse Transcriptase (made by Thermo Fisher) was applied for cDNA synthesis. The quality and quantity of RNA was evaluated with a 260/280 nm UV spectrophotometer (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA). After total RNA extraction and cDNA synthesis, the expression changes of PTEN / AKT1-associated growth and apoptotic genes were assessed using real-time

### Keywords

Doxorubicin,

Crocin,

PTEN,

AKT,

Cell line KB

Received: 10/06/2020

Published: 15/08/2020

PCR. The PTEN / AKT gene expression changes in the treated samples compared to the control sample, which was normalized by the GAPDH gene and calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. All the statistical work was carried out using the SPSS (version 22, IBM, USA), the values of  $p<0.001$  were considered to be statistically significant.

**Results:** To evaluate the cytotoxic effect of doxorubicin and to find IC<sub>50</sub> in KB cells, MTT assay was performed triplicate for each cell. The results showed that the IC<sub>50</sub> in the KB cell for 24 h was about 40 μM. After treatment with 40 μM doxorubicin and 1000 μM saffron crocin on cancer cells, the cells moved towards apoptosis for 24 hours and did not show an inhibition role by crocin on drug function. Our finding revealed that doxorubicin has an inhibitory effect on oral cancer cells, and it is capable of inducing proapoptotic gene (*PTEN*) as well as inhibiting *AKT1* gene expression. The use of crocin had no significant effect on doxorubicin inhibition. The results also showed that combined use of this natural antioxidant with drug chemistry significantly increased the effects of the drug.

**Conclusion:** Our results showed that doxorubicin has cytotoxicity effects on oral cancer cells (KB). The crocin showed a synergistic effect on effectiveness. Crocin not only has anti-cancer and antioxidant effects but can both reduce the chemotherapeutic side effects of the drug and increase anti-cancer effects. Saffron Crocin as a natural antioxidant can have both antioxidant and anti-cancer effects synergistically with doxorubicin on Human Epidermoid Cancer Cells (KB).

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Islamic Azad University Branch Ahar

**Cite this article as:**

Nikfetra F, Ghorbian S. Saffron crocin and doxorubicin apoptotic effect on the cellular signaling pathway genes (PTEN / AKT1) on human epidermoid cancer cells (KB). Razi J Med Sci. 2020;27(5):197-209.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

و طی یک فرایند چند مرحله ای رخ می دهد. مسلمًا تغییرات و آسیب های واردہ، DNA را تحت تأثیر قرار داده و آن را ناپایدار می سازد. لذا تغییرات ژنتیکی و چند شکلی ناشی از آن می تواند اثر گسترشده ای در حساسیت و گسترش سرطان دهان داشته باشد (۱۰). پروتوآنکوژن ها (ژن های تودهزا پیش از جهش) در حالت طبیعی مسئول تنظیم تقسیم برای رشد سلول ها می باشند. هنگامی که جهش ژنتیکی پیدا می کنند، به نام آنکوژن نامگذاری می شوند و بیان ژنی آن ها خیلی بالاست. هومئوستازی در بافت طبیعی، توسط یک روند سیار تنظیم شده تکثیر سلولی (متعادل با مرگ سلولی) حفظ می شود. در صورت عدم تعادل، چه در مرحله ای تکثیر سلولی و چه در مرحله ای مرگ سلولی یک حالت سرطانی به وجود می آید. آنکوژن ها و ژن های سرکوبگر تومور، نقش مهمی در این فرایند ایفا می کنند، زیرا تکثیر یا مرگ سلولی را تنظیم می کنند (۱۱). *PTEN* روی کروموزوم ۱۰ در موقعیت q23.31 قرار دارد که به عنوان یک ژن سرکوب کننده تومور از طریق اثر پروتئین فسفاتاز آن عمل می کند. این فسفاتاز در تنظیم چرخه سلولی دخیل است و سلول ها را از رشد و تقسیم بیش از حد به سرعت جلوگیری می کند و هدف بسیاری از داروهای سرطانی است (۱۲-۱۵). *AKT1* روی کروموزوم ۱۴ در موقعیت q32.33 قرار دارد که این ژن آنزیم کینازهای سریین/ترؤنین را کد می کند. *AKT1* برای انتقال سیگنال های پیشرفتی رشد بسیار مهم است، به احتمال زیاد از طریق گیرنده *IGF1* عمل می کند (۱۶). بنابراین از آنجایی که سرطان دهان یکی از شایعترین سرطان ها بوده و کروسین زعفران و دوکسوروبیسین در پیشگیری و درمان آن تاثیر زیادی داشته و باعث افزایش بیان ژن های آپوپتوز می شود، پس بررسی تاثیرات کروسین زعفران همراه با دوکسوروبیسین بر مسیر سیگنالینگ سلولی ژن *PTEN* و *AKT1* در رده ای سلول های سرطانی اپیدرمویید دهان انسان (KB) لازم و ضروری می باشد. بنابراین هدف از این پژوهش تاثیر کروسین زعفران به همراه شیمی داروی دوکسوروبیسین بر مسیر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز (PTEN/ *AKT1*) در رده سلول های سرطانی اپیدرمویید دهان انسان (KB) می باشد.

