

Evaluation of the Protective Effect of Quercetin on Normal Ovary Cells Viability Induce by Clomiphene Citrate and Correlation with p53 Gene Expression

Amirhossein Azari¹
Maryam Eslami^{2,3}
Abbas Mohammadpour⁴
Mohammad Shokrzadeh⁵

¹ MSc, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Applied Biotechnology Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ PhD in Cell and Molecular Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Professor, Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 29, 2024; Accepted June 26, 2024)

Abstract

Background and purpose: Infertility is one of the medical problems in the world today. Clomiphene citrate drug is used to treat infertility. One of the side effects of this drug is the formation of tumor tissue in the ovary. Quercetin is a flavonoid found abundantly in nature. Quercetin is found in many fruits, vegetables, leaves, seeds, and grains. Quercetin has the potential to be used in the treatment of cancer. The most well-known and common tumor suppressor gene in humans is the *p53* gene. The *p53* gene was discovered in 1979 and recognized as a tumor suppressor gene in 1989. This gene was recognized as the guardian of the genome in 1992 due to its role in maintaining the stability of the genome. The *p53* gene is the most commonly mutated in human cancers. The purpose of this study is to evaluate the protective effect of quercetin on normal ovary cell viability induced by clomiphene citrate drug and its correlation with *p53* gene expression.

Materials and methods: In this research, Normal ovarian cells of the CHO cell line were used. Concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 mg/ml quercetin 50 μ M clomiphene citrate drug and 0.29 μ g/ml cisplatin were prepared and added to the cultured cells for 24 hours. In this study, Clomiphene Citrate and Cisplatin are both positive controls. Cell viability was evaluated by MTT assay. RNA was extracted and *p53* gene expression was analyzed by Real-Time PCR. In this study, the primer used for the *p53* gene was designed using NCBI and primer3 sites. In this study, the internal control gene is *GAPDH*.

Results: Results showed that the concentrations of 50, 100, 500, and 1000 mg/ml of quercetin reduced the toxicity of clomiphene citrate drug and cisplatin (both positive controls). So the higher quercetin concentration leads to a higher number of living cells and at 1000 mg/ml quercetin the number of living cells reached 83%. The results of Real-time PCR showed that Quercetin significantly increased the expression of the *p53* gene compared to the positive control group (clomiphene citrate) and negative control ($P < 0.05$). In the concentrations of 500 ($P = 0.0020$) and 1000 ($P < 0.0001$) quercetin compared to clomiphene citrate, this expression increase was more significant. Also, in the concentrations of 500 ($P < 0.0001$) and 1000 ($P < 0.0001$) quercetin compared to the negative control, a substantial increase in *p53* gene expression was observed.

Conclusion: The findings of this study showed that the use of quercetin inhibits the cytotoxicity of clomiphene citrate and increases the expression of the *p53* gene, and its effectiveness is dose-dependent. However, Our study may partially explain the role of quercetin in the tumorigenesis process in the development of cancer in normal ovarian cells.

Keywords: Normal ovarian cell, Clomiphene citrate, Flavonoid, Quercetin, Cisplatin, *p53* gene, tumorigenesis

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (234): 48-60 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Shokrzadeh - Pharmaceutical Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: mslamuk@yahoo.com)

بررسی نقش محافظتی کوئرتستین بر حیات سلول‌های نرمال تخمدان مواجهه شده با داروی کلومیفن سیترات و ارتباط با بیان ژن *p53*

امیرحسین آذری^۱مریم اسلامی^{۳و۲}عباس محمدپور^۴محمد شکرزاده^۵

چکیده

سابقه و هدف: ناباروری، یکی از مشکلات عدیده پزشکی در دنیای امروز است. داروی کلومیفن سیترات برای درمان ناباروری استفاده می‌شود. از عوارض این دارو ایجاد بافت توموری در تخمدان می‌باشد. کوئرتستین یک فلاونوئید است که به طور فراوان در طبیعت یافت می‌شود. کوئرتستین در بسیاری از میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، دانه‌ها و غلات یافت می‌شود. کوئرتستین، پتانسیل استفاده در درمان سرطان را دارد. شناخته‌شده‌ترین و شایع‌ترین ژن سرکوبگر تومور در انسان، ژن *p53* است. ژن *p53* در سال ۱۹۷۹ کشف شد و در سال ۱۹۸۹ به عنوان یک ژن مهارکننده تومور شناخته شد. این ژن در سال ۱۹۹۲ به دلیل نقشی که در حفظ ثبات ژنوم داشت به عنوان نگهبان ژنوم شناخته شد. ژن *p53* متداول‌ترین ژن جهش یافته در سرطان‌های انسان است. این مطالعه با هدف بررسی نقش محافظتی کوئرتستین بر حیات سلول‌های نرمال تخمدان مواجهه شده با داروی کلومیفن سیترات و ارتباط با بیان ژن *p53* انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی مداخله‌ای و از نوع کار تحقیقاتی از نوع کاربردی، از سلول‌های نرمال تخمدان رده‌ی سلولی CHO استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر کوئرتستین و ۵۰ میکرومولار داروی کلومیفن سیترات و ۰/۲۹ میکروگرم بر میلی لیتر سیس پلاتین تهیه و به مدت ۲۴ ساعت به سلول‌های کشت داده شده اضافه شد. در این مطالعه داروی کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین هر دو به عنوان کنترل مثبت می‌باشند. ارزیابی حیات سلول‌ها به روش MTT assay انجام شد. ابتدا RNA استخراج و سپس بیان ژن *p53* با دستگاه Real-Time PCR مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه آغازگر مورد استفاده برای ژن *p53* با استفاده از سایت‌های NCBI و primer3 طراحی شد. در این مطالعه ژن کنترل داخلی *GAPDH* می‌باشد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کوئرتستین با کاهش سمیت داروی کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین (هر دو به عنوان کنترل مثبت) باعث افزایش حیات سلولی می‌شود به طوری که هر چه غلظت کوئرتستین بیش تر شد، تعداد سلول‌های زنده بیش تر می‌شود و در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کوئرتستین تعداد سلول‌های زنده به ۸۳ درصد رسید. نتایج حاصل از آزمون Real-time PCR بیانگر آن است که، کوئرتستین به طور معنی داری باعث افزایش بیان ژن *p53* در مقایسه با گروه کنترل مثبت (داروی کلومیفن سیترات) و کنترل منفی شد ($P < 0/05$). در غلظت‌های ۵۰۰ ($P = 0/0020$) و ۱۰۰۰ ($P < 0/0001$) کوئرتستین در مقایسه با داروی کلومیفن سیترات، این افزایش بیان چشمگیرتر بود. هم چنین در غلظت‌های ۵۰۰ ($P < 0/0001$) و ۱۰۰۰ ($P < 0/0001$) کوئرتستین در مقایسه با کنترل منفی، افزایش بیان چشمگیری در ژن *p53* مشاهده شد.

