مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم ، شماره بیست و یکم - زمستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

سنتز، شناسایی ساختاری و مطالعه های برون تنی از تاثیرات ضدتکثیری و القاء آپوپتوز کمپلکس جدیدی از اکسوواناديم (IV)-کورکومین

مهسا نظری[۱]، امیر شکوه سلجوقی[*۱]

۱- دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی.

چکیده

سابقه و هدف: ترکیبات وانادیوم دارای دو نقش مهارکنندگی و ضدتوموری در مقابل عوامل شیمیایی مولد سرطان در انواع رده های سلولی می باشند. هم چنین مطالعه ها نشان داده اند که کورکومین در غلظت های خیلی کم، موجب القاء آپوپتوز و مهار تکثیر سلول های سرطانی می شود. هدف از این مطالعه، سنتز کمپلکس جدیدی از وانادیم-کورکومین و ارزیابی اثرات آپوپتیک و ضدتکثیری این ترکیب می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، کمپلکس (۱و۷-بیس ۴[-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل]-۱و۶-هپتادی ان-۳و۵-دی اوناتو) استیل استوناتو اکسو وانادیم (IV) سنتز گردید. سایتوتوکسیسیته این کمپلکس به منظور ارزیابی فعالیت ضد سرطانی آن بر روی رده های سلولیHeLa ، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲ و Neuro-۲a با روش MTTو فلوسایتومتری و استفاده از سیس پلاتین به عنوان مرجع، بررسی گردید. همزمان اثر این ترکیب سنتزی بر سلول های نرمال فیبروبلاست موش (L۹۲۹) به عنوان شاهد ارزیابی شد.

یافته ها: $IC_{۵۰}$ ± SD (µM)به دست آمده از اثر کمپلکس سنتز شده بر روی رده های سلولی HeLa، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲، Neuro-۲a و L۹۲۹ به ترتیب ۶۵/۲۳ ± ۵/۱، ۴۸/۰۵ ± ۲/۱، ۶/۱۹ ± ۴۲/۵، ۹۹/۱۲ ± ۳/۱، ۳/۸۹ ± ۶۵/۶ و ۷/۹۸ ± ۱۰۶/۸ می باشد. در حالی که $IC_{۵۰}$ ± SD (µM)سیس پلاتین به عنوان یک داروی استاندارد در شیمی درمانی سرطان برروی همین رده های سلولی به ترتیب ۴۵/۱۲ ± ۰/۰، ۵۰/۱۱ ± ۶/۲، ۴/۹۳ ± ۱۵/۴، ۰/۹۳ ± ۲۴/۲ و ۲۰۰< به دست آمد. . نتایج فلوسایتومتری کمپلکس مورد نظر نیز جمعیت زیادی از سلول ها را در نواحی آپوپتوز (۵۸/۴۶) و ۱/۲ برابر بیش تر از سیس پلاتین (۴۸/۰۳) در غلظت یکسان نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده سایتوتوکسیسیته ی بیشتری را برای کمپلکس مورد نظر در مقابل رده های سلولی K-۵۶۲ و MCF-۷ نشان داد. نتایج به دست آمده اثبات می کند کمپلکس سنتز شده هیچ گونه تأثیر سایتوتوکسیکی بر روی بر سلول های نرمال فیبروبلاست موش (L۹۲۹)ندارد. هم چنین نتایج فلوسایتومتری کمپلکس وانادیم، بیانگر این است که کمپلکس جدید سنتز شده می تواند منجر به آپوپتوز سلول های سرطانی K-۵۶۲ شود.

کلمات کلیدی: وانادیم، کورکومین، روش MTT، فلوسایتومتری، MCF-۷، K-۵۶۲، L۹۲۹.

مقدمه

امروزه سرطان[۱] یکی از مهم ترین معضلات سلامتی در سراسر دنیا به حساب می آید که به معنای رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیر طبیعی سلول های بدن است (۲). از روش های درمان سرطان می توان به جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی، ژن درمانی و غیره اشاره کرد. به طور کلی بسیاری از داروهای شیمیایی که به منظور شیمی درمانی سرطان به کار برده می شوند، اغلب سبب تغییر هایی درفرایند تقسیم سلولی شده و بدین ترتیب، تکثیر و تمایز سلول سرطانی متوقف می شود. در سنتز این دارو ها علاوه برآن که خاصیت سایتوتوکسیک آن ها در برابر سلول های سرطانی حائز اهمیت است، این ویژگی که کم ترین اثرات جانبی را نیز بر روی سلول های سالم فرد بیمار داشته باشد، از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از مؤثرترین داروهای شیمی درمانی، سیس پلاتین است اما ایراد اساسی آن سمیت این دارو است که به سلول های سالم فرد نیز صدمه می زند (۲۶). بنابراین دانشمندان سعی دارند تا داروهای جدیدتری با اثرات سمی پایین را جایگزین این داروهای سمی کنند.

نویسنده مسئول :
دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی.
آدرس الکترونیک: saljooghi@um.ac.ir
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۰۹/۱۰
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۷/۰۸

۱ Cancer

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

در سال های اخیر توجه زیادی به یافتن ترکیبات ضد سرطانی جدید حاوی یون های فلزی شده است (۱۸).