## مقدمه

سرطان ها از دلایل مهم مرگ و میر در جهان محسوب می شوند. طبق آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۸، دوازده میلیون و هفتصد هزار مورد جدید سرطان در جهان شناسایی شده و در همین سال هفت میلیون و ششصد هزار مرگ ناشی از سرطان رخ داده است. سرطان دومین علت مرگ و میر در جهان پس از بیماری های قلبی و عروقی به شمار می آید و سرطان دهان ششمین سرطان شایع آفایان و پانزدهمین سرطان شایع در میان خانم ها است که شامل تومورهای لب، زبان، لثه، کف دهان، کام سخت و نرم، لوزهها و غدد بزاقی می باشد (۱). آسیب DNA بوسیله رادیواکتیوها به طور قابل اهمیتی در توسعه سرطان ها موثر بوده، عوامل کاهش دهنده ای شکل گیری آن ها می باشند. نقش آنتی اکسیدان در پیشگیری و درمان سرطان ها توسط مطالعات بسیاری گزارش شده اند (۵-۲). آنتی اکسیدان ها در منابع مختلفی از غذاها یافت می شوند، می توانند در برابر سرطان ها اثر محافظتی داشته باشند. آنتی اکسیدان ها با کاهش رادیکال های آزاد در بدن، در پیشگیری از انواع سرطان ها نقش مهمی دارند (۶،۵،۲). پرکاربردترین بخش زعفران، چه برای مصرف روزانه غذایی و یا مصرف درمانی، کلاله آن است. ارزش درمانی کلاله خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی به نام های کروسین محلول در آب (مونوگلوكوزیل یا دیگلوكوزیلپلیاناسترها) و مشتقات آن که مسئول رنگ قرمز زعفران هستند، پیکروکروسین که مسئول طعم تلخ زعفران است و سافرانال که مسئول عطر و بوی زعفران است، می باشد (۷). تاکنون اثرات درمانی زیادی از زعفران در مطالعات دیده شده است که عمدۀ این اثرات مفید را به خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عصاره زعفران و اجزای فعال تشکیل دهنده آن نسبت می دهد (۸). دوکسوروبیسین یک آنتی بیوتیک از دسته آنتراسیکلین است که دارای فعالیت آنتی نئوپلاستیک بوده و در درمان سرطان یکی از فعالترین عوامل ضد سرطان در شیمی درمانی است (۹). زمینه ژنتیکی و محیطی از عوامل ایجاد سرطان ها در انسان می باشند. مطالعات بیانگر آن است اتیولوژی سرطان دهان چند عاملی بوده

pH=10.5 بهینه شده با ۱ M NaOH ) جایگزین گردید. سپس پلیت ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شیک (shake) گردیدند. سرانجام تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. زیست پذیری سلولی نسبی به صورت زیر:

$$\frac{A_{570}}{A_{570}} \times 100$$

محاسبه گردید. کل آزمایش به صورت سه تکرار انجام شد( ۱۹-۲۰). به ازای هر ۱ میلی لیتر حجم، ۲ میلی گرم پودر MTT را در بافر PBS حل کرده و با محیط به حجم رسانده شد. (غلظت محلول حاصل: 2mg/ml). رنگ آمیزی DAPI: برای این رنگ آمیزی، سلول های سرطانی در پلیت های ۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت مختلف دوکسوروبیسین تیمار شدند. بعد از گذشت ساعت های مختلف محیط کشت موجود در هر خانه به آرامی تخلیه گردید و ۲ بار هر کدام به مدت ۵ دقیقه با PBS ۳۷ درجه سانتیگراد شستشو شد. در مرحله بعدی PBS تخلیه شد و سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه با پارافرمالدهید ۴٪ (۵۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) در دمای اتاق فیکس گردیدند. سپس پارافرمالدهید تخلیه و ۲ بار با PBS شسته شد. برای نفوذ پذیر کردن سلول ها، سلول ها را با محلول ترایتون فوژن ۱٪ (۵۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم. محلول ترایتون تخلیه و ۲ بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو شدند. در ادامه برای رنگ آمیزی هسته، سلول ها را با رنگ DAPI به غلظت ۲ میکرو گرم بر میلی لیتر ۳۰۰ میکرو لیتر برای هر خانه) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم. سپس ۲ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو شدند. در نهایت زیر میکروسکوپ ایمونوفلورست برسی کردیم.

استخراج RNA: به منظور استخراج RNA، سلول ها توسط ترایزول لیز شدند. به طور خلاصه، ابتدا سلول های تیمار شده تحت تاثیر بافر ترایزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به داخل میکروتیوب های -free DNase/RNase متنقل شدند و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰

## روش کار

تهیه محیط کشت RPMI1640: ابتدا مقدار ۵۲/۵۰۰ گرم از پودر RPMI1640 وزن و داخل اrlen پنج لیتری ریخته شد. سپس ۱ گرم بیکربنات سدیم، به آنها اضافه گردید و با آب دیونیزه حجم را به ۴ لیتر رسانده و خوب بهم زده شد. سپس pH محیط را با دستگاه pH متر اندازه گیری میکنیم. pH با مستوی ۷/۲ تا ۷/۴ باشد.

در صورتیکه pH از این محدوده خارج بود، توسط سود و اسید HCl آنرا کالیبر میکنیم. سپس یک لیتر دیگر آب دیونیزه به محیط کشت اضافه شده سپس محیط کشت را توسط دستگاه پمپ ایجاد فشار مثبت با فیلتر ۰/۲۲ میکرون زیر اتاق که هود بیولوژیک تحت شرایط کاملاً استریل فیلتر نموده و سپس داخل شیشه استریل تخلیه می کنیم. این محیط را در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می شود.

محیط کشت کامل نیز به صورت ۱۰٪ تهیه شد. بدین صورت که به ازای هر ۹۰ میلی لیتر محیط کشت ۱۰ میلی لیتر سرم FBS و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک اضافه گردید.

