

## Meme Kanseri (MCF-7) Hücrelerinde Krosinin İnflamasyon ve Oksidatif Stres Aracılı Apoptoza Etkileri

Ömer HAZMAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya AD. Afyonkarahisar.

e-posta: omerhazman@hotmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2702-6847>

Geliş Tarihi: 18.11.2021

Kabul Tarihi: 26.12.2021

### Öz

Krosin, safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin çiçek kısmındaki stigmalarının kurutulması ile elde edilen karotenoid yapılı bir bileşiktir. Sunulan çalışmada krosinin insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hattında sitotoksikite düzeyleri ile oksidatif stress, inflamasyon ve apoptoza etkileri belirlendi. MCF-7 hücrelerinde krosinin sitotoksitesi, MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile analiz edildi. Krosinin günlük maruziyette MCF-7 hücrelerindeki LD<sub>50</sub> dozu 1611 µg/mL, LD<sub>0</sub> dozu ise 20 µg/mL olarak belirlendi. MCF-7 hücrelerinde krosinin antioksidan ve inflamatuvar sisteme etkisini belirleyebilmek amacıyla dört farklı deneysel grup oluşturuldu. Deney gruplarından elde edilen hücre lizatlarında total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI), tümör nekrozis faktör (TNF) α, interferon (IFN) γ, interlökin 1 (IL1) β düzeyleri analiz edildi. Krosinin apoptoza etkilerini belirlemek amacıyla ise RT-PCR yöntemiyle apoptotik/antiapoptotik genlere (p53, Bcl-2, TRAIL1, TRAIL2, Bax) ait mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, krosinin MCF-7 hücrelerinde LD<sub>0</sub> ve LD<sub>50</sub> dozlarında proinflamatuvar stokin düzeylerini etkilemeksizin oksidatif stresi artırarak apoptozu uyardığı tespit edildi. Hücre kültürü çalışmaları ile belirlenen, krosinin MCF-7 hücrelerinde antikanserojen etkinliğinin, deney hayvanlarında oluşturulacak modellemeler ile doğrulanması, krosinin kanser tedavisinde olası yararlarını açıklamak adına yararlı olabilir.

### Anahtar kelimeler

Kanser; MCF-7 hücreleri; Krosin; inflamasyon; Oksidatif stres; Apoptoz

## Effects of Crocin on Inflammation and Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Breast Cancer (MCF-7) Cells

### Abstract

Crocin is a carotenoid compound obtained by drying the stigmas of the flower part of the saffron (*Crocus sativus* L.) plant. The present study determined the effects of crocin on cytotoxicity, oxidative stress, inflammation, and apoptosis in human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell lines. The cytotoxicity of crocin in MCF-7 cells was analyzed by the MTT (3-4,5-dimethyl-thiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The LD<sub>50</sub> dose of crocin in MCF-7 cells at daily exposure was determined as 1611 µg/mL, and the LD<sub>0</sub> dose was determined as 20 µg/mL. In order to determine the effect of crocin on the antioxidant and inflammatory system in MCF-7 cells, four different experimental groups was formed. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), tumor necrosis factor (TNF) α, interferon (IFN) γ, interleukin 1 (IL1) β levels in cell lysates obtained from experimental groups were analyzed. In order to determine the effects of crocin on apoptosis, mRNA expression levels of apoptotic/antiapoptotic genes (p53, Bcl-2, TRAIL1, TRAIL2, Bax) were analyzed by the RT-PCR method. When the obtained data were evaluated, it was determined that crocin stimulated apoptosis in MCF-7 cells by increasing oxidative stress without affecting proinflammatory stock levels at LD<sub>0</sub> and LD<sub>50</sub> doses. Confirmation of the anticarcinogenic activity of crocin in MCF-7 cells, determined by cell culture studies, with models to be created in experimental animals may be helpful to explain the possible benefits of crocin in cancer treatment.

### Keywords

Cancer; MCF-7 cells; Crocin; Inflammation; Oxidative stress; Apoptosis

## 1. Giriş

Kadınlar arasında yaygın görülmekte olan meme kanseri, 2020 verilerine göre dünyada en sık görülen kanserler arasında birinci sıraya yükselmiştir (Sung *et al.* 2021). Meme kanseri ve diğer kanser türlerinin yaygınlığının her geçen gün artıyor olması, bu konuda tedaviye katkı sunabilecek her türlü araştırmayı daha da önemli kılmaktadır. Bu nedenle tedaviye yönelik araştırmalar bilim dünyasının ilgi odağındadır. Hem meme kanserinde hem de diğer kanser türlerinin tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin ağır yan etkileri vardır. Bu nedenle yan etkileri azaltabilecek veya daha az yan etkileri olabilecek alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda antioksidanların anti-kanserojen etkinliklerinin araştırılması da önem arz etmektedir.

Krosin, tarih boyunca birçok toplum tarafından farklı hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılagelen safran (*Crocus sativus L.*) bitkisinden elde edilen karotenoid yapıda bir bileşiktir. Bu bileşik safran bitkisinin çiçeklerinde bulunan stigmalarının kurutulması ile elde edilir (Hoshyar and Mollaei 2017). Yapılan araştırmalar krosinin her geçen gün yeni bir farmakolojik etkisinin olabileceğini göstermektedir. Bu etkiler arasında antioksidan (Assimopoulou *et al.* 2005, Adalı vd. 2016) anti-platelet (Liakopoulou-Kyriakides and Skubas 1990), nöroprotektif (Soeda *et al.* 2001), antidiyabetik (Kianbakht and Hajiaghae 2011, Shirali *et al.* 2012; Rajaei *et al.* 2013), anti-hiperlipidemik (Lee *et al.* 2005), antiobezite (Hazman *et al.* 2016), antiapoptotik (Ozkececi *et al.* 2016) ve anti-kanserojenik (Garcia-Olmo *et al.* 1999, Chryssanthi *et al.* 2007) etkinliği gösterilmiştir. Sunulan çalışmada ise krosinin MCF-7 hücre hattında oksidatif stress veya inflamasyon aracılı apoptoza etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Araştırma üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada krosinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik dozları belirlenmiştir. Deney gruplarına uygulanacak olan krosin dozları belirlendikten sonra deney grupları oluşturulmuştur. İkinci aşamada her grupta en az 5 flask olacak şekilde hücreler üretilmiş, deney gruplarına, belirlenen krosin dozları uygulanmıştır.