وانادیوم[۲]، عنصری است که به همراه چندین ترکیب شیمیایی اش، از جهت علمی و بیولوژیکی بسیار مورد توجه می باشند زیرا مشخص شده که این مشتقات، دارای خصوصیات فیزیولوژیکی ارزشمندی می باشند. وانادیوم در غلظت های بسیار پایین دارای خصوصیات ضدسرطانی بدون سمیت جانبی می باشد (۱۲). ترکیبات وانادیوم دارای دو نقش مهارکنندگی و ضدتوموری در مقابل عوامل شیمیایی مولد سرطان در جانوران و در انواع رده های سلولی می باشند. در گزارش ها، آمده است که ترکیبات وانادیوم ممکن است القاءکننده توقف سیکل سلولی، قطعه قطعه کردن DNA و شکافتن آن و لیپوپراکسیداسیون غشاء پلاسمایی شوند (۸). اولین بار اثرات ضد سرطانی وانادیوم در مطالعه ای بر روی سرطان سینه القاء شده در رت در سال ۱۹۸۴ مورد آزمایش قرار گرفت (۲۸). مطالعه ها بعدی اثربخشی ترکیبات وانادیوم را بر روی رده های مختلف سلول های سرطانی انسان از قبیل سرطان کبد (۳۲)، سرطان سینه (۲۰)، لوسمی (۲۹)، کلیه (۱۹)، تخمدان (۱۱)، بیضه (۹) و سلول های اپیتلیال (۱۰) نشان دادند. کمپلکس های مختلف وانادیوم دارای اثرات ضد سرطانی بیشتری در شرایط برون تنی (*in vitro*) و درون تنی (*in vivo*) نسبت به نمک های چهار و پنج ظرفیتی وانادیوم می باشند (۱۵). ساختن کمپلکس وانادیل[۳] با یک آنتی اکسیدان شناخته شده نظیر کورکومین[۴]، در افزایش توانایی وانادیل به عنوان عامل کاهنده ی قند خون گزارش شده است (۲۴). کورکومین با نام شیمیایی ۱و۷-بیس[۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل]-۱و۶-هپتادی ان-۳و۵-دی اون، (شکل ۱) که ۵-۲ درصد مواد موجود در زرد چوبه را تشکیل می دهد، از ریزوبیوم گیاه کورکومین لونگا[۵] متعلق به خانواده[۶] زینگی براسئا[۶] جدا شده است (۲۱). کورکومین یا دی- فرولویل متان[۷]، اولین بار در سال ۱۸۱۵ توسط وگل[۸] خالص و جداسازی شد و در سال ۱۸۷۰ توسط دائوبه[۹] به صورت کریستال و پودر درآمد (۱۳). در مطالعه ها بالینی اثرات دارویی متعددی را برای کورکومین گزارش دادند که می توان به اثرات ضد التهابی (۲۵)، ضد میکروبی (۱۴)، درمان بیماری های دیابتی (۲۳)، آرتریت روماتوئید (۵)، آلزایمر (۴) و سرطان (۳) اشاره کرد. مطالعه ها برون تنی نشان داد که کورکومین در غلظت های خیلی کم، از طریق القاء آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) و مهار تکثیر سلول های سرطانی، موجب مهار رشد سلول های سرطانی می شود. این مرگ سلولی با تکه تکه شدن DNA و توقف چرخه سلولی در فازهای سنتز و G۲/M اتفاق می افتد. القاء آپوپتوز سلول سرطانی توسط کورکومین به دلیل آزادسازی سیتوکروم C، تولید گونه های فعال اکسیژن و تأثیر روی پروتئین p۵۳ می باشد و هم چنین سیگنال های داخل سلولی که مسئول آسیب DNA و توقف رشد سلولی هستند را فعال می کند (۲۲).

در مطالعه ای سمیت سلولی وانادیل کورکومین بر روی رده های سلولی لنفوم موش و سلول های ماهیچه ای مورد بررسی قرار گرفته است (۲۷). در این مطالعه نیز با توجه به اثرات مشاهده شده در کورکومین و خصوصیات ضد سرطانی وانادیم، کمپلکس جدیدی از وانادیم با لیگاند کورکومین سنتز شد. پس از سنتز، خاصیت ضد سرطانی و سایتوتوکسیک آن بر روی رده های سلولیHeLa (کارسینومای تخمدان انسانی)، MCF-۷ (سرطان سینه انسانی)، HT-۲۹ (سرطان روده بزرگ انسانی)، K-۵۶۲ (سرطان سلول های میلوییدی خون انسان) و Neuro-۲a (نوروبلاستوما موشی) با روش MTTو فلوسایتومتری بررسی گردید. هم چنین به منظور مقایسه خاصیت سایتوتوکسیک این ترکیب با داروهای رایج در شیمی درمانی، خاصیت سایتوتوکسیک داروی سیس پلاتین نیز به عنوان مرجع، مورد بررسی گرفت.

مواد و روش ها

حلال ها و (استیل استوناتو) اکسو وانادیم (IV) از شرکت مِرک[۱۰] آلمان خریداری شدند. کورکومین و سیس پلاتین از شرکت سیگما-آلدریچ[۱۱]، سرم جنین گاوی و محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ و Dulbeccos modified Eagles (DMEM) از شرکت جیبکو[۱۲]، پنی سیلین و استرپتومایسین از شرکت بیوکروم ای جی[۱۳] آلمان، MTT (دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیم برماید) از شرکت سیگما[۱۴]، و رده های سلولی HeLa، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲ و Neuro-۲a از انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شدند.