تست (Microculture Tetrazolium Test) MTT: اثر آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی، ۳-4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی انجام می شود. ابتدا تعداد مناسبی از سلول های KB در هریک از چاهک ها کشت داده می شوند (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) بعد از ۲۴ ساعت چاهک ها کنترل شده و مقدار مناسبی از دوکسوروبیسین به چاهک ها افزوده می شود. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرو لیتر محیط تازه و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (۲ میلی گرم در میلی لیتر حل شده در PBS) جایگزین می شود. سلول تیمار نشده به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرو لیتر بافر سورنسون (گلابیسین ۰/۱ M Nacl ، ۰/۱ M NaCl

RNA استخراج شده، cDNA سنتز شود. RNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (reverse transcriptase) به cDNA تبدیل می‌شود. برای این منظور از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase ساخت شرکت Thermo Fisher استفاده شد. ابتدا به یک میکروتیوب استریل و total RNA، nuclease-free، ۱ میکرولیتر از RNAse-free، ۱ میکرولیتر از پرایمر dT oligo و ۱۰/۵  $\mu\text{g}/\text{ml}$  میکرولیتر از آب RNase-free، اضافه گردید. سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  قرار داده ۵X و سپس روی یخ قرار گرفت. همزمان مواد Ribolock Reaction Buffer به مقدار ۴ میکرولیتر، dNTP به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، RNase Inhibitor به مقدار ۰/۵ RevertAid M-MuLV Mix به مقدار ۱ میکرولیتر و Reverse Transcriptase به مقدار ۱ میکرولیتر در یک میکروتیوب nuclease-free دیگر ریخته شدند. در نهایت محتویات میکروتیوب دوم به میکروتیوب اول اضافه شده و ۶۰ دقیقه در دمای  $42^{\circ}\text{C}$ ، ۱۰ دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ ، در دستگاه thermal cycler قرار داده شد. در نهایت نمونه‌های cDNA سنتز شده در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند.

طراحی پرایمر: پرایمر مورد استفاده با نرم افزار 7 Oligo طراحی و سپس توسط شرکت بیونر سنتز شدند.

تحلیل آماری: محاسبه ی سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه انجام شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژن PTEN/AKT و GAPDH با استفاده از مقدارهای CT محاسبه شد. بیان ژن نسبت به بیان ژن GAPDH اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط کالیبراتور داخلی (نمونه‌های کنترل هر آزمایش) استاندارد سازی شدند. مقدار تغییر یافته بیان ژن PTEN/AKT در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌ی کنترل که به وسیله‌ی

rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰٪ اضافه شد. سپس تیوب‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۷۰-۷۰ نگهداری شده، در روز بعد تیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۲۰۰ rpm دور سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی را دور ریخته، رسوب را در دمای ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با حل گردید. مقدار میکرولیتر آب تیمار شده به روش نوری و با استفاده از NanoDrop (Wilmington, DE, USA) گیری و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور بررسی کیفیت RNA های استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. بدین منظور ابتدا ژل ۲٪ ساخته شد و نمونه‌ها پس از بسته شدن ژل بر روی ژل لود شدند و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شدند. برای تهیه ژل، ۲ گرم پودر آگارز را وزن کرده و با ۱۲۰ سی سی TAE در یک بالن ته صاف به حجم رسانده شد. محلول حاصل تا ذوب شدن کامل پودر و شفاف شدن محلول حرارت داده شد. بعد از آنکه دمای ژل مذاب به نزدیک ۷۵ درجه رسید مقدار ۵ میکرولیتر رنگ سایبرگرین به آن اضافه گردید و خوب به هم زده شد تا رنگ به طور یکنواخت در ژل پخش شود. سپس ژل مذاب بر روی کاست ریخته شد. به منظور ایجاد چاهک مخصوص لود کردن نمونه بر روی ژل از شانه‌های مخصوص قبل از ریختن مایع ژل در کاست بهره گرفته شد.

سنتز cDNA: جهت اندازه گیری میزان تغییرات بیان ژن به روش Real-time PCR باقیستی از نمونه DNA استفاده شود. بدین منظور می‌باشد از روی نمونه

**جدول ۱** - پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام ژن	دما (درجه سانتیگراد)	توالی پرایمر
GAPDH	۶۳	F: 5'-AAGCTCATTCCCTGGTATGACAACG-3' R: 5'-TCTTCCTCTTGCTCTGCTGG-3'
PTEN	۶۰	F: 5'-TCCCAGTCAGAGGCGCTATG-3' R: 5'-CACAAACTGAGGATTGCAAG-3'
AKT1	۵۴	F: 5'-CATCACACCACCTGACCAAT-3' R: 5'-CTCAAATGCACCCGAGAAAT-3'

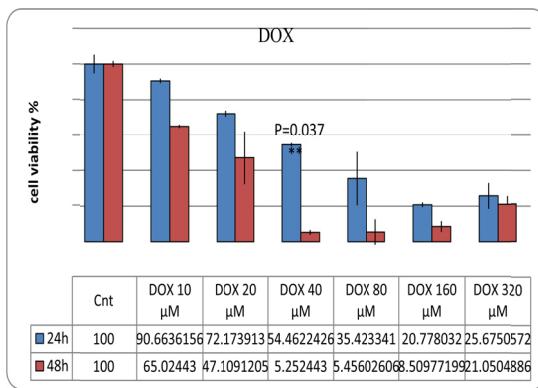
## جدول ۲- برنامه ترموسایکلر

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد سپیکل
فعال سازی اولیه	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
	۹۴	۱۵ ثانیه	
اتصال و جذب نوری	۵۴-۶۰-۶۳	۳۰ ثانیه	۴۰
	۷۲	۲۵ ثانیه	
طويل سازی	۷۲	۵ دقیقه	۱
طويل سازی نهائي	۷۲		

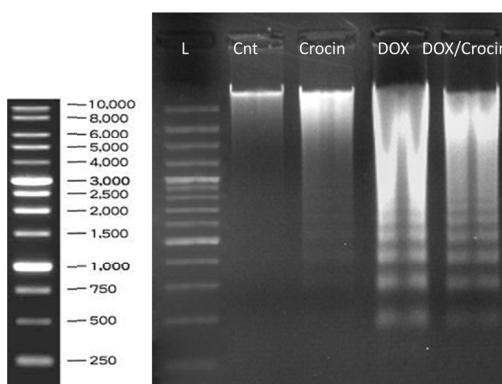
بدون تیمار قطعه قطعه شده و سلول ها وارد فاز آپوپتوز شدند.