Deney gruplarına yapılan uygulamalardan sonra laboratuvar analizlerinde kullanılmak üzere hücre lizatları elde edilmiştir. Üçüncü aşamada ise elde edilen numuneler kullanılarak MCF-7 hücre hattında krosinin oksidatif stress, inflamasyon ve apoptoza etkilerini belirlemeye yönelik laboratuvar analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı ve Besiyerinin Hazırlanması

Krosininin meme kanserinde inflamasyon, oksidatif stress ve apoptoza etkilerinin belirlenmesi amacıyla MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri sıvı azot içinde Anadolu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir. MCF-7 Hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besiyeri; %10 (v/v) Fetal bovine serum (Copricorn), %1 (v/v) penisilin streptomisin (Sigma), %1 (v/v) sodyum piruvat (Sigma), %1 glutamin (Sigma), % 87 oranında high glukoz DMEM (Sigma) içerecek şekilde hazırlandı. Hücrelere uygulamalar yapıldıktan sonra tüm inkübasyonlar, steril ortamda % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C olacak bir ortamı sürekli sağlayan ve dengede tutan CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Panasonic) gerçekleştirildi.

Krosinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksikite düzeyleri 96 kuyucuklu mikropate kullanılarak MTT yöntemi ile belirlendi. MTT çözeltisi, uygun pH pH=7,4) ortamında PBS (Phosphate buffer saline) içinde 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde MTT tuzunun (Sigma) çözülmesiyle hazırlandı.

Krosin (Sigma) sitotoksitesini belirlemek için 0,1-6,4 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda farklı 7 doz tercih edildi. Kontrol grubu olarak planlanan vellelere ise krosinin çözücüsü olarak kullanılan besiyeri eklendi. Hücrelere krosin uygulandıktan 24 saat sonra her bir kuyucuğa, kuyucuk hacminin %10'u oranındaki hacimde MTT çözeltisi ilave edildi. Hücreler bu şekilde 2-4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTT'nin etkisiyle canlı hücrelerde formozan kristalleri oluştu. Kristalleri etkilemeden vellerdeki sıvı kısım pipetle çekildi. Kuyucuklardaki formozan kristalleri üzerine 200 µL DMSO eklendi. Böylelikle kuyucuklardaki formozan kristallerinin tekrar çözünmesi sağlandı. Örneklerin optik dansiteleri 540 nm'de, ELISA mikropate

okuyucu (Biotek, ELx800) kullanılarak belirlendi. Krosin uygulanmayan deney grubunun (kontrol grubu) hücre canlılığı oranı % 100 kabul edilerek, her bir dozun hücre canlılığına etkisi ( %)Hücre Canlılığı =  $[(100 * \text{Absorbans}_{\text{numune}}) / (\text{Absorbans}_{\text{kontrol}})]$  ) hesaplandı. Her bir doza ait hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi (Ersin vd. 2016, Ulaşlı vd. 2013).

Uygulamalar sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını % 50 azaltan krosin dozu, LD<sub>50</sub> dozu şeklinde ifade edildi. MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını etkilemeyen krosin dozu ise LD<sub>0</sub> dozu olarak kabul edilerek çalışmalarda kullanıldı. Uygulamada kullanılan MCF-7 hücrelerindeki etkili olan krosine ait lethal dozlar (LD<sub>0</sub>, LD<sub>50</sub> gibi), her bir dozun hücrelerde oluşturduğu % canlılık oranları kullanılarak belirlendi. Lethal dozların hesaplanmasında Epa Probit Analysis Program (Version 1.5) adlı yazılım kullanıldı. Sunulan çalışmada lethal dozlar belirlendikten sonra deney grupları oluşturularak uygulamalara geçildi. Çalışma kapsamında oluşturulan deney grupları Çizelge 1’de sunulmuştur. Deney gruplarına Çizelge 1’de ifade edilen uygulamaların tatbik edilmesi sonucunda elde edilen hücre lizatları kullanılarak biyokimyasal analizler, hücrelerden izole edilen total RNA’lar yardımıyla sentezi gerçekleştirilen cDNA’lar kullanılarak ise analizi planlanan ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi.

**Çizelge 1.** Çalışmada kullanılan deney grupları

Gruplar	Yapılan Uygulamalar
Grup 1 Kontrol Grubu	Krosin besiyerinde çözüldüğü için, diğer gruplara krosin uygulandığı zamanlarda aynı hacimde besiyeri uygulanan grup
Grup 2 LD <sub>0</sub> dozu tedavi grubu	MTT analizleri sonucunda belirlenen LD <sub>0</sub> dozunda (20 µg/mL) krosin uygulanan grup
Grup 3 LD <sub>50</sub> dozu tedavi grubu	MTT analizleri sonucunda belirlenen LD <sub>50</sub> dozunda (1611 µg/mL) krosin uygulanan grup
Grup 4 Yüksek doz tedavi grubu	MTT analizleri sonucunda belirlenen LD <sub>50</sub> dozunun iki katı oranda (3200 µg/mL) krosin uygulanan grup

## 2.2 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Deney gruplarına ait hücrelere Çizelge 1’de ifade edilen uygulamalar tatbik edildikten sonra hücreler 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda flask tabanında adherent bir şekilde çoğalmış olan hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon ve detripsinizasyon işlemleri uygulandı. Hücreler besiyeri ile 2 yıkama sonunda tripsinden arındırıldıktan sonra falkon tüpün tabanında kalan hücre peleti PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası hücrelerin üzerine 500 µL lizis tamponu (içerisinde %1 triton-X-100, ve %8 proteaz inhibitör kokteyli içeren PBS çözeltisi) eklendi. Pipetaj yapıldı. Sonrasında buz içinde sonikatör (Binder) kullanılarak ultrasonik ses dalgalarının etkisiyle 20 saniye süreyle hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. 20 saniyelik sonikasyon işleminden sonra 40 saniye süreyle beklendi. Sonikasyon işlemine bu şekilde 10 tur devam edildi. Böylelikle numunelerde bulunan hücre ve organellerine ait zarların parçalanarak, hücre içi sıvıların hücre lizatına geçmesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanan numuneler 10 dakika süre ile +4 °C’de 8500 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizlerde hücre lizatı olarak kullanıldı. Analizlerde lizis tamponu blank olarak kullanıldı. Yapılan biyokimyasal analizlerle, numunelerde total protein düzeyleri, oksidatif stres parametreleri ve proinflatuar stokin seviyeleri belirlendi (Hazman vd. 2021).