استنتاج: یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد که، کوئرتستین احتمالاً باعث مهار سمیت سلولی حاصل از داروی کلومیفن سیترات و افزایش میزان بیان ژن *p53* می‌شود و میزان اثربخشی آن وابسته به دوز می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر تا حدی می‌تواند بیان کننده نقش کوئرتستین در فرآیند مهار تومورزایی در گسترش سرطان در سلول‌های نرمال تخمدان باشد.

واژه های کلیدی: سلول نرمال تخمدان، کلومیفن سیترات، فلاونوئید، کوئرتستین، سیس پلاتین، ژن *p53*، تومورزایی

E-mail: mslamuk@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات زیست فناوری کاربردی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات دارویی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۳/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۴/۶

مقدمه

ناباروری، یکی از مشکلات عدیده پزشکی در دنیای امروز است، به گونه‌ای که شیوع آن از سال ۱۹۵۵ تاکنون ۵۰ درصد افزایش یافته است و هم اکنون ۱۵-۱۰ درصد زوجین از این مشکل رنج می‌برند که میزان آن در کشور ایران ۱۳/۲ درصد است (۱،۲). کلومیفن سترات به عنوان داروی محرک تخمک‌گذاری، از سال ۱۹۶۰ تاکنون به عنوان بهترین درمان اولیه برای اکثر زنان مبتلا به ناباروری با علت عدم تخمک‌گذاری و زوج‌هایی با ناباروری ناشناخته استفاده می‌شود (۳). با توجه به سادگی درمان و ارزان قیمت بودن کلومیفن، استفاده از آن اقتصادی بوده و در حال حاضر به عنوان خط اول درمان بیماران مبتلا به شمار می‌آید (۴). کلومیفن سترات مورد تایید FDA (اداره مواد غذایی و دارویی ایالات متحده آمریکا) است (۵). این دارو در فهرست داروهای ضروری سازمان بهداشت جهانی قرار دارد و کلومیفن سترات یکی از عوامل اصلی دخیل در بروز سرطان تخمدان می‌باشد (۶،۷). سرطان تخمدان کشنده‌ترین نوع سرطان زنان است و پنجمین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. بنابراین، جستجوی عوامل درمانی جدید با کارایی بهتر و عوارض جانبی کم‌تر ضروری است (۸-۱۰). تقریباً تمام داروهای سنتز شده شیمیایی که در حال حاضر برای سرطان درمانی استفاده می‌شوند، سمیت قابل توجهی برای سلول‌های طبیعی دارند (۱۱). امروزه بهره بردن از درمان‌های جایگزین امن‌تر و بی‌خطر مانند استفاده از داروهای با منبع گیاهی برای درمان سرطان افزایش یافته است (۱۲). کارتونوئیدها گزینه‌های خوبی برای تهیه داروهای جدید هستند، زیرا آن‌ها به دلیل داشتن خاصیت گیاهی بر خلاف سایر داروهای شیمیایی موجود در بازار، برای سلامت بدن تقریباً بی‌خطر هستند و به راحتی تهیه می‌شوند و اثرات سمی قابل توجهی برای سلول‌های نرمال بدن در درمان‌های طولانی مدت ندارند و اغلب سیتوتوکسیک (Cytotoxicity) و کشنده برای

سلول‌های سرطانی هستند ولی بر روی سلول‌های نرمال بدن این اثر را ندارند (۱۵-۱۳).

کوئرستین (quercetin) یک فلاونوئید است که به طور گسترده در طبیعت توزیع می‌شود. در بسیاری از میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، دانه‌ها و غلات یافت می‌شود (۱۶). کوئرستین یک عامل آگزیز است که فعالیت ضد سرطانی بالقوه را نشان می‌دهد و به عنوان عامل مهمی در پیشگیری و بهبود سرطان شناخته شده‌اند (۱۷،۱۸). کوئرستین به دلیل داشتن اثرات آنتی‌رادیکالی یا آنتی‌اکسیدانی ممکن است در درمان سرطان تخمدان به خصوص در ترکیب با سایر داروهای پیشگیری کننده شیمیایی، کاندید خوبی می‌باشد (۱۹).

شناخته شده‌ترین و شایع‌ترین ژن سرکوبگر تومور در انسان، ژن *p53* است که در سال ۱۹۷۹ کشف شد و در سال ۱۹۸۹ به عنوان یک ژن مهارکننده تومور شناخته شد. این ژن در سال ۱۹۹۲ به دلیل نقشی که در حفظ ثبات ژنوم داشت به عنوان نگهبان ژنوم شناخته شد (۲۰). ژن *p53* متداول‌ترین ژن جهش یافته در سرطان انسان است. القای آپوپتوز عمدتاً به *p53* عملکردی وابسته است و بیش از ۵۰ درصد تومورهای انسانی جهش این ژن را دارن (۲۱،۲۲). جهش‌های *p53* در همه انواع بافت‌شناسی سرطان تخمدان مشاهده شده است (۲۳). دریافت رژیم غذایی فلاونوئیدها، به عنوان مهار پیشرفت سرطان و کمک به ترمیم DNA از طریق مکانیسم‌های واسطه *p53* در سلول‌های انسانی از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شناخته شده است. جهش‌های مخرب ژن *p53* نیز به عنوان اولین وقایع اتفاق می‌افتند که در اوایل تکامل تومور رخ می‌دهد و حوادث محرک در سرطان تخمدان می‌باشد (۲۴،۲۵). جهش‌های بیماری‌زای *p53* در ۹۷ درصد موارد سرطان‌های پیشرفته تخمدان شناسایی شده است (۲۶). با توجه به اثرات امیدوارکننده ضد سرطانی فلاونوئیدها که ممکن است موثرتر از داروهای شیمی درمانی متداول باشد، در مطالعه حاضر، نقش محافظتی کوئرستین برای اولین بار، بعد از مصرف داروی کلومیفن

سیترات بر روی سلول‌های نرمال تخمدان و ارتباط آن با بیان ژن $p53$ در این سلول را مورد بررسی قرار گرفت تا مانع از عوارض جانبی داروی کلومیفن سیترات بر روی سلول‌های نرمال تخمدان شویم (۲۷).