سنتز کمپلکس (۱و۷-بیس[۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل]-۱و۶-هپتادی ان-۳و۵-دی اوناتو) استیل استوناتو اکسو وانادیم (IV) ، [VO(Curc)(acac)]

برای تهیه ی کمپلکس [VO(Curc)(acac)] (شکل ۲)، مقدار ۰/۱ میلی مول (۰/۰۲۶گرم) (استیل استوناتو) اکسو وانادیم (IV)، [$VO(acac)_2$] را در ۱۰ میلی لیتر متانول گاززدایی شده[۱۵] حل نموده و آن را، قطره قطره به محلول حاوی ۱۰ میلی لیتر متانول

۲ Vanadium
۳ Vanadyl
۴ Curcumin
۵ Curcumin longa
۶ Zingi beraceae
۷ Diferuloylmethan
۸ Vogel
۹ Daube

۱۰ Merck
۱۱ Sigma Aldrich
۱۲ GIBCO (Gaithersburg, USA)
۱۳ Biochrom AG (Berlin, Germany)
۱۴ Sigma
۱۵ Degassed

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

گاززدایی شده و ۰/۱ میلی مول (۰/۰۳۶ گرم) لیگاند کورکومین افزوده شد. مخلوط واکنش برای ۲ ساعت تحت گاز آرگون رفلاکس و سپس در دمای اتاق سرد می شود. محصول جامد به وسیله ی صاف کردن، جدا شده و با متانول سرد شسته و به مدت یک شبانه روز تحت خلاء در دمای اتاق خشک می شود.

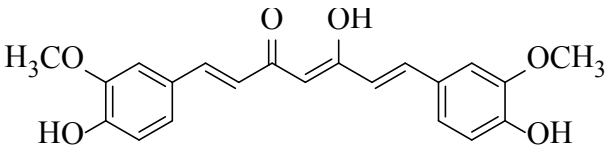
روش های طیف سنجی

ساختار کمپلکس سنتز شده به روش های اندازه گیری نقطه ی ذوب، طیف سنجی جرمی و طیف سنجی تبدیل فوریه زیر قرمز (FT- IR) شناسایی شد. طیف سنجی تبدیل فوریه زیر قرمز برای کمپلکس سنتز شده توسط دستگاه/FT-IR Nicolet Thermo VATARA مدل ۳۷۰ با استفاده از قرص پتاسیم برمید در بازه ی ۴۰۰۰-۴۰۰ cm^{-1} انجام گرفت. آنالیز جرمی کمپلکس با استفاده از دستگاه Marian CHvA انجام گردید و دمای ذوب با استفاده از دستگاه Thermo Fisher Scientific مدل ۹۳۰۰ اندازه گیری شد.

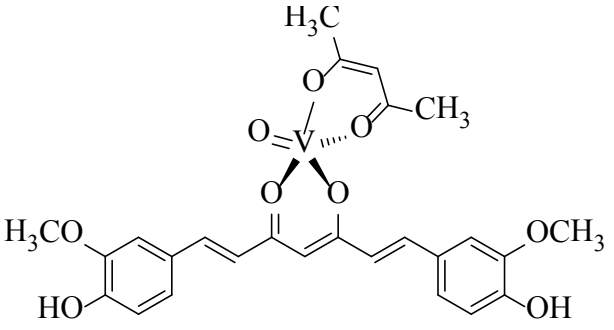
اطلاعات طیفی

در طیف FT-IR مربوط به کمپلکس (۱و۷- بیس۴[-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل] -۱و۶-هپتا دی ان-۳و۵-دی اوناتو) استیل استوناتو اکسو وانادیم (IV)، پیکی در ناحیه cm^{-1} ۱۶۱۹ مشاهده می شود که به فرکانس کششی گروه (C=O)تعلق دارد و هم چنین پیک های ناحیه cm^{-1} ۹۷۲ و cm^{-1} ۷۳۰ به ترتیب مربوط به فرکانس های کششی (V=O) و (V-O) می باشند. هم چنین در طیف جرم کمپلکس، پیک یون مولکولی در m/z ۵۳۳ ظاهر شده است که تاییدی بر سنتز کمپلکس می باشد.

FT-IR (cm^{-1}): ۳۵۰۳.۹, ۱۶۱۹.۹ (C=O), ۱۵۹۰.۴, Mp ۳۱۰ °C. ۱۵۱۰.۶, ۱۲۸۲.۲, ۱۱۵۴.۱, ۹۹۱.۹, ۹۷۲.۰ (V=O), ۸۴۶.۵, ۷۳۰.۹ (V-O), MS (+ESI) m/z =۵۳۳ $[M + H]^+$. ۴۷۰.۴۷.



شکل ۱: ساختار شیمیایی کورکومین.



شکل ۲: ساختار کمپلکس فلزی تهیه شده در این مطالعه.