## 2.3 Total Protein Analizi

Elde edilen hücre lizatlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilen analizlerden elde edilen sonuçların hesaplanabilmesi amacıyla her bir numunenin total protein seviyesi belirlendi. Numunelerin total protein seviyeleri ticari kit (Fluka) kullanılarak multiplate okuyucu (Biotek ELx-800) yardımıyla 595 nm’de ölçüldü. Bradford (1976) yöntemine göre çalışan kitle birlikte tedarik edilen standart kullanılarak seri dilüsyonlarla hazırlanan 125-4000 µg/mL konsantrasyonu aralığındaki 6 standart hazırlandı. 96’lık mikroplate üzerinde belirlenen kuyucuklara iki tekrarlı olacak şekilde 6 µL hacminde standartlar ve total protein içeriği bilinmeyen

numuneler eklendi. Bunların üzerine fazla zaman geçirmeden kitle birlikte tedarik edilen Coomassie brilliant blue reaktifi multikanal pipetle 300 µL hacminde eklendi. Kuyucuklarda bulunan çözeltilerin absorbansları ve kalibrasyon eğrisi aracılığı ile de total protein seviyeleri belirlendi. Elde edilen total protein düzeyleri hücre lizatlarında analizi gerçekleştirilen oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili parametre düzeylerinin hesaplanmasında kullanıldı.

#### **2.4 Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeyleri Analizi**

Son yıllarda bir ortamda bulunan farklı antioksidanların toplam etkisinin belirlenebilmesi için özel yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde ortama katılan reaktif bir türün, yine ortamda bulunan antioksidanlar tarafından indirgenme/inaktif etme süreci takip edilerek numunenin antioksidan kapasitesi belirlenmeye çalışılmaktadır. Sunulan çalışmada da bu prensiple çalışan ticari bir kit (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak TAS düzeyleri belirlendi. Öncelikle kitle birlikte temin edilen standartlar yardımıyla 5 farklı konsantrasyonda (0,125-0,25-0,5-1-2 mmol trolox) standart çözeltisi hazırlandı. Sonrasında kalibrasyon eğrisi hazırlanarak numunelerdeki TAS düzeyleri belirlendi. Seviyeleri belirlenen TAS düzeyleri (mmol Trolox Equivalent/L) her bir numunenin kendi total protein seviyesine bölünerek mmol Trolox Equivalent/g-protein şeklinde ifade edildi.

#### **2.5 Total Oksidan Statü (TOS) Düzeyleri Analizi**

Numunelerde TOS düzeylerini belirleyebilmek için, oksidatif strese sebep olabilecek türlerin toplam etkisini belirlemek üzere kullanılan ticari bir kit (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanıldı. Kit protokolünde ifade edilen uygulamalar gerçekleştirildikten sonra numunelerin ve kitle birlikte temin edilen standardın absorbans değerleri belirlendi. Bu absorbans değerleri yardımıyla kit protokolünde verilen formül ( $TOS = \frac{(\Delta Abs_{numune})}{(\Delta Abs_{standart})} * 20$ ) aracılığı ile numunelerdeki TOS seviyeleri hesaplandı. Belirlenen TOS sonuçları µM hidrojenperoksit equivalent litre (µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L) olarak bulundu. Hesaplanan sonuçlar numunelerin kendi total protein seviyelerine

bölünerek normalize edildi. TOS düzeyleri µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./g protein şeklinde ifade edildi.

#### **2.6 Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi**

Bir ortamda bulunan oksidan ve antioksidan türlerin etkileri dikkate alınarak, ortamın oksidatif stres düzeyi (OSI) değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla ortamda bulunan oksidan türlerin toplam etkisi (TOS) ve antioksidan türlerin toplam etkisi (TAS) belirlendikten sonra bu veriler birbirlerine oranlanarak sonuca gidilmektedir. Sunulan çalışmada da TOS düzeyleri TAS düzeylerine bölünerek ( $OSI = \frac{TOS}{TAS} * 100$ ) numunelerdeki oksidatif stress düzeyleri hesaplanmıştır (Hazman ve Ovalı 2015, Hazman ve Bozkurt 2015).

#### **2.7 İnflamatuvar Stokin (TNF-α, IL-1β ve IFN-γ) Seviyelerinin Belirlenmesi**

Krosinin MCF-7 hücrelerinde antiinflamatuvar etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, TNF-α, IL-1β ve IFN-γ seviyeleri hücre lizatlarında multiplate okuyucu cihazı (Biotek, ELx800) yardımıyla 540 nm'de spesifik ticari kitler (Sunred Biotech) aracılığıyla belirlendi. Elde edilen veriler, numunelerin kendilerine ait total protein konsantrasyonlarına bölündü. Böylelikle normalize edilen stokin seviyeleri ng/mg-protein veya pg/mg-protein olarak ifade edildi.