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، از نوع بررسی آزمایشگاهی مداخله‌ای و نوع کار تحقیقاتی از نوع کاربردی می‌باشد. مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران با کد IR.IAU.PS.REC.1398,297 قرار گرفت. رده سلولی نرمال تخمدان CHO (Chinese hamster ovary) با شماره (ATCC® CRL-9606™) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد و سپس به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل شد. رده سلولی خریداری شده از نظر اخلاقی مشکلی نداشت. پس از انجماد و ذخیره نمودن سلول‌ها، احیاء مجدد سلول‌ها صورت گرفت. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM شرکت GIBCO-BRL که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی گرم، ۱/۵ گرم برلیتر سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین) بودند و در مدت نگهداری، در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 و رطوبت کافی انکوباتور نگهداری شدند. پس از پر شدن سطح پلیت از سلول ترپسین اضافه شد و سپس سلول‌ها انکوبه و از سطح فلاسک جدا شدند و سوسپانسیون سلولی تهیه گردید و سپس در دور 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس سلول‌ها رسوب کرده و از رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد (۲۸).

ارزیابی حیات سلولی با روش *MTT assay* پس از کشت سلول

به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM/F12 که حاوی 10^5 عدد سلول از هر رده سلولی است، اضافه شد (برای هر غلظت از داروی موردنظر ۳ چاهک در نظر گرفته شد)؛ سپس به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. طی زمان انکوباسیون، سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند تا از چگونگی رشد سلول‌ها و عدم آلودگی آن‌ها، اطمینان حاصل شود. سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر کوثرستین را به چاهک‌های حاوی غلظت ثابت ۵۰ میکرومولار از کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین که نیز به عنوان داروی گروه کنترل مثبت با دوز ۰,۲۹ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شده بود اضافه شد (۳۰، ۲۹). در این مطالعه داروی کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین هر دو به عنوان داروی گروه کنترل مثبت می‌باشند. سپس پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای را برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به مدت کافی در تماس با داروهای مورد آزمایش و کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین قرار بگیرند. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از انکوباتور خارج شد و ۵۰ μl محلول MTT به هر چاهک اضافه و پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرارداده شد. پس از سپری شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک‌ها خارج شد و ۵۰ μl محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) (DNAbiotech، ایران) به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه صبر گردید. پس با دستگاه ELISA reader (شرکت ویراژن، ایران) جذب کلنی‌های سلولی رنگ گرفته در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای تعیین IC_{50} داروی کوثرستین و کلومیفن سیترات و داروی سیس پلاتین از میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها (viability) استفاده شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از محلول کیت RiboEx Total RNA (GeneAll) (کره) استفاده شد که روش کار براساس پروتکل پیشنهادی سازنده صورت گرفت.

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

غلظت RNA تخلیص شده توسط دو روش کمی و کیفی، خواندن OD توسط دستگاه نانودراپ (Nanodrop) (اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل ScanDrop² شرکت Analytik jena، آلمان) و مشاهده باند توسط الکتروفورز سنجیده شد.

سنتز cDNA

برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده از کیت cDNA synthesis kit تهیه شده از شرکت پارس توس (پارس توس، مشهد، ایران) طبق پروتکل استاندارد ارائه شده توسط شرکت استفاده شد.

طراحی و سنتز پرایمر

آغازگر مورد استفاده برای ژن *p53* با استفاده از سایت‌های NCBI و primer3 طراحی شد. آغازگر مورد استفاده برای ژن *GAPDH* از مقاله استفاده شد (۳۱). جهت اطمینان از اتصال اختصاصی پرایمرها به توالی موردنظر، تمامی آغازگرها در سایت NCBI BLAST بلاست شدند. هم‌چنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner و سایت OligoAnalyser مورد بررسی قرار داده شد. به دنبال تایید آغازگر در سایت‌ها و نرم‌افزارهای مورد استفاده، سفارش ساخت آن‌ها به شرکت سینا کلون داده شد. در این مطالعه ژن کنترل داخلی *GAPDH* می‌باشد. مشخصات آغازگر مورد استفاده به شرح جدول شماره ۱ است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن *p53* و *GAPDH*

نام ژن	توالی پرایمر	تعداد باز	Tm°C
<i>p53 f</i>	5'-GAGCCAGGAGACATTTTCAGACC-3'	۳۳	۶۱٫۱۸
<i>p53 R</i>	3'-5'-CAGGAGTCTCAGTTACAGGGTCTT	۲۴	۶۱٫۳۰
<i>GAPDH f</i>	5'-AGGTTGTCTCTCGGACTTCA-3'	۲۱	۶۱٫۳۷
<i>GAPDH R</i>	5'-GAGGTCCACCACTCTGTGCT-3'	۲۱	۶۱٫۹۹

بیان ژن

برای بررسی بیان ژن *p53* در حالات مختلف پس از فراهم کردن شرایط تکثیر قطعه موردنظر، بیان کمی ژن *p53* با استفاده از واکنش Real time PCR در ۷ نمونه بررسی شد و از Real time PCR شرکت Applied Biosystems StepOne™ (آمریکا) استفاده شد. به کمک CT‌های به دست آمده از واکنش Real time PCR میزان تغییرات بیان ژن‌ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

