



# AKCİĞER KANSERİ VE MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE SAFRANAL BİLEŞİĞİNİN SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN GERÇEK ZAMANLI İZLENMESİ

REAL-TIME MONITORING OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF SAFRANAL COMPOUND ON  
LUNG CANCER AND BREAST CANCER

Ebru UZUNHİSARCIKLİ<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Akciğer adenokarsinomu ve meme kanseri en sık görülen kanser türleridir ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindedir. Safranal bileşiğinin çeşitli farmakolojik etkileri ve sitotoksik özellikleri vardır. Bu çalışmanın amacı, safranal bileşiğinin insan akciğer karsinomu hücre hattı (A549), insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve insan bronşiyal epitel sağlıklı hücre (Beas-2b) hatları üzerindeki sitotoksitesini sürekli izleme yoluyla tahlil etmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Hücreler, safranal ile 1, 10, 100 µM konsantrasyonda muamele edildi ve bu bileşiğin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizörü kullanılmıştır. E-plaka kuyularının empedansı aracılığıyla hücre indeksi görüntülenerek her 15 dakikada bir izlenmiştir.

**Sonuç ve Tartışma:** Yapılan çalışmalar sonucunda safranal bileşiğinin MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu, A549 ve Beas-2b hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattında, hücre indeksi değişiklikleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda azaldığı tespit edilmiştir. Kanser türüne göre bu ilaçların etkinliğini artırmak için geleneksel antikanser ilaçlar ve safranal bileşiği kombinasyonu kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** A549 hücre hattı, MCF-7 hücre hattı, safranal, sitotoksite, xCELLigence

## ABSTRACT

**Objective:** Lung adenocarcinoma and breast cancer are the most commonly occurring cancer types and they are the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Safranal has various pharmacological effects and have cytotoxic properties. Aim of this study was by continuous monitoring to assay the cytotoxicity of safranal on human lung carcinoma cell line (A549), human

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ebru Uzunhisarcıklı  
e-posta / e-mail: ebruozturk@erciyes.edu.tr, Tel. / Phone: +903522076666-28276

Gönderilme / Submitted : 03.05.2023

Kabul / Accepted : 08.08.2023

Yayınlanma / Published : 20.09.2023

*breast cancer cell line (MCF-7) and human bronchial epithelial cell lines (Beas-2b).*

**Material and Method:** *Cells were treated 1, 10, 100  $\mu$ M concentrations with safranal and xCELLigence real-time cell analyzer were used to determine this compound effect on cell viability. The cell index was monitored every 15 minutes by visualizing the impedance of the E-plate wells.*

**Result and Discussion:** *Consequently the studies, it was determined that the safranal has cytotoxic effect on MCF-7 cell line and did not has a toxic effect on A549 and Beas-2b cells. In the MCF-7 cell line, cell index alterations were found to be decreased at all concentrations compared with the untreated control. The combination of conventional anticancer drugs and safranal can be used to increase the effectiveness of these drugs considering cancer type.*