#### **2.8 RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

RNA izolasyonu amacıyla her bir deney grubu için 25'lik 5 flaska ekim yapıldı. Çizelge 1'de belirtilen uygulamalardan 24 saat sonra flasklardaki besiyerleri hücrelere zarar verilmeden alındı. Hücreler 37 °C PBS ile yıkandı. Sonrasında her bir flaska RNA izolasyonu için tedarik edilmiş olan ticari kitin (Gen Matrix) içeriğinde bulunan lizis tampon çözeltisinden uygun hacimde eklendi. Steril hücre kazıyıcısı (Thermo, cell scraper) kullanılarak flask tabanındaki hücreler lize edildi ve flaskın bir köşesinde toplanarak homojenizasyon kolonlarına aktarıldı. Total RNA izolasyonu kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildikten sonra elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve kalitesi nanodropta (BioTek, Epoch 2) belirlendi. İzole edilen RNA'ların 260 nm ve

280nm'de elde edilen optik dansiteleri ( $OD_{260/280}$ ) oranı 1.7-2,2 arasında olan RNA'lar çalışmada kullanıldı (Hazman *et al.* 2018).

Elde edilen total RNA'lar kullanılarak komplementari DNA (cDNA) ticari kit (Thermo) yardımıyla sentezlendi. cDNA'ların kalitesi ve çalışıp çalışmadığı, Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile kontrol gen olarak  $\beta$ -Aktin aracılığıyla ve melting-curve protokolü uygulanarak belirlendi. Sonrasında RT-PCR yardımıyla p53, Bcl-2, TRAIL1, TRAIL2, Bax genlerine ait mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi. RT-PCR analizlerinde kullanılan ve analizi gerçekleştirilen genlere spesifik olan primerler (Çizelge 2) literatürdeki çalışmalar taranarak belirlendi (Ersin vd.. 2016, Ulaşlı vd. 2013).

**Çizelge 2.** Oligonükleotid primer dizileri ve RT-PCR programları

Gen	Primer Dizisi
$\beta$ -Aktin	F5'CATCGTCACCAACTGGGACGAC'3 R5'CGTGGCCATCTCTTGCTCGAAG'3
p53	F-5'CGGAGGTCGTGAGACGCTG'3 R5'CACATGTACTTGTAGTGGATGGTGG'3
Bax	F5'CGCCTCACTCACCATCTGGAA'3 R5'CCTCAAGACCACTCTTCCCA'3
TRAIL1	F5'GAGAAGTCCCTGCACCACGAC'3 R5'CCGAAAGTTCCTGGTTGCAC'3
TRAIL2	F5'TCCTTACCTGAAAGGCATCTGC'3 R-5'GTCGTTGTGAGCTTCTGTCCA'3
Bcl-2	F-5'CAGCTGCACCTGACGCCCTT'3 R5'CCCAGCCTCCGTTATTCTGGA'3

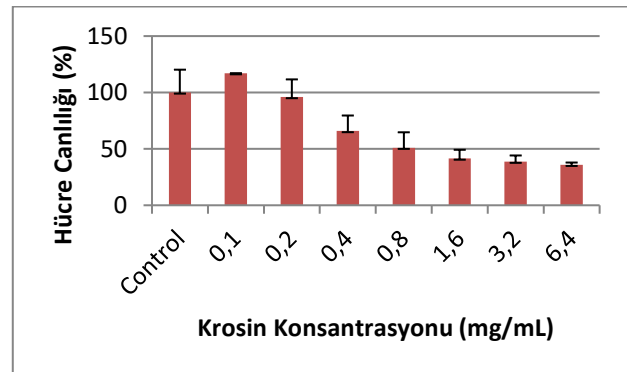
Çizelge 2'de sunulan primerlerden, her bir numuneden elde edilmiş olan cDNA için RT-PCR reaksiyonunda 100 ng düzeyinde kullanıldı. RT-PCR cihazında (Biorad CFX-96) gerçekleştirilen analizlerde her bir numunenin amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (Pfaffl 2001). Hesaplamalar REST 2009 yazılımı (Qiagen, Germany) kullanılarak yapıldı. mRNA ekspresyon düzeyleri misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı. Her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

## 2.9 İstatistik Analizler

Laboratuvar analizleri sonucunda derlenen ham veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olacak şekilde tanımlandı. Yapılan istatistiki değerlendirmelerde SPSS 18 yazılımı tercih edildi. İstatistiki değerlendirmeye, her bir parametreye ait verilerin normal dağılım durumunun belirlenmesiyle başlandı. Normal dağılım gösteren parametrelerde istatistiki fark olup olmadığı ANOVA testi ile belirlendi. Gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesinde ise post-test olarak Duncan testi tercih edildi. Normal dağılım göstermeyen parametrelerde gruplar arasında istatistiki fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile tespit edildi. Hangi gruplar arasında fark olduğu ise Man Whirney U testi ile belirlendi. Çalışmada kullanılan ilgili genlere ait gen ekspresyonu seviyeleri arasındaki istatistiki farklılıklar ise REST2007 (Qiagen, Germany) yazılımı kullanılarak belirlendi. İstatistiki düzeyde farklılık gösteren genlere ait ekspresyon düzeyleri grafiklerde (\*) işareti ile gösterildi.

## 3. Bulgular

MCF-7 hücrelerinde krosinin sitotoksitesini belirleyebilmek için 0.1- 6.4 mg/mL aralığındaki 7 farklı dozu kullanıldı. Krosinin 0.2 mg/mL ve daha yüksek dozlarda sitotoksitesinin arttığı görüldü. 1.6-6.4 mg/mL aralığındaki dozların ise yüksek sitotoksitesine sahip olabileceği belirlendi. MTT analizi verilerinden yola çıkılarak hazırlanan Şekil 1'de krosinin doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir.



**Şekil 1.** MCF-7 hücrelerinde krosinin sitotoksitesini

Elde edilen veriler bir istatistik programı (Epa Probit Analysis Program, Version 1.5) ile değerlendirilerek, krosinin MCF-7 hücrelerindeki günlük maruziyette akut ortalama toksik (LD<sub>50</sub>) dozu 1611.11 µg/mL, LD<sub>0</sub> dozu ise 20.17 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Sunulan çalışmada belirlenen lethal dozlar arasında yalnızca 2'si (LD<sub>0</sub> ve LD<sub>50</sub> dozları) kullanılmıştır. Bu dozların dışında yüksek doz krosin tedavi grubu olan 4. grupta yüksek doz olarak, krosinin LD<sub>50</sub> dozunun yaklaşık iki katı olan 3200 µg/mL krosin dozu kullanılmıştır.