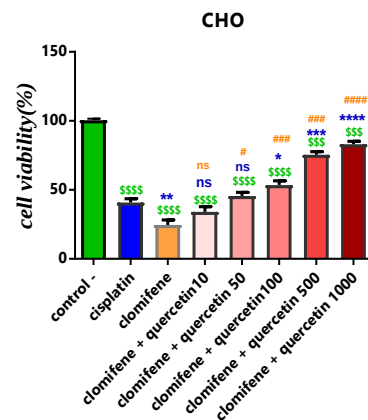
کلیه ی محاسبات آماری برای مقایسه IC₅₀ ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism Ver.3 و به روش رگرسیون غیرخطی (non linear Regression) انجام شد و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey-Krame) و multiple comprehension test صورت گرفت و نمودار توسط Prism Ver.3 رسم شد که ($P < 0.05$) به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

داده‌های حاصل برای تمام نمونه‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نسبت به ژن کنترل داخلی *GAPDH* نرمال‌سازی شد. برای مقایسه بیان ژن مذکور در نمونه‌ها از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.4 در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد و نمودار توسط همین نرم‌افزار رسم شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی سایتوتوکسیسیته کوئرستین در غلظت‌های مختلف (میلی گرم بر میلی لیتر) در نمودار شماره ۱ نشان

داده شده است. این نتایج نشان دهنده این می باشد که کوثرستین دارای اثربخشی مثبت بوده و این اثربخشی با افزایش دوز مصرفی کوثرستین بیش تر شد و سمیت حاصل از داروی کلومیفن سیترات با افزایش دوز مصرفی کوثرستین کاهش پیدا کرد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: درصد بقای سلولی سلول های نرمال تخمدان رده CHO در مواجهه با غلظت های مختلف از کوثرستین و غلظت ثابتی از داروی کلومیفن سیترات و سیس پلاتین طی زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت. \$\$\$\$ مقایسه با گروه کنترل منفی، *** مقایسه با گروه سیس پلاتین، ##### مقایسه با گروه کلومیفن سیترات

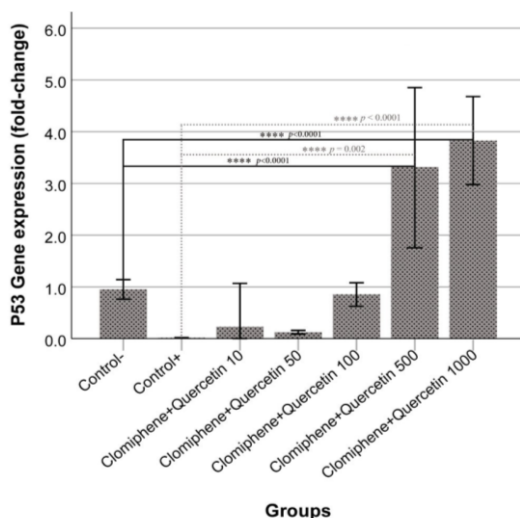
بررسی کمی و کیفی RNA/ استخراج شده

در حالت کمی نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ قرار داشت و نسبت جذب در ۲۳۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر ۲/۱ بود. با استفاده از دستگاه نانو دراپ OD غلظت RNA کل استخراج شده در محدوده ۴۰۰-۵۰۰ نانو گرم در میکرولیتر بود. RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

ارزیابی تغییرات بیان ژن p53 در نمونه ها

مقایسه میزان بیان نسبی ژن p53 در گروه های مورد نسبت به گروه کنترل مثبت کلومیفن سیترات و گروه کنترل منفی نشان داد که گروه های مورد که شامل غلظت های مختلف کوثرستین می باشد نسبت به گروه کنترل مثبت کلومیفن سیترات در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر

میلی لیتر کوثرستین بیان نسبی این ژن به طور معنی داری افزایش داشت که به ترتیب برابر (P=۰/۰۰۲۰) و (P<۰/۰۰۰۱) می باشد. در مقایسه با گروه کنترل منفی این افزایش بیان ژن در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ کوثرستین مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱). با توجه به نمودار می توان گفت که کوثرستین توانسته افزایش معنی داری در میزان بیان ژن p53 در مقایسه با گروه های کنترل، ایجاد کند (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: نمودار میزان بیان ژن p53 در گروه های مورد در مقایسه با گروه های کنترل

بحث

ناباروری، یکی از مشکلات عیدیه پزشکی در دنیای امروز است (۱). سال های اخیر، علاقه زیادی برای بیان ارتباط میان درمان ناباروری و گسترش سرطان ها، خصوصاً سرطان تخمدان نشان داده شده است (۳۲-۳۴). با توجه به سادگی درمان و ارزان قیمت بودن کلومیفن سیترات، استفاده از آن اقتصادی بوده و در حال حاضر به عنوان خط اول درمان بیماران مبتلا به ناباروری به شمار می آید (۴). تقریباً در بیش از یک سوم بیماران مبتلا به اختلالات تخمک گذاری تحت یک دوره درمان با کلومیفن باردار می شوند (۳۵). کلومیفن سیترات به عنوان یکی از عوامل اصلی دخیل در بروز سرطان تخمدان در

نظر گرفته شده است (۳۷،۳۶،۷). با توجه به این استدلال‌ها یافتن ترکیباتی به منظور کاهش آسیب‌های حاصل از کلومیفن سیترا، با توجه به مسئولیت خطیر جامعه درمانی کشور در حفظ سلامت و بهداشت زنان از یک طرف و شیوع رو به افزایش سرطان‌ها از سوی دیگر، اهمیت و اولویت چنین بررسی‌هایی را در زمینه تاثیر درمان‌های کمک باروری بر خطر سرطان‌ها و پیشگیری از آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین در این مطالعه، با بررسی اثر محافظتی احتمالی کوئرتسین بر زیست‌پذیری سلول‌های تخمدان مواجه شده با داروی کلومیفن سیترا و اثر بر بیان ژن *p53* گامی با ارزش در کاهش اثرات مضر داروی کلومیفن سیترا و جلوگیری از سرطان، گردید.