نتایج بررسی میزان بیان ژن های آپوپتوز و زنده مانی با استفاده از Q-PCR:

### ۱- تعیین کیفیت RNA استخراج شده از نمونه های



شکل ۱- نمودار مربوط به سیتوتوکسیکیتی دوکسوروپیسین بر علیه سرطان دهان. حداقل سمیتی دوکسوروپیسین به منظور آپوپتوز سلول های سرطانی حدود ۴۰ میکرومولار می باشد(شکل ۱).



شکل ۲- ایجاد DNA Ladder به واسطه مرگ سلول ها در اثر آپوپتوز. در نمونه کنترل قطعه قطعه شدن مشاهده نمی شود اما در تیمار دوکسوروپیسین بعلت الfa آپوپتوز قطعه قطعه شدن DNA دیده می شود. همچنین مقدار کمی قطعه قطعه شدن در تیمار کروسین هم مشاهده می گردد. و اینکه کروسین و دوکسوروپیسین اثر هم افزایی نشان دادند.

میزان بیان ژن GAPDH نرمالیزه شده است، با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد. فرمول های محاسبات به شرح ذیل است:

$$\Delta CT = CT_{target} - CT_{reference}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{test\ sample} - \Delta CT_{control\ sample}$$

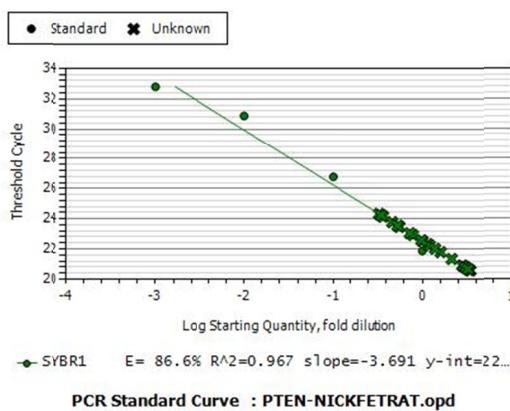
$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta CT}$$

## یافته ها

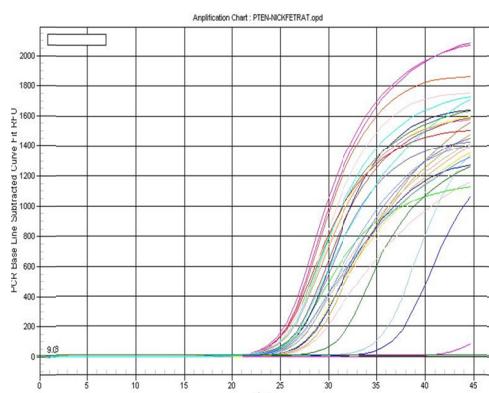
نتایج تست MTT: برای بررسی اثر سیتوتوکسیک دوکسوروپیسین و یافتن IC50 در سلول های KB تست MTT انجام گرفت، این تست سه بار برای هر یک از سلول ها تکرار شد. نتایج حاصل از آزمون MTT بر حسب غلظت به صورت نمودار به دست آمد. نتایج نشان داد که IC50 در سلول KB برای ۲۴ ساعت در حدود ۴۰ میکرومولار می باشد(شکل ۱).

نتایج تست DNA Ladder: پس از بدست اوردن IC50 دارو پلیت حاوی سلول توسط این میزان غلظت دوباره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد و پس از استخراج DNA، در ژل آگارز ۱٪ در مجاورت لدر ۱kb شده و نتایج آن در دستگاه ژل داک و زیر نور UV مشاهده گردید که به قرار زیر می باشد (شکل ۲).

تأثیر دارو بر آپوپتوز سلول های سرطانی: پس از تیمار دوکسوروپیسین به مقدار ۴۰ میکرومولار و کروسین زعفران به مقدار ۱۰۰۰ میکرومولار بر روی سلول های سرطانی به مدت ۲۴ ساعت سلول ها به سمت آپوپتوز حرکت نمودند و هیچ گونه مهاری توسط کروسین بر عملکرد دارو دیده نشد. شکل ۳ تصویر برداری میکروسکوپ نوری سلول های سالم و آپوپتوز یافته را نشان داده است. همچنین با استفاده از رنگ DAPI که هسته سلول را رنگ امیزی می کند، نشان داده شد هسته سلول ها در تیمار همزمان کروسین و دوکسوروپیسین به شدت بیشتر از هسته سلول های



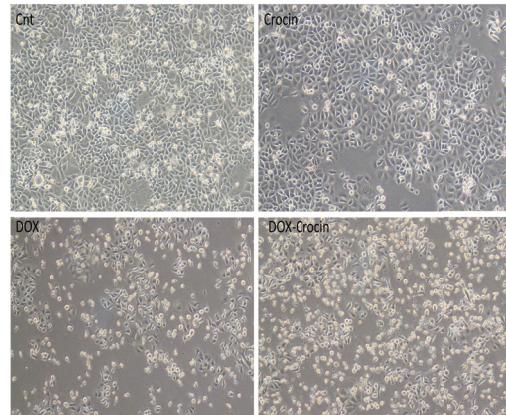
**شکل ۵**- منحنی استاندارد PCR. این منحنی نشانی بر این موضوع است که همراه با افزایش غلظت cDNA ها، نمونه های با غلظت های بیشتر در سیکل های پاپیتیک به حد آستانه رسیده اند و چون همه عوامل جز مقدار cDNA ها در نمونه ها ثابت است، مشخص می گردد که  $C_T$  های حاصل شده فقط به غلظت cDNA ها بستگی داشته که نشان دهنده صحت کار می باشد.