**Keywords:** *A549 cell line, cytotoxicity, MCF-7 cell line, safranal, xCELLigence*

## GİRİŞ

Meme kanseri ve akciğer adenokarsinomu, dünyada kansere bağlı ölümlere yol açan en yaygın kanser türleridir [1]. Hedefe yönelik ilaç tedavileri, immünoterapi ve cerrahi yaklaşımlar dahil olmak üzere çeşitli tedavi yaklaşımları halen devam etmektedir. Diğer tüm kanserler gibi, anormal hücre proliferasyonu bu kanser türlerinin temel özelliğidir [2]. Mevcut terapötiklerin, özellikle gelişmiş ülkelerde, meme kanseri ölümlerini başarılı bir şekilde kontrol etmesine rağmen, meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en yaygın kanser ve önde gelen ölüm nedeni haline gelmiştir [3]. Kanser hücrelerinin çoğalmasına karşı takviyeler, meme kanserinin önlenmesine ve tedavisine katkıda bulunabilir. Ek olarak, östrojen biyosentezini katalize eden aromataz enziminin inhibe edilmesi, meme kanseri için etkili bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir [2]. Kanserde ilaç tedavileri için güçlü bileşiklere olan gereklilik nedeniyle, ilerleme gösteren araştırmalar değerli bir yaklaşımdır. Meme kanseri ve akciğer kanserinin en yaygın olarak görülen kanser tipleri olması, tedaviye katkı sunabilecek her türlü araştırmayı daha da önemli kılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ağır yan etkileri vardır. Bu nedenle etkinliği artırabilecek veya daha az yan etkileri olabilecek alternatif moleküllerin antikanserojen etkinliklerinin araştırılmasının yeni farmakolojik etkilerinin açığa çıkarılmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Safranal, dehidrojenasyon yoluyla beta-siklositralden türetilen bir monoterpene ve *Crocus sativus* L.'de bulunan doğal bir üründür [4]. Antidiyabetik, antiinflamatuvar, antioksidan, antitümör, antitümör ve antikonvülsanları içeren geniş bir terapötik özellik yelpazesi, safrandan türetilen özel nutrasötik türlerine atfedilmiştir. Safranal, antikanser özellik sergileyen bir bileşiktir; safran ve temel bileşenlerin normal hücreler üzerinde hiçbir sitotoksik etkisinin olmadığı, ancak kanser hücreleri için öldürücü olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar, safranın ve bileşenlerinin kanser gelişimine karşı uygun şekilde hareket ettiğini ve tümörlere karşı seçici toksisite gösterdiğini kanıtlamıştır [5-7].

Canlı hücrelerin metabolik aktivitesini ölçen MTT testi gibi yaygın sitotoksikite testleri, kanser hücre dizilerinin, hücre canlılığının belirlenmesinde hala yaygın olarak kullanılmaktadır [8]. Tüm durumlar için evrensel olarak uygun tek bir yöntem yoktur ve her birinin belirli koşullar altında potansiyel olarak sınırlamaları vardır [9]. Ancak bu testler, yalnızca test edilen bileşiğin seçilen kesin zaman noktası üzerindeki etkisini yansıtan son nokta testleridir. Bazen ilaç adayı, bu yaygın sitotoksikite testleri tarafından test edilen zaman noktasından/noktalarından daha erken zaman noktalarında akut bir etkiye neden olabilir. Bu nedenle, gerçek zamanlı bir değerlendirme için gerçek zamanlı sitotoksikite testlerini kaçınılmaz kılan bu tür uç nokta testleri ile bu akut etkiler gözden kaçırılabilir. xCELLigence Sistemi, hücrelerin kantitatif ve gerçek zamanlı izlenmesiyle ve yapışık hücrelerin durumunu *in vitro* olarak analiz etmek için empedans ölçümlerine dayalı olarak hücre proliferasyonu ve sitotoksikitenin değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Elektrik empedansının ölçülmesi, hücrelerin yapışması, çoğalması ve yaşayabilirliği hakkında fikir vermektedir. Hücre bağlanması ve yayılması nedeniyle empedansta gözlenen değişiklikler Hücre İndeksi (CI) olarak adlandırılan parametre olarak ifade edilmektedir. CI, hücre canlılığını, dolayısıyla hücre sayısını, bağlanma kalitesini ve hücre tipini yansıtmaktadır [10-12]. Hücre canlılığının izlenmesi kritiktir ve xCELLigence sistemi, hücrelerin sürekli olarak ölçülmesini ve kantifikasyonunu sağlamaktadır [13,14]. Ayrıca, xCELLigence sistemi, zamana bağlı IC<sub>50</sub> değerlerinin gerçek zamanlı olarak hesaplanmasına izin vermektedir [11]. Bu analizin özellikle büyük ölçekli ilaç taramasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır [10-12].

Mevcut çalışmada, safranal bileşiğinin A549, MCF-7 hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkileri araştırılmıştır ve antikanser aktivitesinin, sağlıklı hücre olan Beas-2b hücre hattı ile kıyaslanarak gerçek zamanlı hücre analizörü ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla safranal bileşiğinin A549, MCF-7 ve Beas-2b hücre hatlarındaki etkileri gerçek zamanlı hücre analizi ile ilk kez gösterilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

A549 (ATCC, CCL-185) insan akciğer karsinomu hücre hattı, MCF-7 (ATCC, HTB-22) insan meme kanseri hücre hattı ve Beas-2b (ATCC, CRL-9609) insan bronşiyal epitel sağlıklı hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) satın alınmıştır. Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı/Besin Karışımı F-12 (DMEM/F12), DMEM, RPMI besiyeri, 100 U/ml penisilin-100 ug/ml streptomisin, fetal sığır serumu (FBS), tripsin-EDTA, Capricorn Scientific'ten (Ebsdorfergrund, Almanya) satın alınmıştır. 96 kuyucuklu E-plaka, ACEA Biosciences'tan (San Diego, ABD) satın alınmıştır. Safranal, Tamoksifen ve Gemsitabin MedChemExpress'ten (NJ, ABD) satın alınmıştır.