در مطالعه Rizzuto و همکاران در سال ۲۰۱۹، با عنوان خطر سرطان تخمدان در زنان تحت درمان با داروهای محرک تخمدان برای ناباروری که بیان کردند، شیوع سرطان تخمدان در زنان نابارور که در معرض مصرف همیشگی داروی کلومیفن سیترا قرار داشتند، افزایش داشت (۳۸). هم‌چنین Kuznia و همکارش در سال ۲۰۱۵ در مقاله سرطان دستگاه تناسلی در زنان، سرطان تخمدان، بیان کردند که سالانه بیش از ۲۰،۰۰۰ زن آمریکایی مبتلا به سرطان تخمدان هستند که علت آن می‌تواند استفاده قبلی از کلومیفن سیترا و سال‌های طولانی تخمک‌گذاری باشد (۳۹).

هم‌چنین Sanner و همکاران در سال ۲۰۰۹، در مطالعه خود شیوع سرطان تخمدان را در کسانی که کلومیفن سیترا دریافت کرده بودند را ارزیابی کردند و نتایج آن‌ها بیانگر این بود که در خانم‌هایی که تحت درمان کلومیفن سیترا برای اختلالات تخمک‌گذاری قرار گرفته بودند، خطر سرطان تخمدان بالا رفته بود (۳۷). هم‌چنین Brinton و همکاران در سال ۲۰۰۴، در مطالعه خطر سرطان تخمدان بعد از استفاده از داروهای تحریک کننده تخمک‌گذاری بیان کردند، استفاده همیشگی از کلومیفن سیترا، خطر ابتلا به سرطان تخمدان را

افزایش داد داد (۴۰). هم‌چنین ناصری و همکارش در سال ۲۰۰۱، در مقاله کلومیفن سیترا در قرن بیست و یکم بیان کردند که کلومیفن سیترا دارویی است که معمولاً برای القاء تخمک‌گذاری تجویز می‌شود. این اولین داروی انتخابی در نازایی است که اساساً با تخمدان‌های پلی‌کیستیک همراه است. زنان تحریک‌کننده با کلومیفن سیترا باید حداقل برای شش دوره تحت درمان قرار بگیرند و احتمالاً این درمان باید حداکثر تا ۱۲ چرخه محدود شود (۴۱). هم‌چنین Rossing و همکاران در سال ۱۹۹۴، در مطالعه تومورهای تخمدان در گروهی از زنان نابارور بیان کردند زنانی که در معرض داروی کلومیفن سیترا قرار گرفتند با افزایش خطر تومورهای تخمدان همراه بودند (۴۲). پس این مطالعات با مطالعه حاضر که از داروی کلومیفن سیترا استفاده گردید، که باعث مرگ سلولی و سرطانی شدن سلول‌های نرمال تخمدان شد؛ هم‌خوانی دارد.

در مطالعه Gadducci و همکاران در سال ۲۰۱۳، در مطالعه استفاده از داروهای باروری و خطر تومورهای تخمدان خود بیان کردند زنانی که داروهای ایجادکننده تخمک‌گذاری دریافت کرده بودند، تقریباً سه برابر بیش‌تر سرطان تخمدان تهاجمی داشتند. بنابراین داروهای باروری که سطح سرمی گنادوتروپین‌ها را بالا می‌برند و شانس چندین تخمک‌گذاری را افزایش می‌دهند، به عنوان یک عامل خطر هستند (۴۳). هم‌چنین Sovino و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیان کردند، کلومیفن سیترا شایع‌ترین دارو استفاده شده، برای تحریک تخمک‌گذاری و عاملی دخیل در بروز سرطان‌های پستان و تخمدان است. این دارو سطح استروژن (E) و پروژسترون (P)، هورمون‌هایی که به‌عنوان عوامل مؤثر بر ایجاد سرطان تخمدان و سایر سرطان‌های زنان شناخته شده‌اند را افزایش می‌دهد (۴۴). هم‌چنین Goldstein و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان کردند، کلومیفن سیترا یک عامل تعدیل‌کننده گیرنده استروژن انتخابی است که هم سطح استرادیول و پروژسترون را افزایش می‌دهد و هم

می‌تواند تکثیر سلولی را افزایش دهد (۴۵). پس از این طریق خطر ابتلا به سرطان تخمدان افزایش می‌یابد. پس از آنجایی که در مطالعه حاضر از کلومیفن سترات که به‌عنوان بهترین درمان برای اکثر زنان مبتلا به ناباروری می‌باشد، استفاده شد احتمالاً از طریق همین مکانیسم‌ها باعث مرگ سلول‌های نرمال تخمدان و سرطانی شدن سلول‌های نرمال تخمدان می‌شود. امروزه بهره بردن از درمان‌های جایگزین امن‌تر و بی‌خطر مانند استفاده از داروهایی با منبع گیاهی برای درمان و پیشگیری از سرطان افزایش یافته است (۴۶). کوئرتستین یک عامل آنتی‌آگونیست است که فعالیت ضدسرطانی بالقوه را نشان می‌دهد (۱۷). کوئرتستین یک القاکننده قوی آپوپتوز در سلول‌های مختلف سرطانی است (۴۸، ۴۷). کوئرتستین می‌تواند با مهار آپوپتوز سلول تومور یا توقف چرخه سلولی در یک مرحله خاص از چرخه، از رشد سلول‌های توموری و متاستاز سرطان جلوگیری کرده و ازدیاد سلول‌های سرطانی را سرکوب کند، که نشان می‌دهد این ترکیب، پتانسیل استفاده در درمان سرطان را دارد (۵۱-۴۹). مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که کوئرتستین باعث ایجاد مکانیسم‌های ضدسرطانی در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شوند (۱۷). شواهد گسترده نشان می‌دهد که کوئرتستین قادر است انواع مختلف سرطان‌ها از جمله سرطان پستان، ریه، نازوفارنکس، کلیه، روده بزرگ، پروستات، لوزالمعده و تخمدان را مهار کند. چندین مورد *in vivo* و *in vitro* برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک کوئرتستین بر سرطان تخمدان انجام شده است. از آنجا که کوئرتستین به سلول‌های سالم آسیب نمی‌رساند و از طریق مکانیسم‌های مختلف برای سلول‌های سرطانی سیتوتوکسیک است، محققان پیشنهاد می‌کنند که می‌تواند یک ماده ایده‌آل برای درمان سرطان تخمدان یا یک ماده کمکی در ترکیب با سایر داروهای ضد سرطان باشد. کوئرتستین باعث توقف چرخه سلول سرطانی تخمدان در مرحله G0/G1 می‌شود. به‌علاوه، میزان آپوپتوز پس از درمان با کوئرتستین افزایش می‌یابد (۱۷).