رده سلولی و کشت سلول

رده های سلولی MCF-۷، HT-۲۹ و L۹۲۹ که در محیط کشت Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) حاوی ۱۰ سرم جنین گاوی (FBS ۱۰)، پنی سیلین (U/ml ۱۰۰) و استرپتومایسین (µg/ml ۱۰۰) می باشد، رشد می کنند. این سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در فشار ۵ CO_2 انکوبه می شوند، سلول های Neuro۲-A که در محیط کشت Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) شامل ۱g/L گلوکز و ۲mM گلوتامین به همراه FBS ۱۰، پنی سیلین (U/ml ۱۰۰) و استرپتومایسین (µg/ml ۱۰۰) می باشد، رشد می‌کنند. این سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در فشار ۵ CO_2 انکوبه می شوند. سلول های HeLa که در محیط کشت DMEMشامل آمینو اسیدهای غیر ضروری (mM ۱/۰)، سدیم پیرووات (۱mM)، L-گلوتامین (۲ mM) و ۵ سرم جنین گاوی (FBS ۵) می باشد، رشد می کنند. این سلول ها در دمای ۳۷ درجه و در فشار ۵ CO_2 انکوبه می شوند. سلول های K-۵۶۲ نیز در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ که شامل ۱۰ سرم جنین گاوی (FBS ۱۰)، پنی سیلین (U/ml ۱۰۰) و استرپتومایسین (µg/ml ۱۰۰) می باشد، رشد می کنند. این سلول ها در دمای ۳۷ درجه و در فشار ۵ CO_2 انکوبه می شوند. شمارش سلول ها در لام نئوبار و توسط هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون ها ابتدا درصد سلول های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵ بود. برای تهیه محیط کشت سلولی RPMI-۱۶۴۰، ابتدا ۴/۱۰ گرم پودر RPMI-۱۶۴۰، توسط ترازو توزین و توسط داخل ارلن یک لیتری که از قبل داخل آن آب مقطر دوبار تقطیر استریل شده توسط اتوکلاو وجود داشت، ریخته شد و سپس ۲ گرم بیکربنات سدیم به آن اضافه گردید . سپس آنتی بیوتیک های پنی سیلین (U/ml ۱۰۰) و استرپتومایسین (µg/ml ۱۰۰) به محیط اضافه می شوند. توسط pH متر، pH آن با HCl غلیظ به ۷/۴ رسانده شد. محیط کشت تهیه شده با استفاده از دستگاه فیلتراسیون و کاغذ فیلتر۰/۲ تا ۰/۴ میکرون در داخل ارلن مایر استریل و تحت شرایط به طور کامل استریل در اتاقک هود بیولوژیک، فیلتر شده و این محیط به داخل ظرف های

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

۳۰۰ و ۴۰۰ میلی لیتری منتقل و در یخچال ۴ درجه نگه داری گردید. برای کشت و تکثیر این سلول ها به این محیط سرم جنین گاوی (FBS) اضافه می شود. سرم قبل از استفاده باید غیرفعال شود که برای این کار سرم در حمام آب ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه قرار داده می شود. برای تهیه بافر فسفات نمکی (PBS)، ۲ میلی مولار (KH_2PO_4) (۰/۲۴ گرم) (بدون آب)، ۱۰ میلی مولار (Na_2HPO_4) (۱/۴۴ گرم) (بدون آب)،۷ /۲ میلی مولار (۰/۲ گرم) KCl و ۱۳۷ میلی مولار (۸ گرم) NaCl، در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و pH آن با NaOH به ۷/۴ رسانده شد. سپس محلول با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

بررسی اثرات سمیت سلولی به روش MTT

برای کنترل وضعیت سلول ها در محیط کشت، میزان بقاء[۱۶]، و هم چنین بررسی وضعیت سلول ها بعد از تیمارهای مختلف دارویی از روش های مختلفی استفاده می شود که یکی از این روش ها تست MTT می باشد.

کمپلکس تهیه شده در این مطالعه [VO(Curc)(acac)]، برای فعالیت ضد توموری در برابر رده های سلولی HeLa، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲، Neuro-۲a و L۹۲۹ بررسی و از سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع برای مقایسه استفاده شد. درصد میزان بقاء (زنده ماندن سلول ها) با استفاده از یک روش رنگ سنجی بر مبنای نمک تترازولیم MTT مورد بررسی قرار گرفت. MTT که یک نمک تترازولیوم زردرنگ است توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول های زنده احیاء شده و به ترکیب بنفش رنگ فورمازان که کریستالی و نامحلول می باشد، تبدیل می گردد. سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه ای (چاهک) و به تعداد $۱۰^۴ \times ۵-۲$ سلول از هر رده ی سلولی به ازای هر چاهک در ۱۰۰ µL از محیط کشت، کشت داده شدند و برای چسبندگی مطلوب به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از حذف دقیق محیط کشت، ۱۰۰ µL از محیط کشت تازه، اضافه شده و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ به مدت ۷۲-۲۴ ساعت انجام گرفت. سپس کمپلکس [VO(Curc)(acac)]، ابتدا در DMSO حل و سپس در محیط کشت، رقیق شده و در غلظت های نهایی ۲۰۰-۲۰ nM µM به سلول ها اضافه شد. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت در تمامی آزمون ها کمتر از ۱ بود. سیس پلاتین ابتدا در محلول نمکی حل شده و سپس در همان غلظت استفاده شده برای کمپلکس، به سلول ها اضافه شد. سپس، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. در در پایان انکوباسیون، مقدار ۲۰ µL از محلول MTT (۵ mg/ml در بافر بی رنگ PBS) به چاهک ها اضافه شد و پس از ۴-۳ ساعت انکوباسیون، محتوای چاهک ها (محیط کشت) تخلیه شد. سپس در این مرحله، ۱۰۰ µL DMSO به عنوان حلال کریستال های بنفش رنگ فورمازان که در سیتوپلاسم سلول ها ایجاد شده اند، به هر چاهک افزوده شد. پلیت، به مدت ۶ دقیقه با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا کریستال های فورمازان تشکیل شده، کاملاً درون DMSO حل شوند. سپس شدت رنگ ها، توسط دستگاه الیزا ریدر[۱۷] در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد. بعد از محاسبات مربوطه، $IC_{۵۰}$ نمونه ها برای زمان مورد نظر تعیین شد.