### Hücre Kültürü

%10 FBS, %1 L-glutamin, 100 U/ml Penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin içeren sırasıyla DMEM-F12, DMEM ve RPMI besiyeri ile A549, MCF-7 ve Beas-2b hücreleri çoğaltılmıştır. Hücreler, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. Safranal dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüştür ve nihai DMSO konsantrasyonunun %0.1'den az olduğu belirlenmiştir.

### Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA)

A549 hücrelerinin optimum ekim konsantrasyonu belirlenmiştir ve ardından hücreler (12500 hücre/kuyu), MCF-7 hücreleri (10000 hücre/kuyu) ve Beas-2b hücreleri (10000 hücre/kuyu) 96 kuyucuklu E-plakaya ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %80 doluluğa ulaştığında, %0.25 tripsin-EDTA uygulanmıştır. Daha sonra 25°C'de 5 dakika 1000 rpm'de santrifüjlenip 96 kuyucuklu xCELLigence E-plakasına ekilmiştir. Hücreler, E-plakaya ekildikten yaklaşık 24 saat sonra logaritmik olarak büyüme aşamasına ulaştığında, 1, 10, 100 µM konsantrasyonlarında safranal uygulanmıştır. Tamoksifen ve Gemsitabin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. E-plaka kuyularının empedansı aracılığıyla her 15 dakikada bir izlenmiştir. Deneyler yaklaşık 72 saat süreyle yürütülmüştür. Bu bileşiklerin etkisi, küçük değişikliklerle üreticinin talimatlarında (Roche Applied Science ve ACEA Biosciences) açıklandığı gibi RTCA sistemi ile izlenmiştir. RTCA elektriksel empedansı ölçmekte ve hücre canlılığını, hücre sayısını, bağlanma kalitesini ve hücre tipini ifade eden bir parametre olan hücre indeksini görüntülemektedir. IC<sub>50</sub> (yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri, 24 saatte RTCA entegre yazılımı aracılığıyla hesaplanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

Tüm hesaplamalar, xCELLigence sisteminin RTCA entegre yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. CI, xCELLigence sistemi ile tekrarlanan deneylerden (n = 4) hesaplanmıştır. Kontrol ve deney grubu arasındaki değerlerdeki farklılıkları karşılaştırmak için GraphPad Prism Version 9.5.1 programı kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA varyans analizi ardından Dunnett's post-hoc analizi yapılarak belirlenmiştir. p < 0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Safranalin Etkilerinin RTCA Kullanılarak Gerçek Zamanlı Olarak İzlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analizi; hücre proliferasyonunu ve morfoloji değişimini, işaretçi kullanmadan saptama, fizyolojik temas gerektirmeksizin gerçek zamanlı izleme ile otomatik ölçümler yapabilme, yüksek duyarlılık ve doğrulukta görüntüleme için kullanılan bir sistemdir. Elektronik plakalara entegre edilmiş mikroelektronik hücre sensörü dizisi, elektrodların elektronik empedansının ölçülmesi, elektrodlar üzerindeki değişikliklerin saptanması ve izlenmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada safranal, iki kanser hücre hattına (A549 ve MCF-7) ve sağlıklı hücre olan Beas-2b hücre hattına karşı

sitotoksitesisi açısından araştırılmıştır. Sitotoksitesite, potansiyel terapötik bir ajanın antikanser aktivitesini tespit etmek açısından önemli bir ölçüt olduğu için bu çalışmada safranal bileşiğinin etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Safranal doz-yanıt eğrilerinin tekrarlanan xCELLigence ölçümleri ile elde edilmiştir. Hücrelerin indeksi, hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artarken, hücreler bileşik ile muamele edilmiştir. Biyolojik aktivite çalışmalarında safranal bileşiğinin sitotoksik incelemeleri olumlu sonuçlar vermiştir ve konsantrasyona bağlı bir şekilde MCF-7 hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Safranalın A549 ve Beas-2b hücre hattında sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1). Etkisi olan potansiyel bir antikanser bileşiğin, kabul edilebilir olması için sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmaması veya çok düşük düzeyde olması beklenmektedir. Safranal bileşiğinin Beas-2b sağlıklı hücre hattında toksik etkisi bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 1c).