وفادار و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه کوئرتستین و سرطان، بینش جدیدی در مورد اثرات درمانی کوئرتستین بر سلول‌های سرطانی تخمدان بیان کردند با توجه به شواهد به‌دست آمده، کوئرتستین می‌تواند از سرطان تخمدان جلوگیری کند. علاوه بر این، این ترکیب طبیعی قادر به تقویت تأثیر سایر داروهای شیمی درمانی است (۵۲).

هم‌چنین Teekaraman و همکاران در سال ۲۰۱۹، در مطالعه کوئرتستین از رشد سلول‌های سرطانی متاستاتیک تخمدان در انسان جلوگیری کرده و اجزای مسیر آپوپتوتیک ذاتی را در رده سلولی (PA-1) تعدیل می‌کند که یک مطالعه آزمایشگاهی بود بیان کردند کوئرتستین، با دوز ۵۰ و ۷۵ میکرومولار، قادر به ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی متاستاتیک تخمدان است که منجر به جلوگیری از رشد آن‌ها می‌شود (۵۳). هم‌چنین رعنا شفافبخش و همکارش در سال ۲۰۱۹ در مطالعه کوئرتستین، یک ترکیب طبیعی برای درمان سرطان تخمدان بیان کردند؛ کوئرتستین به دلیل داشتن اثرات هم افزایی بالقوه ممکن است در درمان سرطان تخمدان به خصوص در ترکیب با سایر داروهای پیشگیری‌کننده شیمیایی، کاندید خوبی باشد (۵۴). هم‌چنین Tiwari و همکاران در سال ۲۰۱۹، تأثیر ترکیبی از داروهایی را که به‌طور هم افزایی عمل می‌کنند؛ بررسی کردند. آن‌ها اثر گرافن اکساید، کوئرتستین و جفیتینیب را بر سلول‌های سرطانی تخمدان (PA-1) مطالعه کردند، آن‌ها نشان دادند که کوئرتستین می‌تواند اثر هم‌افزایی بر خاصیت ضدسرطانی جفیتینیب بر سلول‌های PA-1، یک رده سلولی ناشی از سرطان تخمدان داشته باشد (۵۵). هم‌چنین Baby و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که کوئرتستین یک فلاونوئید اصلی در رژیم غذایی است که باعث مهار رشد سلول و آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان ریه انسان می‌شود (۵۶). هم‌چنین Ren و همکاران در سال ۲۰۱۵، در مطالعه تأثیر کوئرتستین بر تکثیر رده سلول‌های سرطانی تخمدان انسان SKOV-3 در شرایط آزمایشگاهی

بیان کردند، سلول‌های SKOV-3 سرطان تخمدان با دوزهای مختلف کوثرستین تحت درمان قرار گرفتند. اثر مهاري کوثرستین بر تکثیر با استفاده از روش MTT تشخیص داده شد و کوثرستین تکثیر سلول‌های SKOV-3 را به روشی وابسته به زمان و دوز مهار کرد (۱۷). هم‌چنین Long و همکاران به منظور نشان دادن حساسیت سلول‌های سرطانی تخمدان مقاوم به سیس پلاتین نسبت به کوثرستین و خاصیت ضدسرطانی این ترکیب، مطالعات *in vivo* و *in vitro* در مورد تأثیر زنجیره‌های پلیمری پلی‌اتیلن گلیکول لیپوزومی کوثرستین (لیپو-کو) بر روی مدل‌های سرطان تخمدان انسانی مقاوم در برابر سیس پلاتین (A2780cp) و حساس به سیس پلاتین (A2780s)، یافته‌های آن‌ها نشان داد که لیپو-کو باعث توقف چرخه سلولی و هم‌چنین آپوپتوز و سرکوب تکثیر سلولی در سلول‌های A2780cp و A2780s در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۵۷).

هم‌چنین Feugang و همکاران در سال ۲۰۰۶، بیان کردند که کوثرستین می‌تواند با مهار آپوپتوز سلول تومور یا توقف چرخه سلولی در یک مرحله خاص از چرخه، از رشد سلول‌های توموری و از متاستاز سرطان جلوگیری کرده و ازدیاد سلول‌های سرطانی را سرکوب کند، که نشان می‌دهد این ترکیب، پتانسیل استفاده در درمان سرطان را دارد (۵۱). با توجه به خاصیت ضد سمی، محافظتی و آنتی‌اکسیدانی کوثرستین و هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که کوثرستین احتمالاً با غیرفعال نمودن متابولیت‌های سمی حاصل از داروی کلومیفن سیترا، توانسته سبب بالا رفتن ظرفیت سم‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی تخمدان‌ها و موجب کاهش آسیب وارده ناشی از کلومیفن سیترا بر سلول‌های نرمال تخمدان و هم‌چنین افزایش حیات سلولی می‌شود و از تبدیل سلول‌های نرمال تخمدان به سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و اثر کورستین وابسته به دوز بود. بنابراین، مطالعه حاضر با مطالعات دیگران هم‌راستا می‌باشد.

جهش در *p53* در ۶۰-۵۰ درصد سرطان‌های تخمدان مشاهده شده است (۵۸). بیش از ۳۰ سال تحقیق در مورد سرکوبگر تومور *p53* آن را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های زیست‌شناسی تومور انسانی اثبات کرده است (۵۹). مطالعات حیوانی هم‌چنین اهمیت جهش‌های *TP53* را در ایجاد سرطان تخمدان نشان داد (۶۰). Corney و همکاران در سال ۲۰۰۸، نقش *p53* و *Rb* در سرطان تخمدان را مورد مطالعه قرار داده بودند که با استفاده از مدل موش نشان دادند که جهش‌های *p53* و *Rb* نقش مهمی در سرطان تخمدان، به ویژه در مراحل اولیه دارند (۶۱). هم‌چنین Bar و همکاران در سال ۲۰۰۹، بیان پروتئین *p53* فسفریله شده در Ser20 و Ser392 در نوپلاسم‌های بدخیم و خوش‌خیم تخمدان و ارتباط با پارامترهای کلینیکی پاتولوژیکی تومورها را مورد مطالعه قرار داده بودند. نتایج آن‌ها نشان داد که فسفوریلاسیون *p53* در Ser20 و Ser392 یک رویداد اولیه در رشد تومور تخمدان بود (۶۲).

