Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Short Communication

Simultaneous effect of progesterone and berberine on the level of reactive oxygen species in K562 cell

Mohammad Zangooei[1], **Vahid Bagheri**[1]*

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is an uncommon type of white blood cells cancer that originates from bone marrow stem cells. Progesterone (P4) and berberine (BBR) are bioactive compounds that inhibit the growth of tumor cells. The present study aimed to assess the simultaneous effect of P4 and BBR on the level of reactive oxygen species (ROS) in K562 cells. The K562 cells were cultured in a complete cell culture medium and simultaneously exposed to IC_{50} different concentrations of P4 and BBR at 24 h (P4:102.4 µM; BBR:125 µM), 48 h (P4:78.4 µM; BBR:114 µM), and 72 h (P4:70 µM; BBR:45 µM). Then, the cell viability and cellular ROS level were determined using MTT assay and 2′, 7′-dichlorofluorescin diacetate (DCF) by flow cytometry, respectively. Our results showed that the combination of P4 and BBR inhibited the cells more effectively than P4 and BBR alone at 72 h, as well as P4 and their combination reduced ROS level in the cells compared to BBR and untreated cells at 24 h and 72 h. Taken together, P4 through a ROS-dependent pathway and BBR through a ROS-independent pathway may be inhibited cell growth.

Keywords: Berberine, Cell survival, Berberine, CML, K562 cells, Progesterone, Reactive oxygen species

Citation: Zangooei M, Bagheri V. [Simultaneous effect of progesterone and berberine on the level of reactive oxygen species in K562 cell]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(1): 99-106. [Persian]

DOI http://doi.org/10.

Received: January 27, 2023 **Accepted:** May 1, 2023

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Cellular and Molecular Research Center, Department of Medical Immunology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
***Corresponding author:** Cellular and Molecular Research Center, Department of Medical Immunology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
Tel: +989173311880 Fax: +985632433004 E-mail: eftekhar2006@gmail.com

مقاله کوتاه

اثر همزمان پروژسترون و بربرین بر سطح گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های K562

محمد زنگویی[۱]، وحید باقری[۲]*

چکیده

لوسمی میلوئید مزمن (CML) یکی از انواع غیرشایع سرطان خون است که از سلول‌های بنیادی مغز استخوان منشا می‌گیرد. پروژسترون (P4) و بربرین (BBR) ترکیبات زیست فعالی هستند که رشد سلول‌های تومور را مهار می‌کنند. در این مطالعه، ما اثر همزمان P4 و BBR را بر روی سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های K562 ارزیابی کردیم. سلول‌های K562 در محیط حاوی سرم کشت شدند و به طور همزمان با غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR در زمان‌های ۲۴ (۱۲۵ میکرومولار:BBR؛ ۱۰۲/۴ میکرومولار:P4)، ۴۸ (۱۱۴ میکرومولار:BBR؛ ۷۸/۴ میکرومولار:P4) و ۷۲ (۴۵ میکرومولار:BBR؛ ۷۰ میکومولار:P4) ساعت تیمار شدند. سپس بقای سلولی و سطح ROS به ترتیب با استفاده از روش MTT و دی کلروفلورسین دی استات (DCF) توسط فلوسایتومتری تعیین شد. نتایج ما نشان داد که ترکیب P4 و BBR سلول‌ها را به طور مؤثرتری نسبت به P4 و BBR به تنهایی در ۷۲ ساعت مهار کرده و همچنین P4 و ترکیب آن‌ها باعث کاهش سطح ROS در سلول‌ها در مقایسه با BBR و سلول‌های تیمار نشده در ۲۴ و ۷۲ ساعت گردید. به‌طور خلاصه می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً P4 از طریق مسیر وابسته به ROS و BBR از طریق مسیر مستقل از ROS، رشد سلول‌ها را مهار کرده باشد.

واژه‌های کلیدی: بربرین، بقا سلولی، لوسمی میلوئید مزمن، سلول‌های K562، پروژسترون، گونه‌های فعال اکسیژن

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰(۱): ۹۹-۱۰۶.