Uygulama sonrası 24 saat ve 48 saatlik maruziyetten sonra hücre tipleri için CI değişiklikleri aşağıda verilmiştir (Tablo 1). Safranalın MCF-7 hücre hattında uygulamadan sonra 24. saatteki IC<sub>50</sub> değeri 12.94 µM (Şekil 2a); 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri 13.83 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 2b); ve sigmoidal konsantrasyon yanıt eğrisi verilmiştir. Bu eğri, deneysel veri noktalarına en uygun eğriyi matematiksel fonksiyonlara göre oluşturan sigmoidal konsantrasyon-yanıt denklemini kullanarak IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanmasını sağlamaktadır.

MCF-7 hücrelerinde gerçek zamanlı hücre analiz sonuçları değerlendirildiği zaman uygulama sonrası 24. saatte, 10 µM Tamoksifen'in (p<0.0001) ve 1 µM, 10 µM ve 100 µM safranalın (p<0.001) hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 3a). Uygulama sonrası 48. saatte ise, 10 µM Tamoksifen (p<0.0001), 1 µM safranal (p<0.05), 10 µM safranal (p<0.05) ve 100 µM safranalın (p<0.01) hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 3b).

Aktif biyomoleküllerin sağlığı geliştirdiği ve çeşitli hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için kullanılabilceği bilinmektedir. Potansiyel antikanser bileşiklerinin saptanması için biyomoleküller ile yapılan antikanser aktivite tarama çalışmaları önem kazanmıştır. Bu nedenle, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi ve kanser için daha etkili tedavi stratejilerinin bulunmasında aktif biyomoleküllerin tespiti değerli bir yaklaşım olarak görülmektedir [15]. Safranalın kanser hücrelerinde etkinliği ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada, HeLa hücrelerinde safrandan türetilen farklı bileşiklerin potansiyel sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Safran özlerinin, insan tümör hücrelerinin hücre büyümesini engellediği bildirilmiştir. Safranalın HeLa hücrelerinin büyümesini *in vitro* olarak inhibe edebildiği, yüksek LD<sub>50</sub> değeri ile birlikte baharattaki düşük yüzdesinin büyümeyi inhibe edici aktiviteye işaret ettiği belirlenmiştir [16].

Safranın kanser önleyici özelliklerinin kesin mekanizması belirsizliğini korumaktadır, ancak bazı çalışmalarda birkaç hipotez belirtilmiştir. Bir çalışmada, safranalın antikanser potansiyeli, antianjiyojenik kapasitesiyle ilgilenecek araştırılmıştır. Safranalın, VEGF'nin indüklediği anjiyogenezi *in vitro* ve *ex vivo* olarak çizik yara testi, tüp oluşumu testi, transmembran testi ve aortik halka testi yoluyla inhibe ettiği tespit edilmiştir [5].