**Çizelge 3.** Krosinin MCF-7 hücrelerinde etkili olan lethal dozları

Krosine ait lethal dozlar ve konsantrasyonları (µg/mL)	95% Confidence Limits (µg/mL)	
	Lower	Upper
LD <sub>0</sub>	20.17	94.78
LD <sub>5</sub>	72.76	226.09
LD <sub>10</sub>	144.21	368.34
LD <sub>15</sub>	228.84	523.16
LD <sub>50</sub>	1611.12	5279.85

### 3.1 Krosinin Oksidatif Stres ve İnflamasyona Etkileri

MCF-7 hücrelerinde krosinin 3 farklı dozu kullanılarak (LD<sub>0</sub>, LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> dozları), hem krosinin düşük dozlardaki etkinliği hem de yüksek dozlarda oksidatif stress ve inflamasyona etkileri tespit edilmeye çalışıldı.

Yapılan analizler sonucunda deney grupları arasında en yüksek TAS seviyeleri (0.781 mmol torolox equiv/g-protein) kontrol grubunda ölçüldü. Deney gruplarına LD<sub>0</sub> dozunda ve LD<sub>50</sub> dozunda (1.6 mg/mL) krosin uygulandığında TAS seviyelerinde düşüş olduğu ve bu düşüşün istatistiki düzeyde önemli bir fark oluşturduğu belirlendi (Çizelge 4). TOS verileri incelendiğinde ise kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında herhangi bir istatistik farklılık belirlenemedi. Oksidatif stress değerlendirilmesinde iyi bir yol gösterici veri olan OSI değerleri incelendiğinde ise oksidatif stres indeksi en düşük çıkan grup kontrol grubu, oksidatif stres indeksi en yüksek çıkan grup ise en yüksek krosin dozunun uygulandığı 4. grup olarak belirlendi.

**Çizelge 4.** Krosinin MCF-7 hücrelerinde oksidatif strese etkisi

Deney Grupları	TAS (mmol torolox equiv/g-protein)	TOS (µmol H2O2 equiv./g-protein)	OSI (Arbitrary Unit)
Grup 1 Kontrol grubu	0.78±0.08 <sup>c</sup>	10.2±0,9	1311.4±26.6 <sup>a</sup>
Grup 2 LD <sub>0</sub> dozu tedavi grubu	0.58±0.04 <sup>a, b</sup>	9.8±0.6	1396.9±304.5 <sup>b</sup>
Grup 3 LD <sub>50</sub> dozu tedavi grubu	0.70±0.10 <sup>a</sup>	9.1±1.4	1596.3±210.5 <sup>b</sup>
Grup 4 Yüksek doz tedavi grubu	0.61±0.09 <sup>b, c</sup>	9.7±0.7	1612.1±78.7 <sup>a, b</sup>
P değeri	0.001*	0.158**	0.022*

Veriler; ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

<sup>a, b, c</sup> ; Aynı sütünde verilen bir parametreye ait istatistiki farklılıklar (p<0.05) üst simge halinde harfle ile ifade edilmiştir. Aynı harflerden bir veya bir kaçını taşıyan gruplar arasında fark yoktur. Taşdığı harf farklı olan gruplar arasında ise istatistiki fark vardır. P değerinde \* işareti bulunan ve normal dağılım gösteren verilere parametrik testler uygulandı (ANOVA&Duncan). P değerinde \*\* işareti bulunan ve normal dağılım göstermeyen verilere ise nonparametrik testler uygulandı (Kruskal wallis & Man whitney U). Kısaltmalar; TAS:Total antioxidant status, TOS:Total oxidant status, OSI: Oxidative stres index.

Gruplar arasında istatistiki farklılıklar incelendiğinde ise LD<sub>0</sub> dozu uygulanan grup 2 ile LD<sub>50</sub> dozu uygulanan grup 3 OSI değerlerinin kontrol grubundan yüksek ve istatistiki olarak farklı olduğu belirlendi (Çizelge 4). Veriler incelendiği zaman en yüksek OSI değerine sahip olan 4. grubun kontrol grubundan istatistiki olarak farklılık göstermez iken, daha düşük OSI değerine sahip olan diğer grupların (grup 2 ve 3) kontrol grubundan istatistiki olarak farklılık gösterdiği belirlendi.

Bu verilerin bir çelişki oluşturduğu düşünülebilir. Çizelge 4 daha dikkatli incelenirse, özellikle de verilere ait standart sapmalar irdelenirse bu oluşan tezadı açıklamak daha kolay olacaktır. Çünkü kontrol grubuna göre istatistiki fark gösteren ama ortalama değeri çok yüksek olmayan 2. ve 3. grup verilerinin standart sapmaları çok yüksektir. Standart sapmalar dikkate alınarak hesaplar gözden geçirilecek olursa, aslında bu gruptaki numunelerden bazılarının en yüksek OSI değerlerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle grup 2 ve 3'te ortalama OSI değerleri 4. gruba göre yüksek çıkmaya da, kontrol grubuna göre istatistiki fark oluştuğu gözlenmiştir. Krosinin MCF-7 hücrelerinde inflamasyona etkileri incelendiğinde ise

deney grupları arasında herhangi bir istatistiki farklılık oluşmadığı belirlenmiştir (Çizelge 5).