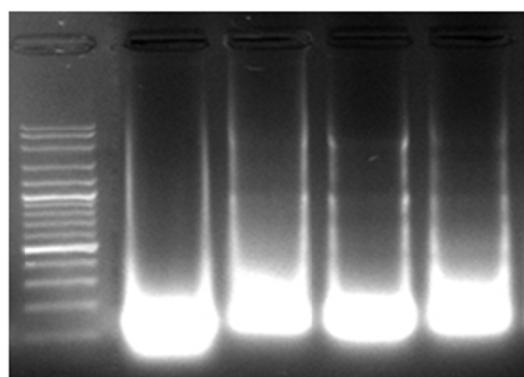
**شکل ۶**- منحنی تکثیر Real time PCR. برای هر تیمار آزمایش سه بار تکرار شد و نیز ۶ نمونه با رقت سازی بعنوان استاندارد تکثیر شدند. همانطور که در شکل دیده می شود،  $C_T$  نمونه ها تقریباً بین ۱۸ تا ۲۲ می باشد و نیز پیک های سیگنالی که نشان از تکثیر بدون اختلال واکنش می باشد.

قرار گرفته شده است، پروتئین BAX است. این پروتئین دارای نقش آپوپتوتیک است که بیان آن سبب القا آپوپتوز شده و عامل مهار تکثیر سلول است. پروتئین تولید شده توسط ژن *PTEN* پروآپوپتوز بوده و پروتئین تولیدی توسط AKT دارای اثرات ضد آپوپتوزی می باشد که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت.

نتیجه آنالیز داده های Q-PCR نشان داد هیچ تغییر معنی داری در تغییر بیان ژن akt وجود نداشت. اگر چه کمتر شدن میزان بیان آن مورد انتظار بود. با وجود آن



**شکل ۳**- تصویر میکروسکوپی سلول های تیمار شده و تیمار نشده



**شکل ۴**- نتیجه الکتروفورز در ژل آگارز RNA

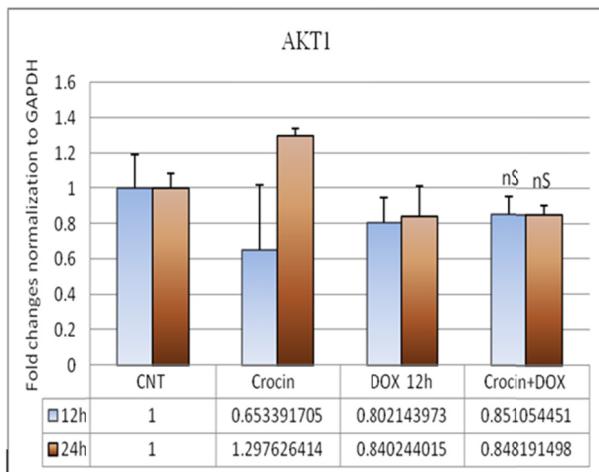
سلول سرطانی KB: کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ارزیابی شد. در این مرحله بعد از استخراج RNA تعداد ۵ نمونه به مقدار ۵ میکرومیتر در ژل ۰.۲٪ الکتروفورز با استفاده از لدر ۵۰ bp الکتروفورز شد و نمونه ها را در زیر نور UV در دستگاه ژل داک مشاهده شد. شکل ۴ نتیجه این الکتروفورز را نشان می دهد.

۲- انجام Q-PCR و آنالیز داده ها: پروتئین PTEN یک پروتئین کلیدی در مسیر آپوپتوز است این پروتئین در واقع یک پروتئین آنتی آپوپتوتیک است که افزایش بیان و فعالیت آن سبب مهار مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز شده واژ سوی دیگر عملکرد این پروتئین تاثیر بسزایی در مهار سلول هایی سرطانی دارد و سبب هدایت سلول ها به سمت آپوپتوز می شود. از پروتئین های دیگری که بیان ژن آن مورد بررسی

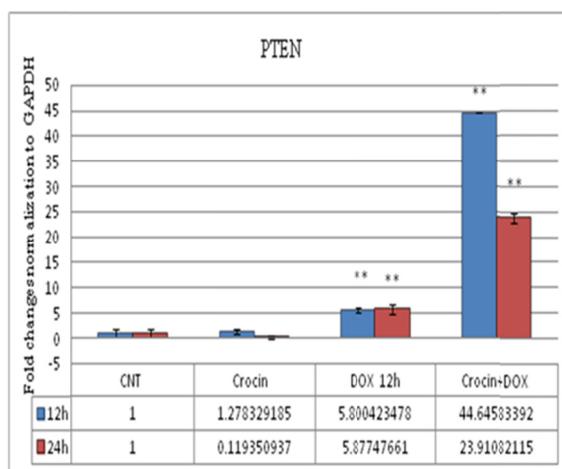
بسیار بیشتر در تیمار همزمان دوکسو با کروسین بدست آمد. جدول ۳ نتایج تجزیه داده های Real Time PCR و معنی دار بودن تغییر بیان ژن های مورد مطالعه را نشان داده است.