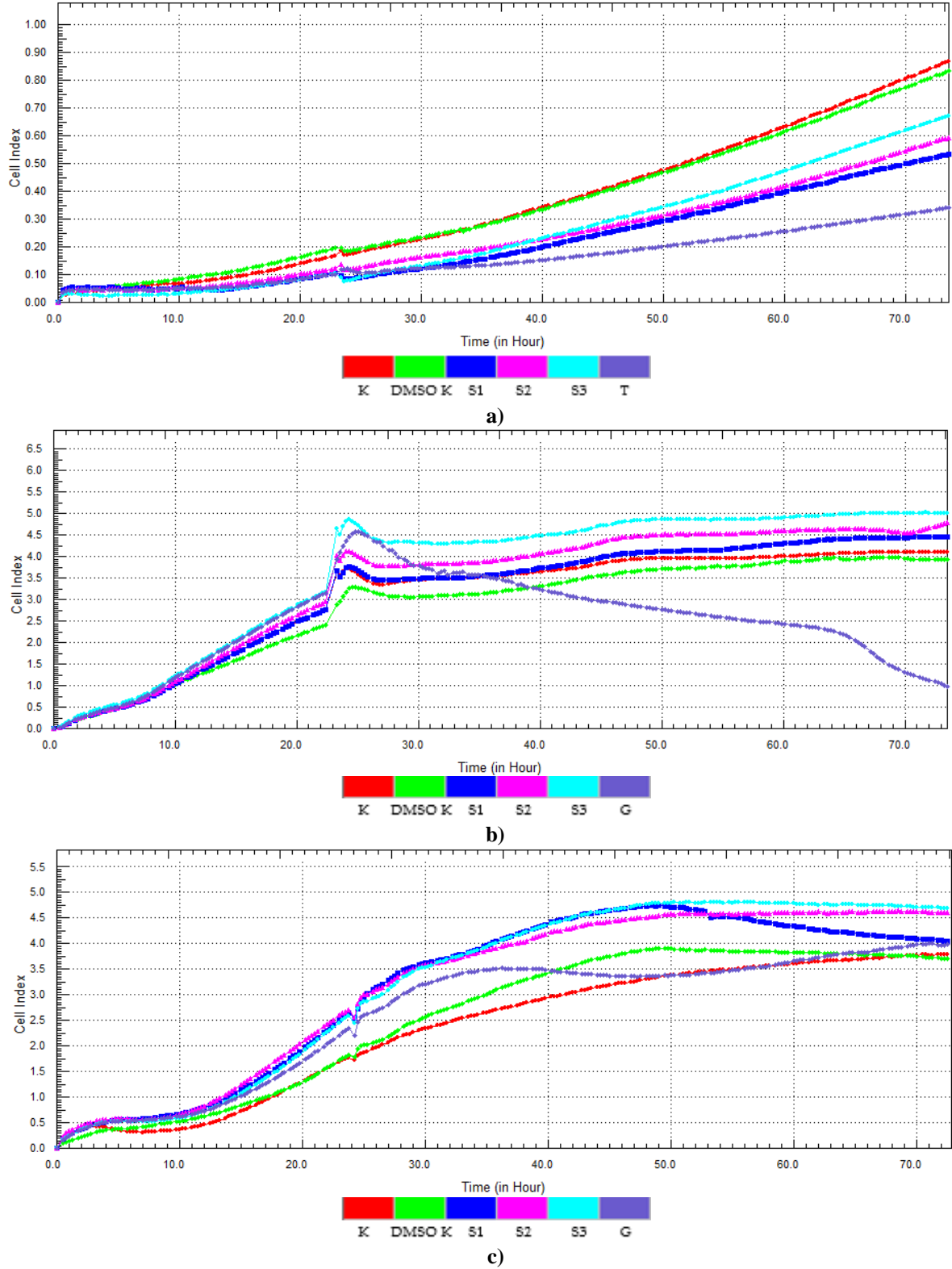
Safranalın potansiyel bir kanser önleyici madde olarak kabul edilebileceği ve tübülüne bağlanmasının mikrotübül polimerizasyonunun inhibisyonuna yol açabileceği belirtilmiştir [17].

**Tablo 1.** xCELLigence sistemi kullanılarak safranal uygulandıktan 24 saat ve 48 saat sonra hücre tipleri için CI değişiklikleri

Hücre tipi	A549	A549	MCF-7	MCF-7	Beas-2b	Beas-2b
Zaman	48. saat	72. saat	48. saat	72. saat	48. saat	72. saat
Hücre sayıları (hücre/kuyu)	12500	12500	10000	10000	10000	10000
S1	4.02±0.06	4.36±0.34	0.23±0.01	0.54±0.01	4.44±0.41	3.99±0.48
S2	4.39±0.06	4.61±0.19	0.33±0.09	0.62±0.17	4.66±0.33	4.54±0.12
S3	4.74±0.99	4.91±0.94	0.32±0.01	0.64±0.01	4.69±0.24	4.61±0.13

xCELLigence sistemi ile tekrarlanan deneylerden elde edilen hücre indeksi verileri kullanılarak hesaplanmıştır (n = 4).