از محیط کشت فاقد سلول، به عنوان بلانک دستگاه الیزا ریدر و از محیط کشت به همراه سلول و بدون دارو، به عنوان کنترل سلول زنده استفاده شد. لذا سه چاهک شامل سلول و محیط کشت کامل، به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در سه چاهک، از داروی کنترل مثبت سیس پلاتین برای مقایسه با کمپلکس مورد مطالعه، استفاده شد. هر رقت در سه چاهک از پلیت سنجش گردید و برای هر رقت، سه بار تکرار در نظر گرفته شد.

ارزیابی آپوپتوز برای کمپلکس به وسیله ی فلوسایتومتری

به منظور مطالعه چگونگی اثر کمپلکس مورد نظر بر مرگ سلولی (نکروز[۱۸] یا آپوپتوز[۱۹]) ایجاد شد، مطالعه ها فلوسایتومتری بر روی این ترکیب و سیس پلاتین به عنوان مرجع صورت می پذیرد (۶، ۷، ۳۱). آپوپتوز یک شکل منفرد از مرگ سلولی است که در اغلب بافت ها، تعداد سلول ها را در طی نمو و نیز در انواع گسترده‌ای از شرایط پاتولوژیک و نرمال، کنترل می نماید. برای آپوپتوز، اصطلاحات دیگری نیز بکار می‌رود که عبارتنداز : مرگ سلولی کنترل شده، مرگ سلولی فیزیولوژیک، مرگ سلولی بیولوژیک و مرگ سلولی برنامه ریزی شده. از آنجایی که در مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین[۲۰] (که یک فسفولیپید غشایی است و باعث انعطاف پذیری غشای سلول ها می شود)، از سطح داخلی غشاء پلاسمایی به سطح خارجی آن منتقل می شود و در آنجا برای رساندن پیام مرگ به سلول های مجاور فاگوسیت های عملکردی جهت بلعیدن سلول، عمل می نماید (۱۷). در روشی جدید برای نشان دادن سلول های آپوپتوزی، Annexin V که عضوی از خانواده Annexinاست را به کار می برند (۳۰). در واقع Annexin با واسطه $Ca^{۲+}$ می‌تواند به فسفو لیپید متصل شود و برای نشان دادن سلول های آپوپتوزی در محیط های کشت و یا برش های بافتی که توسط FITC و Annexin V فیکس شده اند، بکار رود. تمایز بین سلول های آپوپتوتیک و نکروتیک می تواند به وسیله ی رنگ آمیزی همزمان با پروپیدیم یدید (PI) انجام گیرد. بنابر این آنکسین FITC–V(-AnnexinV

۱۶ Viability

۱۷ ELISA Reader
۱۸ Necrosis
۱۹ Apoptosis
۲۰ Phosphatidylserine: PS

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

FITC) به عنوان یک نشان گر در معرض فسفاتیدیل سرین و PI به عنوان یک نشان گر برای سلول های مرده، مورد استفاده قرار می گیرد. بر این اساس و به منظور تعیین سلول های آپوپتوزی و نکروزی در یک جمعیت سلولی تیمار شده با کمپلکس مورد مطالعه، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ آنکسینV–FITC و پروپیدیم یدید (PI) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار دستگاه و در پی تقسیم بندی یک منحنی دوبعدی آنکسینV–FITC در برابر پروپیدیم یدید (PI) به چهار ناحیه ی Q۱ تا Q۴، صورت گرفت. در این تقسیم بندی ناحیه ی Q۱ نمایانگر سلول های نکروزی با ویژگی آنکسینV–FITC، منفی و پروپیدیم یدید (PI)، مثبت؛ ناحیه ی Q۲ نمایانگر سلول های آپوپتوزی تاخیری با ویژگی آنکسینV–FITC، مثبت و پروپیدیم یدید (PI)، مثبت؛ ناحیه ی Q۳ نمایانگر سلول های سالم با ویژگی آنکسینV–FITC، منفی و پروپیدیم یدید (PI)، منفی؛ ناحیه ی Q۴ نمایانگر سلول های آپوپتوزی اولیه با ویژگی آنکسین V–FITC، مثبت و پروپیدیم یدید (PI)، منفی؛ می باشند (۱۶).

بدین منظور رده های سلولی مختلف تیمار شده با کمپلکس مورد مطالعه، برای ۲۴ ساعت در یک غلظت نزدیک به IC_{50} در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از تیمار، سلول ها توسط تریپسین برداشت شده و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه (r.p.m.)، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی (supernatant) برداشته شده و رسوب سلولی (cell pellet) در PBS، و پس از آن، دو بار نیز توسط بافر (بایندیگ) پیوندی (۱۰mM HEPES, ۱۵۰mM NaCl, ۵mM $CaCl_2$, ۱mM $MgCl_2$, ۱.۸mM KCl) شستشو داده شد. سلول ها با یک آنتی بادی آنکسین V-FITC (۵ میلی لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر بافر پیوندی) و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. نمونه ها در بافر پیوندی شسته شده و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی در ۴۹۰ میلی لیتر بافر پیوندی و ۱۰ میلی لیتر پروپیدیم یدید ($10\ mg\ ml^{-1}$ در PBS) اضافه شد. فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر Partec PAS (Partec GmbH، آلمان) بر روی کمپلکس مورد مطالعه و سیس پلاتین به عنوان مرجع صورت گرفت.