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱

[۱] گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی

تلفن: ۰۹۱۷۳۳۱۱۸۸۰ پست الکترونیکی: eftekhar2006@gmail.com

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن[1] (CML) یک بیماری پرولیفراتیو است که عمدتاً رده گرانولوسیتی را درگیر می‌کند. CML، ۱۵ درصد لوسمی‌ها را در بزرگسالان تشکیل می‌دهد. اکثر افراد بدون داشتن فاکتور خطر خاصی به این بیماری مبتلا می‌شوند. با این وجود، تماس با اشعه، جنس و افزایش سن در بروز آن نقش دارند. با افزایش سن خطر ابتلا افزایش پیدا می‌کند و میانگین سن بروز این بیماری ۶۷ سال می‌باشد (۱). ویژگی سیتوژنتیکی بارز CML کروموزوم فیلادلفیا (Ph) است که به وسیله یک جابجایی دوطرفه بین کروموزوم ۹ و ۲۲ اتفاق افتاده و در نتیجه، ژن سرطان‌زای جدیدی به نام BCR-ABL1[2] ایجاد می‌شود. این نئوپلازی با افزایش تنظیم نشده سلول‌های میلوئیدی در مغز استخوان و تجمع آن‌ها در خون همراه می‌باشد (۲). BCR-ABL1 مشخصه و علت CML است که مزیت رشد و تکثیر برای این سلول‌ها را به همراه دارد. با این وجود پیشرفت بیماری ممکن است لزوماً با این پروتئین در ارتباط نباشد و برخی از اثرات مرتبط با بی‌ثباتی ژنومی به علت افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن[3] (ROS) باشد. تولید بیش از حد ROS که مرتبط با مسیر سیگنالینگ BCR-ABL1 است می‌تواند به DNA آسیب برساند، ناپایداری ژنومی را افزایش داده و خود جهش‌زایی BCR-ABL1 (self-mutagenesis) را ارتقاء دهد. بنابراین تعادل بین تولید ROS ناشی از BCR-ABL1 و میزان بی‌ثباتی ژنومی برای بقای سلول‌های CML ضروری است. مشکل خود جهش زایی BCR-ABL1 ناشی از ROS به طور مستقیم با درمان CML مرتبط است (۳).

هورمون‌های جنسی با تأثیر بر کنترل میزان تقسیم و تمایز سلول‌ها بر خطر بروز سرطان‌ها اثرگذار هستند. پروژسترون (P4) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است و از طریق تعدیل ROS، رشد سلول‌های سرطانی در سرطان‌های تخمدان و آندومتر را مهار کرده و آپوپتوز را در این سلول‌ها القا می‌کند (۴). بربرین (BBR) یک آلکالوئید ایزوکوئینولین با اثرات ضد توموری است که در گیاهانی مانند زرشک و زرد چوبه یافت می‌شود (۵). مطالعات نشان داده‌اند که ارتباط قوی بین القای آپوپتوز و تولید ROS توسط بربرین وجود دارد (۶). بنابراین با توجه به اهمیت نقش ROS در CML، هدف از مطالعه کنونی ارزیابی اثر همزمان P4 و BBR بر روی تولید ROS در مقایسه با اثر P4 و BBR به تنهایی بر روی سلول های K562 بود.

روش تحقیق

مواد

محیط کشت RPMI 1640، FBS و آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت ایده زیست ایران تهیه شدند. رنگ MTT و دی کلروفلورسین دی استات (DCF) تولید شرکت سیگما آمریکا از شرکت آرک زکریا ایران خریداری شدند.

کشت سلولی

در تمام مراحل این مطالعه سلول های K562 که از بانک سلولی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند تهیه شده در شرایط زیر کشت شدند: محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ λg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در درون انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۰ درصد.