Hücelere 24. saatte safranal uygulanmıştır. Veriler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. S1: 100 µM safranal; S2: 10 µM safranal; S3: 1 µM safranal



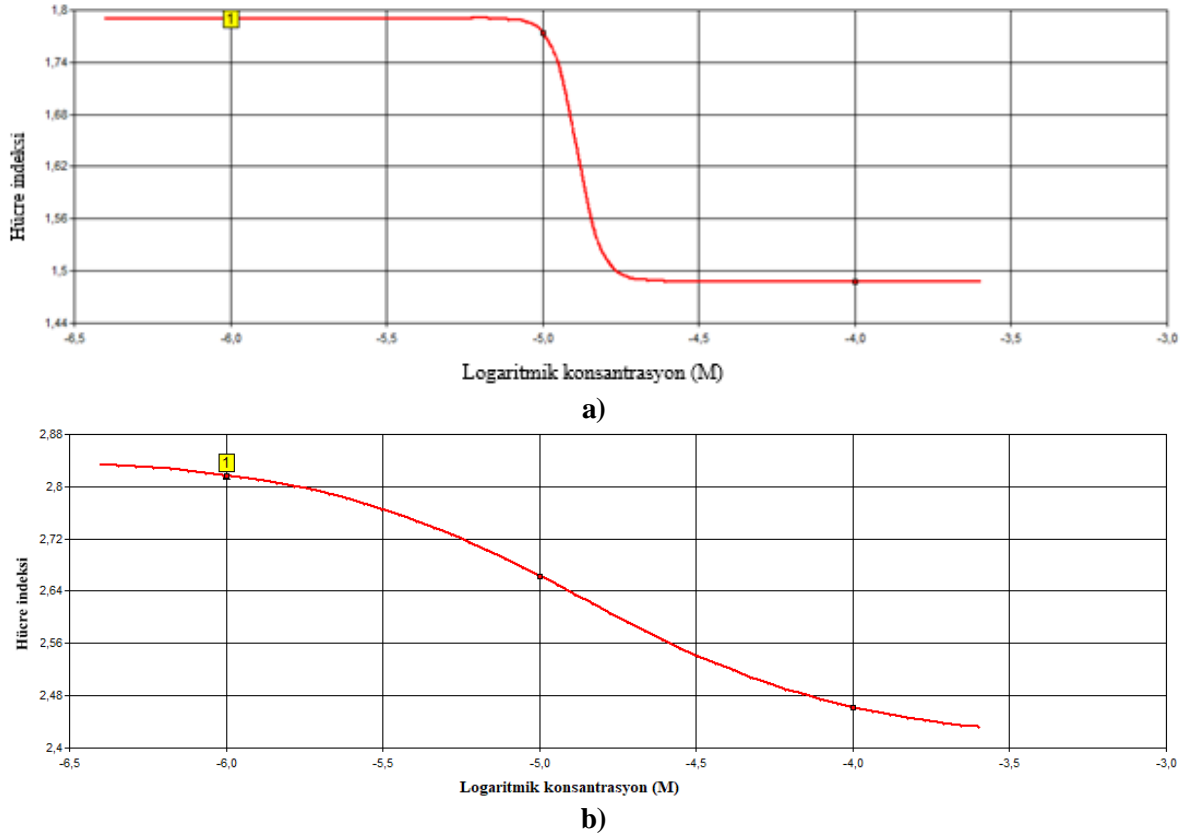
**Şekil 1.** Hücre çoğalmasına karşı safranal bileşiğinin gerçek zamanlı etkileri