آنالیز آماری نتایج

در تمامی مراحل، هر آزمون چهار بار تکرار شد و داده های به دست آمده به صورت Mean ± SD بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون توکی (Tukeys test) استفاده گردید. در تمامی بررسی ها سطح معنی داری آزمون ها p ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه، از واکنش نمک فلزی (استیل استوناتو) اکسو وانادیم (IV) با لیگاند کورکومین، در یک محیط متانولی کمپلکس [VO(Curc)(acac)] تهیه و شناسایی گردید. در ادامه، اثرات سمیت سلولی این کمپلکس بر روی پنج رده ی سلولی با روش MTT و فلوسایتومتری، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج سمیت سلولی توسط کمیت IC_{50} برای کمپلکس مورد نظر بر روی پنج رده ی سلولی در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱: فعالیت ضدسرطانی کمپلکس مورد مطالعه در مقابل رده های سلولی HeLa، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲، Neuro-۲a پس از ۴۸ ساعت تیمار

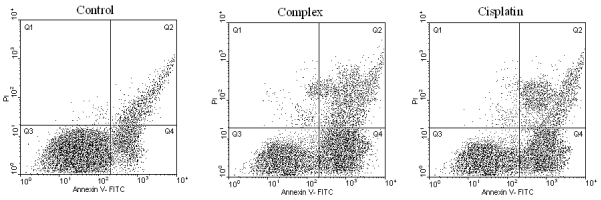
پیوسته

رده ی سلولی	IC_{50} ± SD (μM)[الف]	
	کمپلکس مورد مطالعه	سیس پلاتین
رده ی سلولی HeLa (کارسینومای تخمدان انسانی)	۵/۱ ± ۶۵/۲۳	۰/۰ ± ۴۵/۱۲
رده ی سلولی MCF-7 (سرطان سینه انسانی)	۲/۱ ± ۴۸/۰۵	۶/۲ ± ۵۰/۱۱
رده ی سلولی HT-29 (سرطان روده بزرگ انسانی)	۴۲/۵ ± ۶/۱۹	۱۵/۴ ± ۴/۹۳
رده ی سلولی K-562 (سرطان سلول های میلوییدی خون انسان)	۳/۱ ± ۹۹/۱۲	۲۴/۲ ± ۰/۹۳
رده ی سلولی Neuro-2a (نوروبلاستوما موشی)	۶۵/۶ ± ۳/۸۹	>۲۰۰
سلول های نرمال فیبروبلاست موش(L929)	۸ ±/۹۸ ۱۰۶/۷	۲۹/۱ ± ۱/۸۸

الف) غلظتی از کمپلکس که بازدارنده ی رشد سلول ها تا ۵۰ باشد. هر غلظت در سه چاهک از پلیت سنجش گردید و برای هر غلظت، سه بار تکرار در نظر گرفته شد.

IC_{50}>۱۰۰μM، غیر فعال در نظر گرفته شد.

هم چنین به منظور این که مطالعه کنیم، چگونه کمپلکس مورد نظر، مرگ سلولی (نکروز یا آپوپتوز) ایجاد می کند، مطالعه ها فلوسایتومتری بر روی این ترکیب و سیس پلاتین به عنوان مرجع انجام گرفت. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۳ و جدول ۲، آورده شده است.



شکل ۳: دیاگرام فلوسایتومتری برای کمپلکس وانادیم-کورکومین، سیس پلاتین و گروه کنترل.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

جدول ۲: درصد مرگ سلولی مشاهده شده به وسیله ی آزمون فلوسایتومتری بر روی رده ی سلولی K-۵۶۲ پس از ۲۴ ساعت تیمار پیوسته

سلول های نکروتیک	سلول های آپوپتیک-نکروتیک	سلول های آپوپتیک	سلول های زنده	تیمار
۰/۴۷	۹/۲۵	۱۰/۸۳	۷۹/۴۵	کنترل
۰/۷۸	۱۳/۲۷	۳۴/۷۶	۵۱/۱۹	سیس پلاتین
۰/۹۶	۱۷/۹۵	۴۰/۵۱	۴۰/۵۸	کمپلکس وانادیم-کورکومین

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضدتوموری و القای آپوپتوز ترکیب سنتزی (۱و۷- بیس۴[-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل] -۱و۶-هپتا دی ان-۳و۵-دی اوناتو) استیل استوناتو اکسو وانادیم (IV)، می باشد. درصد میزان بقاء (زنده ماندن سلول ها) با استفاده از یک روش رنگ سنجی بر مبنای نمک تترازولیم MTT مورد بررسی قرار گرفت. شدت رنگ ایجاد شده در روش MTT با سلول هایی دارای میتوکندری فعال می باشد، متناسب است. در واقع این روش برای تعیین میزان تکثیر و بقای سلول ها بعد از قرار گرفتن در معرض مواد سیتوتوکسیک مورد استفاده قرار می گیرد. به طور کلی بسیاری از داروهای شیمیایی که به منظور شیمی درمانی سرطان به کار برده می شوند، اغلب سبب تغییر هایی درفرایند تقسیم سلولی شده و بدین ترتیب، تکثیر و تمایز سلول سرطانی متوقف می شود.

لذا خاصیت ضدسرطانی کمپلکس وانادیم-کورکومین، در برابر پنج رده ی سلول سرطانی HeLa، MCF-۷، HT-۲۹، K-۵۶۲ و Neuro-۲a بررسی و از سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع برای مقایسه استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که مقادیر IC_{50}، در گستره ی ۲/۴۸ تا ۶۵/۳ تغییر می کنند درحالی که مقادیر این پارامتر در سیس پلاتین به عنوان داروی مرجع، بین ۰/۴۵ تا بیش از ۲۰۰μM تغییر می کنند. نتایج حاصل، نشان می دهد که میزان بقاء سلول های سرطانی K-۵۶۲ و MCF-۷ در گستره ی غلظتی ۲۰۰μM-۲۰nM از کمپلکس وانادیم-کورکومین پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون تاثیر قابل ملاحظه ای بر میزان مرگ و میر این سلول های سرطانی دارد.