**Çizelge 5.** MCF-7 hücrelerine krosinin inflamasyona etkileri

Deney Grupları	IL-1 $\beta$ (pg/mg-protein)	IFN- $\gamma$ (pg/mg-protein)	TNF- $\alpha$ (ng/mg-protein)
Grup 1 Kontrol Grubu	97,62 $\pm$ 8,89	77,05 $\pm$ 6,90	7,94 $\pm$ 0,81
Grup 2 LD <sub>0</sub> dozu tedavi grubu	87,57 $\pm$ 12,38	75,45 $\pm$ 14,61	8,82 $\pm$ 2,48
Grup 3 LD <sub>50</sub> dozu tedavi grubu	93,45 $\pm$ 9,18	66,20 $\pm$ 9,31	7,04 $\pm$ 0,86
Grup 4 Yüksek doz tedavi grubu	87,40 $\pm$ 4,49	71,36 $\pm$ 9,55	7,62 $\pm$ 0,07
P değeri	0,069 **	0,150 **	0,208 *

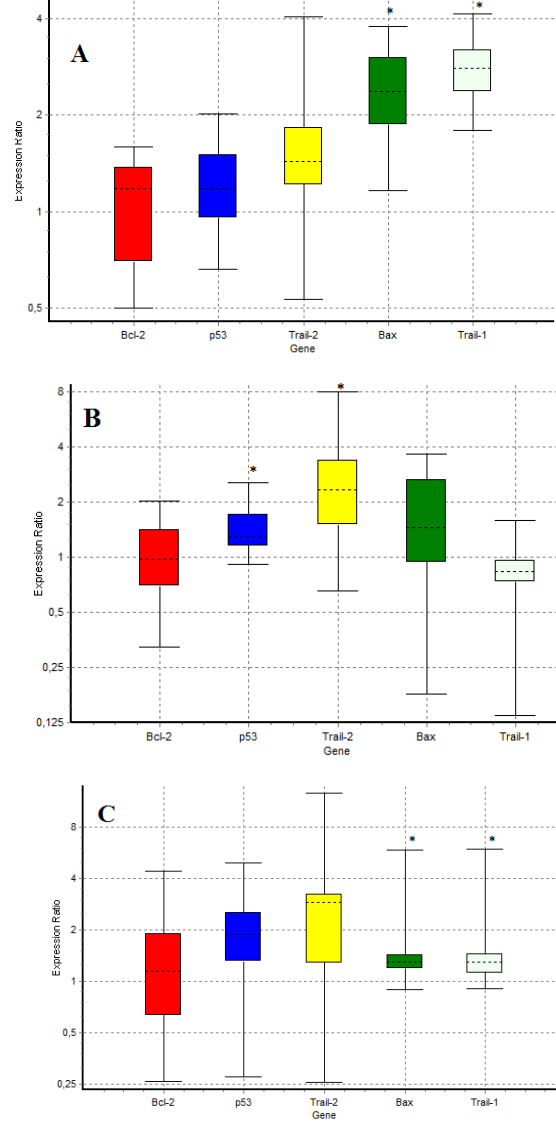
Veriler; ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir. Analizi yapılan parametrelerde gruplar arasında herhangi bir istatistiki fark varlığı belirlenmemiştir. P değerinde \* işareti bulunan ve normal dağılım gösteren verilere parametrik testler uygulandı (ANOVA&Duncan). P değerinde \*\* işareti bulunan ve normal dağılım göstermeyen verilere ise nonparametrik testler uygulandı (Kruskal wallis & Man whitney U). Kısaltmalar; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$  and IFN- $\gamma$ :interferon  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ :interleukin 1 $\beta$ .

### 3.2 Krosinin Apoptoz ve Proliferasyona Etkileri

Krosinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz (p53, bax, TRAIL1 ve TRAIL 2) ve proliferasyona (Bcl-2) etkisi, analizi gerçekleştirilen genlere ait her bir grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslanması sonucu belirlendi. MCF-7 hücrelerine LD<sub>0</sub> dozunda ve LD<sub>50</sub> dozundan daha yüksek dozda krosin uygulanması durumunda TRAIL1 ve proapoptotik bax gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde uyarıldığı (Şekil.2A ve Şekil.2C) görüldü. MCF-7 hücrelerine LD<sub>50</sub> dozunda krosin uygulandığında ise p53 ve TRAIL 2 genlerine ait ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde farklılık gösterdiği belirlendi (Şekil 2).

### 4. Tartışma ve Sonuç

Kanser etiolojisinde oluşan hücrel hasarın önemli sebepleri arasında oksidatif stres ve inflamasyon aracılığıyla şekillenen apoptoz da sayılmaktadır. Kanser gelişimi sırasında, özellikle de ileri evrelerde organizmada immun sistemin zayıflaması ile oksidatif stres ve inflamasyonda artış gözlenir. Bu



**Şekil 2.** Krosinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkisi

Veriler; ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verilmiştir (n = 5). Krosinin MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkisi, analizi gerçekleştirilen genlere ait her bir grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslanması sonucu belirlendi. A; kontrol grubu ile LD<sub>0</sub> dozu uygulanan 2. grubun kıyaslamasını, B; kontrol grubu ile LD<sub>50</sub> dozu uygulanan 3. grubun kıyaslamasını, C; kontrol grubu ile LD<sub>50</sub> dozunun iki katı doz uygulanan 4. grubun kıyaslamasını göstermektedir.(\*): Kontrol grubuna göre istatistiki olarak farklılık gösteren parametreleri göstermektedir (p<0.05)

açından değerlendirildiğinde vücudun direncinin artırılması için antioksidan takviye önemli olabilir. Ama takviyenin kanser hücrelerinin üremesine de katkı yapabileceği düşünülürse, çok dikkatli ve bilinçli bir şekilde yapılması önem arz etmektedir. Bu nedenle antioksidan maddelerin kanser hücrelerinde etkilerinin incelenmesi ve bilim dünyasıyla paylaşılması kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sunabilir.