a) MCF-7 b) A549 c) Beas-2b

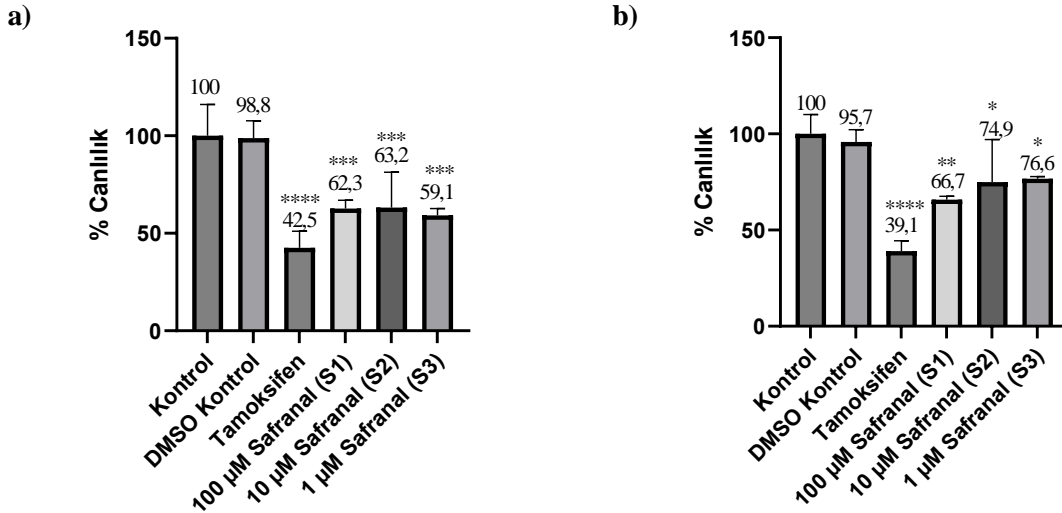
MCF-7, A549 ve Beas-2b hücreleri, çeşitli konsantrasyonlarda safranal ile muamele edilmiştir. Tüm safranal konsantrasyonları, tedaviden 24 saat sonra belirgin bir şekilde MCF-7 hücrelerinin hücre çoğalmasını azaltmıştır.

K: Kontrol; DMSO K: DMSO Kontrol;

S1: 100 µM safranal; S2: 10 µM safranal; S3: 1 µM safranal; T: 10 µM Tamoksifen; G: 10 µM Gempitabin



**Şekil 2.** MCF-7 hücre hattında safranal uygulamasında sigmoidal konsantrasyon yanıt eğrisi  
a) 24 saatlik b) 48 saatlik maruziyet



**Şekil 3.** MCF-7 hücre hattında gerçek zamanlı hücre analiz sonuçları  
a) 24 saatlik b) 48 saatlik maruziyet

Değerler GraphPad Prism 9.5.1 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla. Anlamlılık aralığı; \* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.001$  ve \*\*\*\* $< 0.0001$  ( $n=4$ ). Sonuçlar, ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak sunuldu

Safranalin HeLa ve MCF-7 hücrelerinde safranin neden olduğu hücre ölümünde rol oynayabileceği sonucuna varılabileceği belirtilmiştir. Lipozom kapsüllemenin safranalin anti-tümör etkisini geliştirdiği ve özellikle lipozomal formunun kanserde ümit verici kemoterapötik ajanlar olarak araştırılabileceği belirlenmiştir [18].

Literatürdeki çalışmalar, birkaç insan karsinom hücre hattının hem canlılık hem de hücre döngüsü inhibisyonu açısından safranaldan etkilendiğini göstermektedir [19,20].

Yapılan bir çalışma safranalin bileşiğinin oral skuamöz hücreli karsinoma karşı (KB hücre hattı) kısmen seçici sitotoksik ve apoptojenik etkilere sahip olduğunu ve normal fibroblast (NIH 3T3) hücreleri üzerinde çok düşük düzeyde etkilere sahip olduğunu göstermektedir [21].

Yıllar boyunca yapılan kapsamlı araştırmalar, safranalin kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisine yönelik umut verici farmakolojik özelliklere sahip olduğunu göstermiş olsa da, hücresel ve moleküler mekanizmalar aydınlatılmayı beklemektedir. Sonuç olarak safranalin, antikanser potansiyeli açısından daha fazla araştırılmaya değer nitelikte bir bileşiktir. Safranalin etkilerinde yer alan olası mekanizmaların daha fazla incelenmesi, klinik deneyler de dahil olmak üzere sonraki çalışmalar için güçlü bir doğrulamaya yol açacaktır.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: E.U.; Tasarım: E.U.; Denetim: E.U.; Kaynaklar: E.U.; Malzemeler: E.U.; Veri Toplama ve/veya İşleme: E.U.; Analiz ve/veya Yorumlama E.U.; Literatür Taraması: E.U.; Makalenin Yazılması E.U.; Kritik İnceleme: E.U.; Diğer: -