بررسی فعالیت کمپلکس مورد نظر بر روی مهار رشد رده های سلولی مورد مطالعه، موید این واقعیت است که این ترکیب دارای بیش ترین اثر مهاری بر روی تکثیر سلول های سرطانی K-۵۶۲ می باشد.

با توجه به اینکه در این تحقیق از ردهٔ سلولی L۹۲۹ به عنوان سلول طبیعی و شاهد استفاده شد، نتایج به دست آمده در تست کمی MTT به صورت in vitro نشان می دهند کمپلکس سنتز شده هیچ اثر سایتوتوکسیکی بر روی این سلول های نرمال ندارند. باید تأکید کرد که این یافته ها جهت به کارگیری به صورت بالینی نیز باید به صورت in vivo به اثبات رسد.

به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده (نکروز یا آپوپتوز) توسط کمپلکس مورد نظر، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. تشخیص فسفاتیدیل سرین در سطح سلول ها به وسیله ی AnnexinV-FITC به عنوان یک مارکر در شناسایی سلول های آپوپتوز شده از سایر سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد.

در واقع در شکل ۳، این امکان وجود دارد که جمعیت سلول ها را برای چهار حالت ممکن (یک چهارم ها: quadrant) به دست آوریم: جمعیت سلول های زنده (یعنی، سلول هایی که کنترل های منفی برای آنکسینV (Annexin V) و پروپیدیوم یدید (PI) ارائه می دهند؛ یک چهارم چپ، پایین)، جمعیت سلول هایی که متحمل آپوپتوز می شوند (PI منفی و Annexin V مثبت؛ یک چهارم راست، پایین)، سلول های درگیر در آپوپتوز تاخیری[۲۱] یا نکروز، مثبت برای هر دو رنگ؛ یک چهارم راست، بالا)، سلول های نکروتیک که به صورت مکانیکی تخریب شده اند فقط از نظر PI مثبت هستند؛ یک چهارم چپ، بالا).

با توجه به نتایج جدول ۲ و شکل ۳، کمپلکس مورد نظر جمعیت زیادی از سلول ها را در نواحی آپوپتوز (۵۸/۴۶) و ۱/۲ برابر بیش تر از سیس پلاتین (۴۸/۰۳) در غلظت یکسان نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که کمپلکس جدید سنتز شده می تواند منجر به آپوپتوز سلول های سرطانی K-۵۶۲ شود. اما خاصیت پرو آپوپتوز، نیاز به بررسی های بیش تری برای درک بهتر مکانیسم دقیق عمل این کمپلکس دارد.

نتیجه گیری

از جمله مهم ترین فرایندهای سلولی که در زمان بررسی سازوکار داروهای ضد سرطان مورد توجه قرار می گیرد فرایندهای آپوپتوز و چرخه ی تقسیم سلولی می باشد. داروهای ضد سرطان بطور معمول با القاء آپوپتوز و یا توقف در چرخه ی تقسیم سلولی باعث مهار رشد و تکثیر سلولی می گردند. به همین دلیل هم در این پژوهش، جهت تعیین سازوکار اثر کمپلکس جدید سنتز شده به فرایند یادشده، یعنی آپوپتوز توجه گردیده است.

در سنتز دارو های شیمی درمانی با خاصیت ضدتکثیری و القای آپوپتوز، علاوه بر آن که خاصیت سایتوتوکسیک آن ها در برابر سلول های سرطانی حائز اهمیت است بلکه این ویژگی که کم ترین اثرات جانبی را روی سلول های سالم فرد بیمار داشته باشد و ارزان قیمت نیز باشند، از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از مؤثرترین داروهای شیمی درمانی،سیس پلاتین است اما ایراد اساسی آن سمیت این دارو است که به سلول های سالم فرد نیز صدمه می زند (۲۶). بنابراین دانشمندان سعی دارند تا داروهای جدیدتری با اثرات سمی پایین تر و ارزان تر را جایگزین این داروهای

۲۱ late apoptosis

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

سمی کنند. در سال های اخیر توجه زیادی به یافتن ترکیبات ضدسرطانی جدید حاوی یون های فلزی شده است (۱۸). ترکیب سنتزی در این مطالعه، می تواند به دلیل سمیت هزینه های سنتزی کم اجزاء آن، جایگزین مناسبی برای داروهای ضدسرطانی با اثرات جانبی بالا، نظیر سیس پلاتین باشد. البته مطالعه ها و بررسی های بیش تری برای درک بهتر مکانیسم دقیق عمل این کمپلکس، نیاز می باشد.

در کل، بر اساس یافته های فوق می توان گفت که نحوه ی اثرگذاری کمپلکس وانادیم-کورکومین بایستی از طریق القای آپوپتوز بر روی رده های سلول های سرطانی مورد مطالعه می باشد. نتایج فلوسایتومتری کمپلکس وانادیم، بیانگر این است که کمپلکس جدید سنتز شده می تواند منجر به آپوپتوز سلول های سرطانی K-۵۶۲ شود. هم چنین نتایج به دست آمده، سایتوتوکسیسیته ی بیشتری را برای کمپلکس مورد نظر در مقابل رده های سلولی K-۵۶۲ و MCF-۷ نشان داد. از آنجایی که بایستی این نکته نیز مورد توجه قرار می گرفت که تاثیر کمپلکس سنتز شده، بر روی سلول های سالم و غیرسرطانی چگونه است، اثر این ترکیب بر روی رده ی سلول های نرمال فیبروبلاست موش (L۹۲۹) ، در کنار سایر رده های سلول های سرطانی مذکور، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده اثبات می کند کمپلکس سنتز شده هیچ گونه تأثیر سایتوتوکسیکی بر روی بر سلول های نرمال فیبروبلاست موش (L۹۲۹) ندارد.