هم‌چنین Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۶، در مطالعه جهش *TP53* در سرطان تخمدان اپیتلیال بیان کردند به‌طور خاص، جهش *TP53* با EOC (Emergency Operation Center) های انسانی بسیار همراه بود، زیرا جهش *TP53* در ۹۷ درصد از تهاجمی‌ترین شکل سرطان تخمدان HGSOC (High-grade serous ovarian cancer)، که بیش از ۳/۲ از کلیه سرطان‌های تخمدان را تشکیل می‌دهند، دیده می‌شود (۶۳). هم‌چنین Gong و همکاران در سال ۲۰۱۸، در مطالعه کوثرستین ترمیم شکستگی دو رشته DNA را سرکوب می‌کند و حساسیت به پرتوی سلول‌های سرطانی تخمدان را از طریق مسیر استرس شبکه آندوپلاسمی وابسته به *p53* افزایش می‌دهد، بیان کردند اثرات کوثرستین بر افزایش حساسیت رادیوتراپی تومور نشان داده است که کوثرستین می‌تواند اثر مرگ سلولی ناشی از اشعه را افزایش دهد. علاوه بر این، ترکیبی از درمان کوثرستین با اشعه به‌طور قابل توجهی رشد تومورها را سرکوب می‌کند، و به‌دنبال آن القای

حاصل از داروی کلومیفن سیترا توانسته سبب بالا رفتن ظرفیت سم‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی تخمدان و همچنین افزایش حیات سلولی می‌شود.

کوئرتستین توانست افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن *p53* در مقایسه با گروه کنترل مثبت کلومیفن سیترا و گروه کنترل منفی، ایجاد کند. در نتیجه یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که احتمالاً استفاده از کوئرتستین به‌منظور بیان ژن *p53* در سلول‌های نرمال تخمدان مواجه شده با داروی کلومیفن سیترا می‌تواند موثر واقع گردد.

p53, CHOP که نشانگر استرس شبکه آندوپلاسمی و γ -H2AX است، اتفاق می‌افتد و به‌طور حتم، این نتایج نشان داد که کوئرتستین به‌عنوان یک حساسیت‌پرتوی امیدوارکننده توسط سیگنال‌های استرس شبکه آندوپلاسمی وابسته به *p53* در مدل زئوگرافت تومور تخمدان انسان عمل می‌کند (۶۴). نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر هم‌راستا می‌باشد. با توجه به خاصیت ضد سمی، محافظتی و آنتی‌اکسیدانی کوئرتستین از یک طرف و نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که کوئرتستین احتمالاً با غیرفعال نمودن متابولیت‌های سمی

References

1. Direkvand Moghadam A, Delpisheh A, Sayehmiri K. The prevalence of infertility in Iran, a systematic review. *IJOGI* 2013; 16(81): 1-7 (Persian).
2. Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16(8): 1768-1776.
3. Zreik TG, Ayoub CM, Hannoun A, Karam CJ, Munkarah AR. Fertility drugs and risk of ovarian cancer: dispelling the myth. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20(3): 313-319.
4. Nader S. Infertility and pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol* 2010; 35(4): 211-225.
5. Von Hofe J, Bates GW. Ovulation induction. *Obstetrics and Gynecology Clinics* 2015; 42(1): 27-37.
6. World Health Organization. World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. WHO 2019.
7. Trabert B, Lamb EJ, Scoccia B, Moghissi KS, Westhoff CL, Niwa S, et al. Ovulation-inducing drugs and ovarian cancer risk: results from an extended follow-up of a large United States infertility cohort. *Fertil Steril* 2013; 100(6): 1660-1666.
8. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(3): 560-568.
9. Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(3): 559-569.
10. Grosso G, Buscemi S, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, La Vela V, et al. Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. *BMC Surg* 2013; 13(S2): S14.
11. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(4): 914-920.
12. Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod Toxicol* 2008; 25(2): 139-143.

13. Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br J Cancer* 1995; 72(6): 1380-1388.
14. Tokalov SV, Abramyuk AM, Abolmaali ND. Protection of *p53* wild type cells from taxol by genistein in the combined treatment of lung cancer. *Nutr Cancer* 2010; 62(6): 795-801.
15. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev* 2014; 8(16): 122-146.
16. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 2016; 8(3): 167.
17. Ren MX, Deng XH, Ai F, Yuan GY, Song HY. Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro. *Exp Ther Med* 2015; 10(2): 579-583.
18. Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, et al. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci Rep* 2016; 6: 24049.
19. Teekaraman D, Elayapillai SP, Viswanathan MP, Jagadeesan A. Quercetin inhibits human metastatic ovarian cancer cell growth and modulates components of the intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line. *Chem Biol Interact* 2019; 300: 91-100.
20. Hupp T, Meek D, Midgley C, Lane D. Regulation of the specific DNA binding function of *p53*. *Cell* 1992; 71(5): 875-886.
21. Yang C, Song J, Hwang S, Choi J, Song G, Lim W. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. *Redox Biol* 2021; 47: 102144.
22. Pinto EM, Zambetti GP. What 20 years of research has taught us about the *Tp53* p. R337H mutation. *Cancer* 2020; 126(21): 4678-4686.
23. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Role of *p53* and *Rb* in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 622: 99-117.
24. Merlin JJ, Rupasinghe HV, Dellaire G, Murphy K. Role of dietary antioxidants in *p53*-mediated cancer chemoprevention and tumor suppression. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021(1): 9924328.
25. Hoogstraat M, de Pagter MS, Cirkel GA, van Roosmalen MJ, Harkins TT, Duran K, et al. Genomic and transcriptomic plasticity in treatment-naïve ovarian cancer. *Genome Res* 2014; 24(2): 200-211.
26. Hayano T, Yokota Y, Hosomichi K, Nakaoka H, Yoshihara K, Adachi S, Kashima K, Tsuda H, Moriya T, Tanaka K, Enomoto T. Molecular characterization of an intact *p53* pathway subtype in high-grade serous ovarian cancer. *PloS one* 2014; 9(12): e114491.
27. Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomed Pharmacother* 2019; 116: 109004.
28. Shokrzadeh M, Rahmati M, Gharehkhani E, Zare R, Pourmohammadi P, Aghajanshakeri S. Pretreatment with Cilostazol Attenuates Carboplatin Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Bronchial Epithelial Cells (Beas-2B) and Human Blood Lymphocytes. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2023; 33(227): 24-36 (Persian).
29. Jiann BP, Lu YC, Chang HT, Huang JK, Jan CR. Effect of clomiphene on Ca^{2+} movement in human prostate cancer cells. *Life Sci* 2002; 70(26): 3167-3178.