بررسی بقای سلولی سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف P4 و BBR به تنهایی و با ترکیب غلظت‌های IC_{50}[4] (نیمی از حداکثر غلظت مهاری) P4 و BBR با استفاده از روش MTT

به منظور بررسی اثر تیمار همزمان P4 و BBR بر میزان بقای سلولی، سلول‌های K562 به صورت سوسپانسیون درآورده و سپس در درون هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه، تعداد $۱۰^۴ \times ۳$ سلول کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف P4 (۲۵۰–۵ میکرومولار) و BBR (۱۲۵–۱۰ میکرومولار)

[1] Chronic myelogenous leukemia
[2] Breakpoint cluster region protein-abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
[3] Reactive oxygen species
[4] Half-maximal inhibitory concentration

به تنهایی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و همچنین به صورت ترکیب غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR در زمان‌های ۲۴ (۱۲۵ میکرومولار:BBR؛ ۱۰۲/۴ میکرومولار:P4)، ۴۸ (۱۱۴ میکرومولار:BBR؛۷۸/۴ میکرومولار:P4) و ۷۲ (۴۵ میکرومولار:BBR؛۷۰ میکومولار:P4) ساعت تیمار شدند. میزان مرگ و میر سلولی با استفاده از تست رنگ سنجی MTT بررسی شد. ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به همه چاهک‌ها اضافه کرده، سپس به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۱۵۰ میکرولیتر DMSO بلافاصله به همه چاهک‌ها اضافه کرده و پلیت در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. در پایان میزان شدت رنگ تولید شده در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانش شد.

بررسی اثر همزمان P4 و BBR بر میزان ROS درون سلولی

پس از کشت سلول‌ها و شمارش آن‌ها، تعداد $۱۰^{۵} \times ۷$ در پلیت‌های ۶ خانه کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR به صورت ترکیب و به صورت جداگانه در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. برای اندازه‌گیری ROS درون سلولی از ماده DCF استفاده شد. به‌طور خلاصه، پس از تیمار سلول‌ها و سانتریفیوژ آن‌ها، رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات حل کرده و به آن DCF اضافه کرده و سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از دو بار شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، شدت فلورسانس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری CyFlow® Cube 6 (Sysmex, Germany) اندازه‌گیری و داده‌ها با نرم‌افزار فلوجو (Flowjo) آنالیز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SD) بیان شدند. گروه‌ها با استفاده از روش آماری One-Way ANOVA مقایسه گردید. $P\leq ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

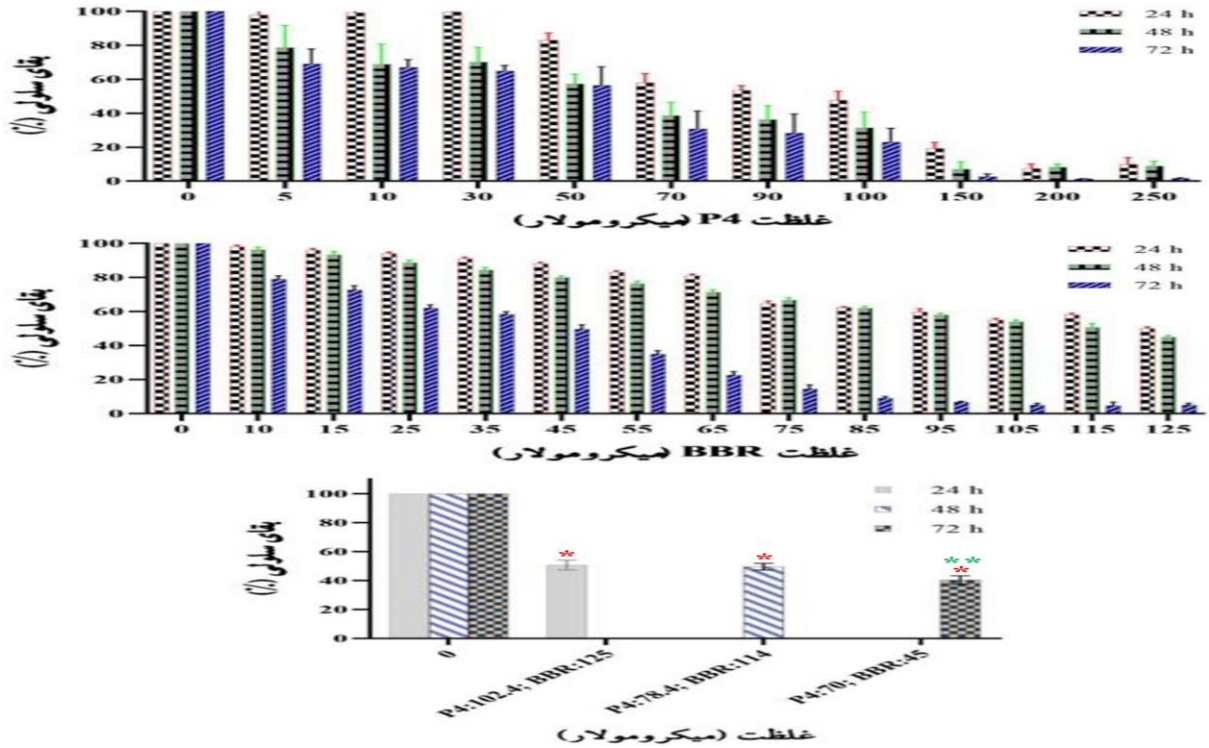
مطالعه حاضر توسط شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد IR.BUMS.REC.1402.156 تأیید شد.