ممکن است با فسفریلاسیون و نه با تغییر بیان این پروتئین در داخل سلول تنظیم گردد.

اگرچه ژن *PTEN* در تیمار سلول ها با شیمی دارو افزایش پیدا نموده است اما نتایج نشان داد افزایش



**شکل ۷**- میزان بیان ژن *AKT1*، در مدت زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت در نمونه های سلول KB که تحت تیمار های مختلف قرار داشتند. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد و  $P < 0.05$  معنی دار (\*) در نظر گرفته شد. هیچ تغییر معناداری در بیان ژن *AKT1* دیده نشد.



**شکل ۸**- میزان بیان ژن *PTEN* مدت زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت در نمونه های سلول KB که تحت تیمار های مختلف قرار داشتند. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد و  $P < 0.05$  معنی دار (\*\*) در نظر گرفته شد. تغییر معناداری در بیان ژن *PTEN* دیده شد.

**جدول ۳**- تجزیه داده های CT با استفاده از نرم افزار REST

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
GAPDH	REF	0.9931	1.000				
<i>PTEN</i> (48h, DOX-Cro)	TRG	0.98	23.91	0.001 - 1.031	0.001 - 832.013	0.022	UP
<i>AKT1</i>	TRG	1.0231	0.85	0.950 - 1.109	0.916 - 1,631,558.273	0.174	ns

Legend:

P(H1) - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference

نظر ساختار و مکانیسم متفاوت از یکدیگرند، مقاوم می شود و درنتیجه مقاومت به چندین دارو حاصل می شود (۲۳).

گزارشات زیادی نشان داده است مصرف انتی اکسیدانت ها تاثیر مثبتی در کاهش مقاومت دارویی نسبت به شیمی دارو دارند. خانم ایلقمی و هکاران در سال ۲۰۱۹ به خوبی مصرف انتی اکسیدانت ها در کاهش مقاومت دارویی و همچنین کاهش اثرات جانبی دارو بصورت سیستماتیک از تحقیقات مختلف در طی مقاله ای توضیح داده است (۲۲) اما پیشنهاد داده است که این تحقیقات کافی نیست و باید تحقیقات بیشتر در این مورد انجام بگیرد. بهمین تحقیق حاضر در مورد نقش کروسوین زعفران در کاهش مقاومت دارویی دوکسوروبیسین در سلول های سرطانی دهان می باشد. شیمی دارویی که در این تحقیق جهت بررسی اثرات ضد سرطانی انتخاب شده دوکسوروبیسین نام دارد و مروری بر مقالات منتشره نشان می دهد که این دارو با وجود استفاده روتین مقاومت دارویی پیدا کرده است. از این دارو جهت درمان انواع تومورها بویژه تومورهای خوش خیم دهان و زخم های التهابی ناشی از شیمی درمانی که در دهان ایجاد شده و ... توصیه شده است. همچنین در این پایان نامه انتی اکسیدانتی گیاهی بنام کروسوین مشتق شده از زعفران نیز مورد استفاده قرار گرفت.

برای رسیدن به این هدف، سلول های سرطانی دهان، KB بررسی شدند. در ابتدا سلول ها در معرض دارو قرار گرفتند و بررسی اثرات سایتو توکسیک اولین قدم جهت بررسی بیولوژیک سلول ها شناخته شده است. تست بررسی پرولیفراسیون سلولی، MTT یک روش راحت و کمی جهت بررسی پاسخ جمعیت سلولی به فاکتورهای خارجی فراهم می کند. جهت انجام این تست، غلظت های مختلف عصاره در زمان های ۱۲ و ۲۴ ساعت روی سلول ها قرار داده شدند. همانطور که در بخش نتایج آورده شده است تفاوت قابل توجهی بین بقای سلولی نمونه کنترل و سلول هایی که در برابر دارو و کروسوین قرار گرفتند در رده سلولی نرمال KB وجود داشت.

جهت بررسی اولیه تاثیر دوکسو و اثرات تیمار همزمان کروسوین بر رده های سلولی تست ladder DNA انجام

## بحث و نتیجه گیری

سرطان یک مشکل کلینیکی جدی است که صدمات اقتصادی و اجتماعی زیادی به سیستم سلامت وارد می کند. این بیماری همچنین پس از بیماری های قلبی-عروقی به عنوان دومین بیماری مرگبار در کشورهای در حال پیشرفت می باشد. با وجود این که تکنیک های تشخیص مولکولی پیشرفته بسیاری داشته اند، هنوز هم بیماری سرطان میلیون ها نفر را در سراسر جهان درگیر کرده است. در این میان سرطان دهان ششمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای در حال توسعه می باشد (۲۱). امروزه سه روش رایج برای درمان سرطان دهان وجود دارد که شامل شیمی-درمانی، جراحی و رادیوتراپی می باشد که هر کدام با عوارضی که دارند، کیفیت زندگی و بقای این بیماران را تحت تاثیر قرار می دهند. در کنار این درمان ها بسیاری از بیماران از درمان های جایگزین و کمکی به همراه این روش ها جهت تسکین بیماری و عوارض ناشی از درمان ها استفاده می کنند مانند انتی اکسیدانت تراپی (۲۲).