30. Rantanen V, Grénman S, Kulmala J, Grénman R. Comparative evaluation of cisplatin and carboplatin sensitivity in endometrial adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1994; 69(3): 482-486.
31. Zhang X, Tang H, Sun YT, Liu X, Tan WS, Fan L. Elucidating the effects of arginine and lysine on a monoclonal antibody C-terminal lysine variation in CHO cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(16): 6643-6652.
32. Russo GL, Spinelli GP, Tomao S, Rossi B, Frati L, Panici PB, et al. Breast cancer risk after exposure to fertility drugs. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013; 13(2): 149-157.
33. Schüler S, Ponnath M, Engel J, Ortmann O. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287(6): 1187-1204.
34. Sergeantanis TN, Diamantaras A-A, Perlepe C, Kanavidis P, Skalkidou A, Petridou ET. IVF and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014; 20(1): 106-123.
35. Acharya U, Irvine DS, Hamilton MP, Templeton AA. The effect of three anti-oestrogen drugs on cervical mucus quality and in-vitro sperm—cervical mucus interaction in ovulatory women. *Hum Reprod* 1993; 8(3): 437-441.
36. Kurta ML, Moysich KB, Weissfeld JL, Youk AO, Bunker CH, Edwards RP, et al. Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: results from a US-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(8): 1282-1292.
37. Sanner K, Conner P, Bergfeldt K, Dickman P, Sundfeldt K, Bergh T, et al. Ovarian epithelial neoplasia after hormonal infertility treatment: long-term follow-up of a historical cohort in Sweden. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1152-1158.
38. Rizzuto I, Behrens RF, Smith LA. Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 6(6):CD008215.
39. Kuznia AL, Roett MA. Genital cancers in women: ovarian cancer. *FP essent* 2015; 438: 24-30.
40. Brinton LA, Lamb EJ, Moghissi KS, Scoccia B, Althuis MD, Mabie JE, et al. Ovarian cancer risk after the use of ovulation-stimulating drugs. *Obstet Gynecol* 2004; 103(6): 1194-1203.
41. Nasser S, Ledger WL. Clomiphene citrate in the twenty-first century. *Hum Fertil* 2001; 4(3): 145-151.
42. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994; 331(12): 771-776.
43. Gadducci A, Guerrieri ME, Genazzani AR. Fertility drug use and risk of ovarian tumors: a debated clinical challenge. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29(1): 30-35.
44. Sovino H, Sir-Petermann T, Devoto L. Clomiphene citrate and ovulation induction. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(3): 303-310.
45. Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe Jr L. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update* 2000; 6(3): 212-224.
46. Anahara R, Toyama Y, Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod Toxicol* 2008; 25(2): 139-143.
47. Jung Y-H, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim Y-H. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. *Life Sci* 2010; 86(9-10): 351-357.

48. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007; 121(10): 2225-2232.
49. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1992; 52(23): 6676-6681.
50. Beniston RG, Campo MS. Quercetin elevates p27 Kip1 and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. *Oncogene* 2003; 22(35): 5504-5514.
51. Ma L, Feugang JM, Konarski P, Wang J, Lu J, Fu S, et al. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. *Front Biosci* 2006; 11(5): 2275-2285.
52. Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, Ghasemi Y, et al. Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Biosci* 2020; 10(1): 1-7.
53. Teekaraman D, Elayapillai SP, Viswanathan MP, Jagadeesan A. Quercetin inhibits human metastatic ovarian cancer cell growth and modulates components of the intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line. *Chem Biol Interact* 2019; 300: 91-100.
54. Shafabakhsh R, Asemi Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *J Ovarian Res* 2019; 12(1): 55.
55. Tiwari H, Karki N, Pal M, Basak S, Verma RK, Bal R, et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for dual drug delivery applications: The synergistic effect of quercetin and gefitinib against ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019; 178: 452-459.
56. Baby B, Antony P, Vijayan R. Interactions of quercetin with receptor tyrosine kinases associated with human lung carcinoma. *Nat Prod Res* 2018; 32(24): 2928-2931.
57. Long Q, Xie Y, Huang Y, Wu Q, Zhang H, Xiong S, et al. Induction of apoptosis and inhibition of angiogenesis by PEGylated liposomal quercetin in both cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant ovarian cancers. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(6): 965-975.
58. Zhang Y, Cao L, Nguyen D, Lu H. Tp53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl Cancer Res* 2016; 5(6): 650-663.
59. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 749-758.
60. Kim J, Coffey DM, Ma L, Matzuk MM. The ovary is an alternative site of origin for high-grade serous ovarian cancer in mice. *Endocrinology* 2015; 156(6): 1975-1981.
61. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 622: 99-117.
62. Bar JK, Słomska I, Rabczyńska J, Noga L, Gryboś M. Expression of p53 protein phosphorylated at serine 20 and serine 392 in malignant and benign ovarian neoplasms: correlation with clinicopathological parameters of tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(8): 1322-1328.
63. Zhang Y, Cao L, Nguyen D, Lu H. Tp53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl Cancer Res* 2016; 5(6): 650-663.
64. Gong C, Yang Z, Zhang L, Wang Y, Gong W, Liu Y. Quercetin suppresses DNA double-strand break repair and enhances the radiosensitivity of human ovarian cancer cells via p53-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 17-27.