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## ETİK KURUL ONAYI

Yazar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Carioli, G., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Rodriguez, T., Levi, F., Boffetta, P., La Vecchia, C., Negri, E. (2020). Cancer mortality predictions for 2019 in Latin America. *International Journal of Cancer*, 147, 619. [\[CrossRef\]](#)
2. Chumsri, S., Howes, T., Bao, T., Sabnis, G., Brodie, A. (2011). Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2), 13-22. [\[CrossRef\]](#)
3. Wei, H., Fu, P., Yao, M., Chen, Y., Du, L. (2016). Breast cancer stem cells phenotype and plasma cell-predominant breast cancer independently indicate poor survival. *Pathology-Research and Practice*, 212(4), 294-301. [\[CrossRef\]](#)
4. Forouzanfar, F., Asadpour, E., Hosseinzadeh, H., Boroushaki, M.T., Adab, A., Dastpeiman, S.H., Sadeghnia, H.R. (2021). Safranalin protects against ischemia-induced PC12 cell injury through inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 707-716. [\[CrossRef\]](#)
5. Abdalla, A., Murali, C., Amin, A. (2022). Safranalin inhibits angiogenesis via targeting HIF-1 $\alpha$ /VEGF machinery: *In vitro* and *ex vivo* insights. *Frontiers in Oncology*, 11, 5938. [\[CrossRef\]](#)
6. Milajerdi, A., Djafarian, K., Hosseini, B. (2016). The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 3, 23-32. [\[CrossRef\]](#)
7. Shakeri, M., Tayer, A.H., Shakeri, H., Jahromi, A.S., Moradzadeh, M., Hojjat-Farsangi, M. (2020). Toxicity of saffron extracts on cancer and normal cells: A review article. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(7), 1867. [\[CrossRef\]](#)
8. Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R.U.I. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4(1), 14-19.
9. Choudhary, M.I., Thomsen, W.J. (2001). *Bioassay techniques for drug development*. CRC Press, Amsterdam, p.26.

10. Keogh, R.J. (2010). New technology for investigating trophoblast function. *Placenta*, 31(4), 347-350. [\[CrossRef\]](#)
11. Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., Reichl, F.X. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26(1), 51-58. [\[CrossRef\]](#)
12. Karaboğa Arslan, A.K., Öztürk, E., Yerer, M.B. (2017). Monitoring the effectiveness and time dependency of vanadium pentoxide cytotoxicity on A549 and Beas-2b cell lines. *Journal of Cancer Biology & Research*, 5(2), 1097.
13. Moodley, K., Angel, C.E., Glass, M., Graham, E.S. (2011). Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. *Journal of Neuroscience Methods*, 200(2), 173-180. [\[CrossRef\]](#)
14. Golke, A., Cymerys, J., Slonska, A., Dzieciatkowski, T., Chmielewska, A., Tucholska, A., Banbura, M.W. (2012). The xCELLigence system for real-time and label-free analysis of neuronal and dermal cell response to Equine Herpesvirus type 1 infection. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(1), 151-153.
15. Chauhan, S.S., Singh, A.K., Meena, S., Lohani, M., Singh, A., Arya, R.K., Chauhan, P.M. (2014). Synthesis of novel  $\beta$ -carboline based chalcones with high cytotoxic activity against breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(13), 2820-2824. [\[CrossRef\]](#)
16. Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., Fernández, J.A. (1996). Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Letters*, 100(1-2), 23-30. [\[CrossRef\]](#)
17. Naghshineh, A., Dadras, A., Ghalandari, B., Riazi, G.H., Modaresi, S.M.S., Afrasiabi, A., Aslani, M.K. (2015). Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An *in vitro* study. *Chemico-Biological Interactions*, 238, 151-160. [\[CrossRef\]](#)
18. Malaekheh-Nikouei, B., Mousavi, S.H., Shahsavand, S., Mehri, S., Nassirli, H., Moallem, S.A. (2013). Assessment of cytotoxic properties of safranal and nanoliposomal safranal in various cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 27(12), 1868-1873. [\[CrossRef\]](#)
19. Samarghandian, S., Shabestari, M.M. (2013). DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. *Indian Journal of Urology*, 29(3), 177-183.
20. Geromichalos, G.D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., Sinakos, Z. (2014). Safranal, a *Crocus sativus* L constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. *In silico and in vitro* study. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 45-50. [\[CrossRef\]](#)
21. Jabini, R., Ehtesham-Gharaee, M., Dalirsani, Z., Mosaffa, F., Delavarian, Z., Behravan, J. (2017). Evaluation of the cytotoxic activity of crocin and safranal, constituents of saffron, in oral squamous cell carcinoma (KB Cell Line). *Nutrition and Cancer*, 69(6), 911-919. [\[CrossRef\]](#)