یافته‌ها

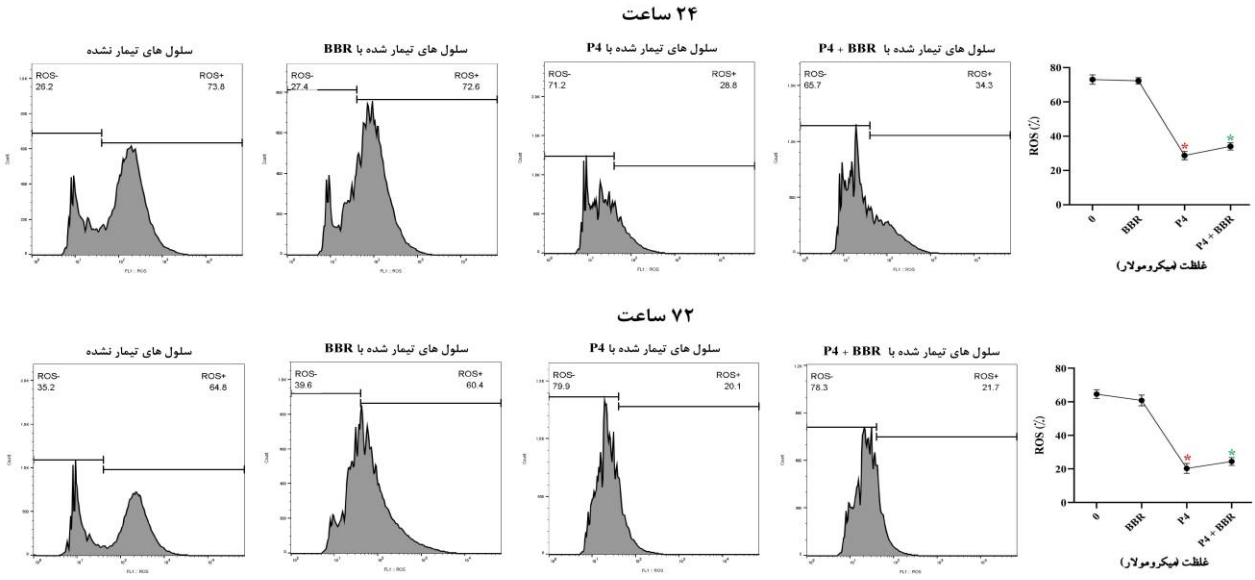
نتایج مربوط به تیمار P4 و BBR به تنهایی و ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان بقای سلول‌های K562 در شکل ۱ نشان داده شده است.

در تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR، بقای سلولی نسبت به گروه تیمار نشده به ترتیب ۳/۴±۵۰/۷۳، ۲/۳۵±۴۹/۷۶ و ۳۳/۹۷±۴۰/۲ درصد بود که اثر معنی‌داری بر بقای سلول‌ها داشت ($P<۰/۰۰۱$). با این وجود، در مقایسه اثر همزمان مجموع دو دارو بر روی سلول‌های K562 با اثر هر یک از داروها به تنهایی در غلظت‌های IC_{50}، تنها در تیمار ۷۲ ساعت معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$).

نتایج مربوط به اثر همزمان غلظت‌های IC_{50}، P4 و BBR در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بر سطح ROS با استفاده از آنالیز داده‌های فلوسایتومتری نشان داد (شکل ۲) که تیمار سلول‌ها با ترکیب P4 و BBR و با P4 به تنهایی سطح ROS سلول‌ها را در زمان های ۲۴ و ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های تیمار نشده کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). با این وجود تیمار سلول‌ها با BBR سطح ROS را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده به طور معنی‌داری کاهش نداد.



شکل ۱- اثر همزمان غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR بر سلول‌های K562. پس از اثر P4 و BBR بر روی سلول‌های K562 و محاسبه IC_{50}، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف IC_{50}، P4 و BBR به صورت ترکیب در زمان‌های ۲۴ (۱۲۵ میکرومولار:BBR؛ ۱۰۲/۴ میکرومولار:P4)، ۴۸ (۱۱۴ میکرومولار:BBR؛ ۷۸/۴ میکرومولار:P4) و ۷۲ (۴۵ میکرومولار:BBR؛ ۷۰ میکرومولار:P4) تیمار شده و بقای سلولی اندازه‌گیری شد. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. $P\leq$۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. $P<$۰/۰۰۱*؛ مقایسه سلول‌های تیمار شده با ترکیب دو ماده با سلول‌های تیمار نشده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، $P<$۰/۰۰۱**؛ مقایسه سلول‌های تیمار شده با ترکیب دو ماده با سلول‌های تیمار شده با یک ماده در زمان ۷۲ ساعت. IC_{50}؛ نیمی از حداکثر غلظت مهاری.



شکل ۲- اثر P4 و BBR و ترکیب آن‌ها بر سطح ROS سلول‌ها. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های IC_{50} P4، BBR و ترکیب آن‌ها، سطح ROS سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت با استفاده از فلوسایتومتری و نرم‌افزار فلوجو (FlowJo) بررسی شد. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. $P\leq$۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. $P<$۰/۰۰۱*، $P<$۰/۰۰۱*. IC_{50}؛ نیمی از حداکثر غلظت مهاری.

بحث

شواهد مختلفی در مورد دخالت استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی بدخیمی و فارماکوکینتیک درمان‌های انکولوژیک وجود دارد. برخی از گزارش‌ها از دخالت ROS در شروع و پیشرفت بیماری و ایجاد مقاومت در درمان حمایت می‌کنند (۷) و برخی دیگر از اثر پروآپوپتوتیک استرس اکسیداتیو ایجاد شده با برخی از درمان‌های سرطانی پشتیبانی می‌کنند (۸). در مورد CML، بیشتر شواهد علمی از دخالت استرس اکسیداتیو در شروع جهش ژنتیکی مسئول انکوژن BCR-ABL حمایت می‌کند. علاوه بر آن انکوژن مسئول تولید مقدار زیادی ROS است که مسئول پیشرفت بیماری، جهش‌های بیشتر و ایجاد مقاومت درمانی می‌باشد (۹).

P4 دارای اثرات ضد توموری می‌باشد به‌طوری که رشد سلول‌های سرطانی را مهار و آپوپتوز را القا می‌کند (۴). در مطالعه‌ای که در زمینه CML انجام شده مدروکسی پروژسترون استات باعث از بین رفتن سلول‌های بلاست در خون محیطی و بهبودی با حضور کمتر از ۵ درصد بلاست در مغز استخوان یک بیمار مبتلا به CML شده است (۱۰). BBR هم با مکانیسم‌های مختلفی اثرات ضد توموری خود را اعمال می‌کند (۱۱). نتایج مربوط به مطالعه کنونی نشان داد که ترکیب غلظت IC_{50}، P4 و BBR در زمان ۷۲ ساعت نسبت به غلظت IC_{50}، P4 و BBR به تنهایی، بقای سلول‌های K562 را حدود ۱۰ درصد بیشتر کاهش می‌دهد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که اثر هم‌افزایی این دو دارو وابسته به زمان است.