بسیاری از سرطان ها در طی درمان با داروهای شیمی درمانی نسبت به اثرات درمانی داروی مصرفی، مقاوم می شوند. تومورها ممکن است به طور ذاتی و قبل از شیمی درمانی به داروها مقاوم باشند یا در طول درمان با داروها این مقاومت را کسب کنند. علاوه بر این، در فرآیند کسب مقاومت، تومور ممکن است به طیف وسیعی از درمان ها مقاومت نشان دهد که همین عامل در نهایت منجر به شکست درمان ببیش از ۹۰ درصد بیماران سرطانی در مرحله متاستاز می شود (۲۳). به نظر می رسد که تغییرات ژنتیکی تومور و نیز متفاوت بودن ساختار ژنتیکی بیماران، تغییرات اپی ژنتیکی و عوامل محیطی تومور، همگی در مکانیسم پیچیده ای مقاومت به داروی سرطانی نقش دارند (۲۴). از آن جایی که بافت سرطانی اجتماعی از سلول های مختلف می باشد، معمولا در یک بافت سرطانی شیمی درمانی شده، بیش از یک مکانیسم در مقاومت دارویی موثر می باشد. این مکانیسم ها به صورت مجزا از یکدیگر و یا به صورت هم افزایی منجر به مقاومت دارویی می شوند که در آن سلول به انواع داروهایی که از

باشد) (۲۷). اما در مطالعه ما هیچ افزایش و کاهشی در این ژن نداشتیم. مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مقاله ای تحت عنوان، بررسی اثربخشی دوکسوروبیسین در تکثیر اثربخشی نشانگرهای MCM3 و Ki-67 عنوان کردند، دوکسوروبیسین یکی از فعالترین عوامل ضد سرطان در شیمی درمانی می باشد) (۲۸). و در مطالعه ما نیز اثر ضد سرطانی دوکسوروبیسین ثابت شد. در تحقیقی تحت عنوان بررسی اثر سمی کروسین بر رده سلولی MDA-MB-468 برا اساس القای آپوپتوز و تغییرات نشانگرهای تنش شبکه آندوپلاسمی و اتوفازی توسط حیدرزاده و همکارانش در سال ۹۶ صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که کروسین به صورت واپسی به دوز و زمان، موجب مرگ رده سلولی MDA-MB-468 شد (۲۹). در مطالعه ای که توسط وضیفیان و همکارانش در سال ۲۰۱۷ بر روی بررسی سمیت سلولی و آپوپتوز ناشی از رادیوتراپی در سرطان سینه و سرطان گردن (HN-5) انجام شد، این پژوهش نشان داد که کروسین می تواند در سلول های بد خیم HN-5 در یک زمان و از طریق واستگی به غلظت سلول کاهش یابد. همچنین کروسین حساسیت پرتوی و مرگ سلولی را افزایش می دهد (۳۰). بنابراین استفاده از کروسین نه تنها اثر داروی دوکسو را کاهش نمی دهد، بلکه افزایش می دهد.

نتایج ما نشان داد که داروی دوکسوروبیسین دارای اثرات سایتوکوسیسیته روی سلول های سرطانی دهان، KB می باشد و کروسین نیز در اثر بخشی آن اثر سینرژیتیکی دارد. کروسین نه تنها اثر ضد سرطانی و آنتی اکسیدانتی دارد بلکه می تواند همزمان هم اثر جانبی شیمی دارو را کاهش دهد و هم اثر ضد سرطانی آن را افزایش دهد.

## تقدیر و تشکر

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۷۱۰۱۰ و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد اهر می باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می نمایند.

شده است. در این تست با استفاده از الگوی Ladder می توان وجود آپوپتوز را بررسی کرد. با بار گذاری DNA استخراج شده از سلول های KB که ۲۴ ساعت در برابر درو قرار گرفته اند بر روی ژل آگارز الکتروفورز، قطعات DNA بررسی شد.

جهت مطالعه مکانیسم اثر دارو و کروسین بر روی سلول های سرطانی دهان KB از متدهای RT-PCR استفاده شد که ژن های مهمی شامل تعدادی ژن های کلیدی که در آپوپتوز نقش دارند استفاده شد. از جمله ژن های منتخب در این مطالعه، *PTEN*, *AKT1*, *MAPK* می باشد که نقش مهمی در پاتوژن نوپلاسم دارند. افزایش سریع در سطح پروتئین *AKT1* سبب میانجی گری پاسخ های مختلف سلولی شامل القا GI و بازسازی DNA آسیب دیده و مهار آپوپتوز می باشد (۲۴).

ژن های دیگری نیز جهت بررسی مسیر آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان این گروه ژن ها برخی در تنظیم (pro-apoptotic) *PTEN* یا (anti-apoptotic) *MAPK*) اثر دارند. در واقع نسبت پرو و آنتی در هر سلول نشانه های بقا یا آپوپتوز را ظاهر کند (۲۵) یک ژن از هر زیر گروه انتخاب شد و جهت بیان mRNA *PTEN* از گروه pro-apoptotic انتخاب آنالیز شد. ژن *PTEN* از گروه pro-apoptotic انتخاب شد در سلول هایی که بیان ژن *PTEN* افزایش یابد به معنی ورود سلول به مسیر آپوپتوز می باشد در نتایج حاصله بیان ژن *PTEN* افزایش داشته است که نشان دهنده افزایش بیان این ژن پروآپوپتویک می باشد. *AKT1* که یک ژن آنتی آپوپتویک می باشد نیز جهت آنالیز انتخاب شد که عدم افزایش بیان این ژن حاکی از ورود سلول به مسیر آپوپتوز می باشد. نتایج این تحقیق با نتایج قبلی مطابقت دارد. بطوریکه میلاجردی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مقاله ای تحت عنوان، تاثیر سمیت سلولی کروسین و کروستین در سلول های نرمال و سرطانی گزارش کردند: مهمترین نقش آنها در مهار سلول های سرطانی به خاطر خاصیت آنتی اکسیدانی آنها می باشد که موجب مهار رادیکال های آزاد می شود (۲۶). جرمن و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مقاله ای تحت عنوان، بیان پروتئین COX-2 با استفاده از AKT از طریق مسیر NF-KB گزارش کردند: جهش در ژن AKT یکی از عامل مهم در ایجاد سرطان می