Krosin ve diğer antioksidanlar düşük dozlarda koruyucu etkiler gösterirken, yüksek dozlarda toksisite gösterebilir. Antioksidanların yüksek dozlarda toksisite oluşturması antioksidatif stres olarak da ifade edilebilir. Antioksidanların yoğun kullanımı ile oluşan bu toksisitenin nedenlerinden biri, hücre membranı ve ara bölüklerinde bulunan doymamış bağlar ve/veya aktif gruplar bulunduran biyomoleküller ile biyoaktif metabolitler olan antioksidanların etkileşime girmesi olabilir. Böylelikle antioksidanlar hücrel molekülere/yapılara zarar vererek antioksidatif stres oluşturuyor olabilir. Nitekim kanser hücrelerinde birçok antioksidan etkili aktif maddenin düşük dozlarda proliferasyonu artırırken, yüksek dozlarda antikanserojen etkili olabileceğini göstermektedir (Lu *et al.* 2015, Fanayi *et al.* 2016). Krosinin antikanserojenik etkilerinin oluşmasında rol oynayan apoptozun uyarılmasında oksidatif stres ve/veya inflamasyon da etkili olabilir. Bu bağlamda sunulan çalışma ile krosinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksitesinin belirlenmesini yanında aynı zamanda farklı dozlardaki krosinin MCF-7 hücrelerinde oksidatif stres ve inflamasyon aracılı apoptoza etkilerinin nasıl olduğu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

MCF-7 hücreleriyle yapılan çalışmalarda krosinin LD<sub>50</sub> dozuyla ilgili farklı bilgiler mevcuttur. Lu vd. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada MCF-7 hücreleri ile krosinin farklı dozlarının 24 ve 48 saat inkübe edilmesi sonucunda LD<sub>50</sub> dozları belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyonda krosinin LD<sub>50</sub> dozu 60 µg/mL, 48 saat sonunda ise 12.5 µg/mL bulunduğu ifade edilmektedir. Literatürde Lu vd. (2015)'nin bulunduğu krosin LD<sub>50</sub> dozu (60 µg/mL) ile sunulan çalışmada bulunan LD<sub>50</sub> dozu (1611 µg/mL) arasında büyük farklılıklar vardır. Bunun sebebi çalışmalarda kullanılan krosinin saflık oranlarının farklı olması ve uygulama şekilleri ile ilgili olabilir. Nitekim yapılan başka bir çalışmada ise MCF-7 hücrelerinde krosinin LD<sub>50</sub> dozunun 3.5 mg/mL olduğu belirtilmektedir (Fanayi *et al.* 2016). Sunulan çalışmada ise yapılan MTT analizleri sonucunda MCF-7 hücrelerinde krosinin LD<sub>50</sub> dozu 1611 µg/mL (1.611 mg/mL) bulunmuştur. Elde edilen bulgular daha önce

literatürde belirlenen doz aralığında olduğu için ideal kabul edilebilir.

Krosin gibi antioksidan maddeler yüksek dozlarda antikanserojen etkinlik gösterirken, düşük dozlarda hem vücut hücrelerinin hem de kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırabilir. Bu durum ise kanser hücrelerinin üreme yeteneğinin normal hücrelere göre daha ileri olduğu göz önüne alınırsa kanserin daha da ilerlemesine yol açabilir. Bununla beraber sunulan çalışmada, düşük doz krosin uygulamalarının proliferasyonu etkilemeden apoptozu uyardığı belirlendi. LD<sub>0</sub> dozu (yaklaşık 20 µg/mL) krosin uygulanan grupta TAS düzeylerinin kontrol grubuna göre azalarak oksidatif stresi artırdığı (Çizelge 4) ve büyük olasılıkla bu nedenle apoptozu uyardığı söylenebilir. Nitekim LD<sub>0</sub> dozu uygulanan grupta oksidatif stresle beraber apoptotik genler olan bax ve TRAIL1 mRNA ekspresyon seviyelerinin uyarıldığı (Şekil 2A) gösterilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda bu bulgumuzu destekler niteliktedir. Bakshi vd. (2016)'a göre 20 µg/mL dozunda krosin uygulanan MCF-7 hücrelerinde bax, caspase 3 gibi apoptotic genleri uyarılabileceği rapor edilmektedir. Bu veriler düşük dozlarda bile meme kanserli hastalarda krosinin ve krosin içerikli ürünlerin risk oluşturmayacağını göstermektedir. Bununla birlikte düşük dozlardaki krosinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisinin ayrıca değerlendirilmesi / araştırılması yararlı olacaktır.

Sunulan çalışmada LD<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta da TAS düzeylerinin düşmesine bağlı bir şekilde oksidatif stresin ve buna bağlı olarak apoptotik genler olan p53 ve TRAIL2 mRNA ekspresyon düzeylerinin uyarıldığı (Şekil 2B) belirlendi. Nitekim yapılan çalışmalar p53 uyarılmasında da etkin rol oynayabilen sitozolik ve mitokondriyal kaynaklı reaktif oksijen türlerinin apoptozun uyarılmasında etkili olabileceği ifade edilmektedir (Lu *et al.* 2015, Nasimian *et al.* 2020). Bununla birlikte daha yüksek krosin dozu uygulanan deney grubunda (grup 4) oksidatif stress ve inflamasyonla ilgili kontrol grubuna göre bir farklılık görünmesinde apoptozun bax ve TRAIL1 aracılığı ile uyarıldığı görüldü. Bu durum yüksek doz krosin uygulamalarında MCF-7 hücrelerinde apoptozun oksidatif stress ve



inflamasyon dışında başka bir hücrel etki sonucu şekillenmiş olabileceğini akla getirmektedir. Örneğin apoptozun şekillenmesinde hatalı protein katlanmalarına cevap olarak gelişebilen endoplazmik retikulum (ER) stresi rol oynamış olabilir. Ama bunun daha net olarak ifade edilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çeşitli hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarla krosinin proliferasyonu baskılayarak (Bakshi *et al.* 2016, Chryssanthi *et al.* 2007, Hire *et al.* 2017) antikanserojen etkileri olabileceği de ifade edilmektedir. Fakat sunulan çalışmada ne düşük dozlarda ne de yüksek dozlarda krosinin proliferatif bir gen olan Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerini etkilemediği belirlenmiştir. Bu tezatın nedeni çalışmalarda kullanılan farklı krosin dozu (Bakshi *et al.* 2016) veya proliferasyon düzeylerinin gösterilmesinde kullanılan parametrelerin farklı olmasıyla (Chryssanthi *et al.* 2007) açıklanabilir.

Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde krosinin MCF-7 hücrelerinde LD<sub>0</sub> ve LD<sub>50</sub> dozlarında proinflamatuvar stokin düzeylerini etkilemeksizin oksidatif stresi artırarak apoptozu uyardığı ve böylelikle sitotoksositeye sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Hem MCF-7 hücrelerinde hem de diğer hücre hatlarında krosinin antikanser etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için metabolizmayı etkileyen önemli sinyal yollarına ve apoptozise etkilerinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca hücre kültüründen elde edilen bulguların, deney hayvanlarında oluşturulacak modellemeler ile doğrulanması krosinin kanser tedavisinde olası yararlarını açıklamak adına faydalı olabilir.

## Teşekkür

Sunulan bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (Proje no: 16.KARİYER.160) desteklenmiştir. Ayrıca sunulan çalışmadaki bulguların bir kısmı 23-25 Ağustos 2017 tarihlerinde Roma-İtalya'da düzenlenen "IV. International Multidisciplinary Congress of Eurasia (IMCOFE)" kongresinde sözlü bildiri şeklinde sunulmuş ve özet bildiri şeklinde kongre kitabında yayınlanmıştır.

## 5. Kaynaklar

- Adali, F., Gonul, Y., Aldemir, M., Hazman, O., Ahsen, A., Bozkurt, M.F., Sen, O.G., Keles, I., Keles, H., 2016. Investigation of the Effect of Krosin Pre-Treatment on Renal Injury Induced by Infrarenal Aortic Occlusion. *Journal of Surgical Research*, **203**,145-53.
- Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z., Papageorgiou, V.P., 2005. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytotherapy Research*, **19**, 997 – 1000.
- Bakshi, H.A., Hakkim, F.L., Sam, S., 2016. Molecular Mechanism of Crocin Induced Caspase Mediated MCF-7 Cell Death: In Vivo Toxicity Profiling and Ex Vivo Macrophage Activation. *Pacific Organization for Cancer Prevention*,**17**,1499-506.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **7**, 248-54.
- Chryssanthi, D. G., Fotini N. L., Gregoris, I., Adamantia, P., Nikos, K. K., Paul, C., 2007. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. *Anticancer Research*, **27**, 357–362.
- Ersin, G., Çelik, S., Ulasli, S.S., Özyürek, A., Hazman, Ö., Günay, S., Özdemir, M., Ünlü, M., 2016. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, *Inflammation*, **39**, 744–751.
- Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., Fernandez, J.A., 1996. Krosin, safranal and picrokrosin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, **100**, 23–30.
- Fanayi, A.R., Changizi, V., Safa, M., 2016. Effect of krosin and doxorubicin/radiation on the breast cancer cell line, Michigan Cancer Foundation, *Bioscience biotechnology research communications*, **9**, 428–434.
- Garcia-Olmo, D.C., Riese, H.H., Escribano, J., Ontanon, J., Fernandez, J.A., Atienzar, M., Garcia-Olmo, D., 1999. Effects of longterm treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutrition and Cancer*, **35**, 120–126.

- Hazman, Ö., Aksoy, L., Büyükben, A., 2016. Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **46**, 1593-1602.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M.F., Fidan, A.F., Uysal, F.E., Çelik, S., 2018. The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, **41**, 1032-1048.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M.F., 2015. Anti-inflammatory and Antioxidative Activities of Safranal in the reduction of Renal Dysfunction and Damage that Occur in Diabetic Nephropathy. *Inflammation*, **38**, 1537-45.
- Hazman, Ö., Ovalı, S., 2015. Investigation of the Anti-Inflammatory Effects of Safranal on High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model, *Inflammation*, **38**, 1012-9.
- Hazman, Ö., Sarıova, A., Bozkurt, M.F., Çiğerci, İ.H., 2021. The anticarcinogen activity of  $\beta$ -arbutin on MCF-7 cells: Stimulation of apoptosis through estrogen receptor- $\alpha$  signal pathway, inflammation and genotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **476**, 349-360.
- Hire, R.R., Srivastava, S., Davis, M.B., Kumar Konreddy, A., Panda, D., 2017. Antiproliferative Activity of Crocin Involves Targeting of Microtubules in Breast Cancer Cells. *Scientific Reports*, **24**, 44984.
- Hoshyar, R., Mollaei, H., 2017. A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **69**, 1419-1427.
- Kianbakht, S., Hajiaghaee, R., 2011. Anti-hyperglycemic Effects of Saffron and its Active Constituents, Crocin and Safranal, in Alloxan-Induced Diabetic Rats, *Journal of Medicinal Plants*, **39**, 82-89.
- Lee, I.A., Lee, J.H., Baek, N.I., Kim, D.H., 2005. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 2106-2110.
- Liakopoulou-Kyriakides, M., Skubas, A., 1990. Characterization of the platelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus*, *Biochemistry international*, **22**, 103-10.
- Lu, P., Lin, H., Gu, Y., Li, L., Guo, H., Wang, F., Qiu, X., 2015. Antitumor effects of crocin on human breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 20316-22.
- Nasimian, A., Farzaneh, P., Tamanoi, F., Bathaie, S.Z., 2020. Cytosolic and mitochondrial ROS production resulted in apoptosis induction in breast cancer cells treated with Crocin: The role of FOXO3a, PTEN and AKT signaling. *Biochemical pharmacology*, **177**, 113999.
- Ozkececi, Z.T., Gonul Y., Yuksel Y., Karavelioglu A., Tunay K., Gulsari Y., Cartilli O., Hazman O., Bal A. 2016. Investigation of the effect of safranal and crocin pretreatment on hepatic injury induced by infrarenal aortic occlusion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **83**, 160-166.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**, e45.
- Rajaei, Z., Hadjzadeh, M.A., Nemati, H., Hosseini, M., Ahmadi, M., Shafiee, S., 2013. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, **16**, 206-10.
- Shirali, S., Bathaine, S., Nakhjavani, M., 2013. Effect of crocin on the insulin Resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, **27**, 1042- 1047.
- Soeda, S., Ochiai, T., Paopong, L., Tanaka, H., Shoyama, Y., Shimeno, H., 2001. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sciences*, **69**, 2887-98.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249.
- Ulasli, S.S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Hazman, O., Ozyurek, A., Koyuncu, T., Unlu, M., 2013. Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester

and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **14**, 6159-64.