افزایش سطح ROS می‌تواند با بسیاری از سرطان‌ها مرتبط باشد، اما تعیین اینکه آیا ROS به علل یا پیامدهای بیماری تعلق دارد دشوار است. به نظر می‌رسد که هر دو پیامد می‌توانند در موارد بسیار زیادی رخ دهند. اگر سلولی در معرض ROS قرار گیرد سبب آسیب ژن ترمیم DNA و متعاقب آن افزایش شانس تجمع آسیب‌های DNA در تقسیمات بعدی سلولی،که به نوبه خود منجر به ناپایداری ژنومی و افزایش احتمال کسب یک جهش در ژن مرتبط با سرطان می‌گردد. نقص در ترمیم DNA سبب می‌شود که روی ROS داخل سلولی کنترل ضعیف‌تری صورت گیرد و منجر به افزایش سطح این گونه‌ها در سرطان گردد. این یک سناریوی کلی است، اما در سرطان‌های خاص، منبع ROS را می‌توان به برخی از ویژگی‌های خاص سرطان نسبت داد. این حالت در CML صدق می‌کند. BCR-ABL1، عامل CML، باعث تولید ROS و استرس اکسیداتیو می‌شود (۳). P4 با مهار تولید ROS، کاهش متابولیسم کربونیل پروتئین و متابولیسم پراکسیداسیون لیپیدی، تنظیم مثبت p53 و BAX و کاهش BCL-2 در سلول‌های سرطانی، آپوپتوز را القا می‌کند. (۴, ۱۲). در این مطالعه همانند مطالعات قبلی (۳, ۴, ۱۲)، P4 سبب کاهش تولید ROS در سلول‌های K562 گردید. بنابراین P4 دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است و کاهش استرس اکسیداتیو توسط P4 می‌تواند پیامدهای درمانی قابل توجهی داشته باشد.

BBR با تنظیم چرخه سلولی و اتوفاژی و افزایش آپوپتوز سلولی، از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند. این ماده همچنین با سرکوب فرآیند گذار اپیتلیال–مزانشیمی (epithelial–mesenchymal transition; EMT) و کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با متاستاز و مسیرهای سیگنالینگ، تهاجم و متاستاز سلولی را مهار می‌کند. علاوه بر این، BBR از طریق تعامل با microRNAها و سرکوب فعالیت تلومراز، از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند. BBR خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند و همچنین ریزمحیط تومور را تنظیم می‌کند. این ماده در برخی از سلول‌ها باعث افزایش ROS و القا آپوپتوز و در برخی با مهار ROS از طریق مسیرهای سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۳, ۱۴). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ گزارش شده BBR از طریق مهار سطح ROS، سلول‌های P12 از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۴). بر عکس در مطالعه‌ای دیگر، BBR با افزایش سطح ROS، مقاومت سلول‌های سرطان سینه HER2 مثبت به لاپاتینیب (lapatinib) را معکوس می‌کند (۱۵). با این وجود در مطالعه ما، اثر BBR بر روی سلول‌های K562 سبب کاهش محسوسی در تولید ROS نگردید. علاوه بر آن، تیمار سلول‌ها با ترکیب P4 و BBR در مقایسه با تیمار آن‌ها با P4 تغییر