## References

1. Mohammadi AS, Mansouri B, Chakobidi K and baradaran B. Evaluation of the Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of Agrobacteria officinalis on Oral Cancer of KB Cell. Urmia Med J. July 2016; 27 (4): 257-265. [Persian]
2. Pandey Sh. Vitamin C. department of biochemistry, k. g. medical university, Lucknow, 2015.
3. Um Hd. bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. Oncotarget. 2016 Feb 2;7(5):5193-203.
4. Dosunmu Y and Owusu-Apenten R. Effects of Ascorbic Acid, Dehydroascorbic Acid and Methotrexate on Breast Cancer Cell Viability. J Appl Life Sci Int. 2017;14(2).
5. Murugan K and Lyer V. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, Gracilaria edulis and Enteromorpha lingulata, from Chennai Coast. Int J Cancer Res. January 2012; 8(1):15-26 .
6. Yin Yin Ch. Antioxidant and antiproliferative activities of several marine organisms from the west coast of Malaysia. Faculty of Medicine University of Malaya Kuala Lumpur, 2016.
7. BJavadi B, Sahebkar A, and Emami SA. A Survey on Saffron in Major Islamic Traditional Medicine Books. Iran J Basic Med Sci. 2013;16:1-11. [in Persian]
8. Milajerdi A, Djafarian K, Hosseini B. The toxicity of saffron (*Crocus sativus L.*) and its constituents against normal and cancer cells. J Nutr Intermed Metab. 2016. [Persian]
9. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, CorreiaS, OliveiraPJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. Curr Med Chem. 2009, 16: 3267-3285.
10. Sijmons R. Clinical Genetics of Cancer. Hered Cancer Clin Pract. 2018;16(1):A1.
11. Emery. Elements of medical genetics. 2017.
12. Asoudeh-Fard A, Barzegari A, Dehnad A Bastani S, Golchin A and Omidi Y. Lactobacillus plantarum induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signaling pathways. BioImpacts. 2017; 7(3):193-198. [Persian]
13. Demiray A, Akca H, and Urganci B. The Effect of PTEN on Apoptosis in NSCLC Cell Line. Proceedings. 2018,2(25),1562.
14. Yamada KM and Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. J Cell Sci. 2001 Jul;114(Pt 13):2375-82.
15. Wu ZX, Li D, Song TB and Zhang XT. Overexpression of PTEN Suppresses Growth and Induces Apoptosis by Inhibiting the Expression of Survivin in Bladder Cancer Cells. Tumor Biol. February 2007; 28(1):9-15 .
16. Sangawa A, Shintani M, Yamao N Kamoshida Sh. Phosphorylation status of Akt and caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7(6): 3312–3317 .
17. Kim GY, Park SY, Jo A, Kim M, Leem SH, Jun WJ, et al. Gecko proteins induce the apoptosis of bladder cancer 5637 cells by inhibiting Akt and activating the intrinsic caspase cascade. BMB Rep. 2015;48(9):531-6.
18. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway. Mol Cancer. 2004;3:7. Published 2004 Mar 11.
19. Hamzeloomoghadam M, Esmaeili S, Fotoohi F, Naghibi F, Pirani A, Hajimehdipoor H. In vitro evaluation for cytotoxic activity of three Ferula species. Int J Pharm Sci Res. 2013 Jul 1;4(7):2673-6.
20. Tsai CH, Yang ChW, Wang JY, Tsai YF, Tseng LM, King KL, et al. Timosaponin AIII suppresses hepatocyte growth factor-induced invasive activity through sustained ERK activation in breast cancer MDA-MB-231 cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:421051.
21. Kademan D. Oral cancer. In Mayo Clinic Proceedings. 2007: Elsevier.
22. Ilghami R, Barzegari A, Mashayekhi MR, Letourneur D, Crepin M, Pavon-Djavid G. The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy. Nutr Rev. 2020;78(1):65-76.
23. Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev. 2008;34(4):p. 378-390.
24. Kabraji S, Sole X, Huang Y, Bango C, Sgroi D, Loda M, Ramaswamy S. AKT1 low quiescent cancer cells in ductal carcinoma in situ of the breast. NPJ Breast Cancer. 2019 Mar 21;5(1):1-3.
25. Lee YR, Chen M, Lee JD, Zhang J, Lin SY, Fu TM, et al. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. Science. 2019 May 17;364(6441):eaau0159.
26. Milajerdi M, Haghighatdoost F, Azadbakht L. Saffron (*Crocus sativus L.*) and its Crocin and Crocetin toxicity against normal and tumor cells: A systematic review. J Clin Excell. 2017. [Persian]
27. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway. Mol Cancer. 2004 Dec;3(1):7.
28. Etemad-Moghadam S, Fouladdel S, Azizi E and Alaeddini M. In vitro study on the effect of doxorubicin on the proliferation markers MCM3 and Ki-67. J BUON. 2013 Oct-Dec;18(4):1062-8.

[Persian]

29. Heydarzadeh H, Batayee SA, Abron SA, Mohaghegh M. Evaluation of the toxic effect of crocin on MDA-MB-468 cell line based on apoptosis induction, and changes of endoplasmic reticulum and autophagy stress markers. Biol Injur Res. Winter 1396; 20 (4): 51-37. [Persian]
30. Vazifedan V, Mousavi S H, sargolzaei J, Soleymanifard Sh, Fani Pakdel A. Crocin promotes apoptosis of human skin cancer cells by inhibiting the JAK/STAT pathway. Exp Ther Med. 2018Dec; 16(6): 5079-5084. [Persian]