زیادی در کاهش ROS نشان نداد. بنابراین به احتمال زیاد BBR از مسیری دیگر سبب کاهش رشد سلول می‌گردد که نیازمند مطالعه بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ترکیب P4 و BBR با گذشت زمان بقای سلول‌های K562 را کاهش داد. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که این دو ترکیب بر هم اثر سینرژیک یا هم افزایی دارند. P4 به تنهایی یا به صورت ترکیب با BBR، سطح ROS سلول‌ها را تقلیل داد. با این وجود در مقایسه بین اثر ترکیب دو ماده با P4 به تنهایی، در سطح ROS سلولی کاهش محسوسی مشاهده نشد. همچنین تیمار BBR در سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده تأثیر چندانی بر سطح ROS درون سلولی ایجاد نکرد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً P4 و BBR به ترتیب از طریق مسیر وابسته به ROS و مستقل از ROS، رشد سلول‌ها را مهار کرده باشند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "اثر همزمان پروژسترون و بربرین بر سطح گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های K562"، در سال ۱۴۰۲ با کد ۶۳۱۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اجرا شده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Radivoyevitch T, Jankovic GM, Tiu RV, Saunthararajah Y, Jackson RC, Hlatky LR, et al. Sex differences in the incidence of chronic myeloid leukemia. Radiat Environ Biophys. 2014; 53(1): 55-63. DOI: 10.1007/s00411-013-0507-4

2- Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood. 2008; 112(13): 4808-17. DOI: 10.1182/blood-2008-07-077958

3- Antoszewska-Smith J, Pawlowska E, Blasiak J. Reactive oxygen species in BCR-ABL1-expressing cells - relevance to chronic myeloid leukemia. Acta Biochim Pol. 2017; 64(1): 1-10. DOI: 10.18388/abp.2016_1396

4- Nguyen H, Syed V. Progesterone inhibits growth and induces apoptosis in cancer cells through modulation of reactive oxygen species. Gynecol Endocrinol. 2011; 27(10): 830-6. DOI: 10.3109/09513590.2010.538100

5- Zhang C, Sheng J, Li G, Zhao L, Wang Y, Yang W, et al. Effects of Berberine and Its Derivatives on Cancer: A Systems Pharmacology Review. Front Pharmacol. 2019; 10: 1461. DOI: 10.3389/fphar.2019.01461

6- Habtemariam S. Recent Advances in Berberine Inspired Anticancer Approaches: From Drug Combination to Novel Formulation Technology and Derivatization. Molecules. 2020; 25(6). DOI: 10.3390/molecules25061426

7- Tong L, Chuang CC ,Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. Cancer Lett. 2015; 367(1): 18-25. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.008

8- Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. Apoptosis. 2017; 22(11): 1321-35. DOI: 10.1007/s10495-017-1424-9

9- Pascu VEG, AM GA. Assessment of Oxidative Stress in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Depending on Associated Comorbidities. Curr Health Sci J. 2020; 46(1): 23-30. DOI: 10.12865/CHSJ.46.01.04

10- Fink M. Possible effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) in lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukemia. Ann Hematol. 1994; 68(2): 89-90. DOI: 10.1007/BF01715138

11- Achi IT, Sarbadhikary P, George BP, Abrahamse H. Multi-Target Potential of Berberine as an Antineoplastic and Antimetastatic Agent: A Special Focus on Lung Cancer Treatment. Cells. 2022; 11(21): 3433. DOI: 10.3390/cells11213433

12- Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. Circ Res. 2005; 97(10): 1046-54. DOI: 10.1161/01.RES.0000188212.57180.55

13- Wang Y, Liu Y, Du X, Ma H, Yao J. The Anti-Cancer Mechanisms of Berberine :A Review. Cancer Manag Res. 2020; 12: 695-702. DOI: 10.2147/CMAR.S242329

14- Li Z, Jiang T, Lu Q, Xu K, He J, Xie L, et al. Berberine attenuated the cytotoxicity induced by t-BHP via inhibiting oxidative stress and mitochondria dysfunction in PC-12 cells. Cell Mol Neurobiol. 2020: 40(4): 587-602. DOI: 10.1007/s10571-019-00756-7

15- Zhang R, Qiao H, Chen S, Chen X, Dou K, Wei L, et al. Berberine reverses lapatinib resistance of HER2-positive breast cancer cells by increasing the level of ROS. Cancer Biol Ther. 2016; 17(9): 925-34. DOI: 10.1080/15384047.2016.12107288