سپاسگزاری

تمامی هزینه ی مالی این پروژه تحقیقاتی از محل طرح پژوهشی ۲۸۵۰۹ مورخ ۱۳۹۲/۰۸/۲۸ در گروه شیمی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تامین اعتبار گردیده است. نویسندگان مقاله از مسئولین محترم دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد و نیز دانشگاه علوم پزشکی مشهد، که در اجرای این پایان نامه آن را حمایت مالی و معنوی نمودند، قدردانی می نمایند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

منابع

(۱) منصوری ترشیزی حسن. داروهای حاوی فلزات گروه پلاتین. چاپ اول، انتشارات دانشگاه سیستان و بلوچستان (با همکاری نشر مرندیز)، ۱۳۹۰، فصل دوم، ۲۱۷-۵۶

(۲) همتی محمدتقی. بیماری های نئوپلاستیک (مجموعه ی هاریسون). چاپ اول، نشر دانش امروز (وابسته به موسسه ی انتشارات امیر کبیر)، ۱۳۷۱، فصل دوم، ۷۰-۵۳

(3) Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an old-age disease with an age-old solution. Cancer Lett, 2008; 267: 64-133.

(4) Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J & et al. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, and pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. J Clin Psychopharmacol, 2008; 28: 3-110.

(5) Chandran B, Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. Phytother Res, 2012; 26: 25-1719.

(6) Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumor and normal cells. Anticancer Res, 1990; 10: 1153–1160.

(7) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry, 1992; 13: 795–808.

(8) Faneca H, Figueiredo VA, Tomaz I, Gonçalves G, Avecilla F, Pedroso de Lima MC & et al. Vanadium compounds as therapeutic agents: some chemical and biochemical studies. J Inorg Biochem, 2009; 103: .8-601

(9) Ghosh P, DCruz OJ, Narla RK, Uckun FM. Apoptosis inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. Clin Cancer Res, 2000; 6: 45-1536.

(10) Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS & et al. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. J Biol Chem, 2000; 275: 22-32516.

(11) Itkes AV, Imamova LR, Alexandrova NM, Favorova OO, Kisselev LL. Expression of c-myc gene in human ovary carcinoma cells treated with vanadate. Exp Cell Res, 1990; 188: 71-169.

(12) Kanna PS, Mahendrakumar CB, Indira BN, Srivastawa S, Kalaiselvi K, Elayaraja T, et al. Chemo preventive effects of vanadium toward1, 2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity and preneoplastic lesions in rat colon. Environ Mol Mutagen, 2004; 44: 8-113.

(13) Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M & et al. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. J Biol Chem, 2008; 283: 505-14497.

(14) Kurd SK, Smith N, VanVoorhees A, Troxel AB, Badmaev V, Seykora JT & et al. Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial. J Am Acad Dermatol, 2008; 58: 31-625.

(15) Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, Fabbri E, Vizziello L, Khan MT & et al. Effects of vanadium complexes on cell growth of human leukemia cells and protein-DNA interactions. Oncol Rep, 2005; 14: 9-15.

(16) LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi E, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-*S*-transferase. Carcinogenesis, 2009; 30:1298–1304.

(17) Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie RC, LaFace DM, Green DR.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med. 1995; 182: 56-1545.

(18) Meshkini A, Yazdanparast R. Chemo sensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. Exp Mol Pathol, 2010; 89: 42-334.

(19) Noblia P, Vieites M, Parajon-Costa BS, Baran EJ, Cerecetto H, Draper P & et al. Vanadium (V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK- 10): crystal structure of [VVO2(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. J Inorg Biochem, 2005; 99: 51-443.

(20) Ray RS, Rana B, Swami B, Venu V, Chatterjee M. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. Chem Biol Interact, 2006; 163: 47-239.

(21) Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G & et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effect of curcumin. Free Radic Biol Med, 2007; 43: 80-568.

(22) Sharma RA, Gescher AJ and Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer, 2005; 41: 68-1955.

(23) Steigerwalt R, Nebbioso M, Appendino G, Belcaro G, Ciammaichella G, Cornelli U & et al. Meriva (R), a lecithinized curcumin delivery system, in diabetic microangiopathy and retinopathy. Panminerva Med, 2012; 54: 6-11.

(24) Storr T, Mitchell D, BuglyoP, Thompson K.H, Yuen V.G, McNeill J.H, Orvig C. Vanadyl–Thiazolidinedione Combination Agents for Diabetes Therapy. Bio conjugate Chem, 2003; 14: 212–221.

(25) Suskind DL, Wahbeh G, Burpee T, Cohen M, Christie D, Weber W. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced-dose titration study. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013; 56: 9-277.

(26) Takimoto CH, Calvo E. Principles of Oncologic Pharmacotherapy in Pazdur R Wagman LD Camphausen KA Hoskins WJ (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 11 ed. 2008.

(27) Thompson K.H, Bomerle K, Polishchuk E, Martins C, Toleikis P, Tse J, Yuen V, McNeill J.H, Orvig C. Complementary inhibition of synoviocyte, smooth muscle cell or mouse lymphoma cell proliferation by a vanadyl curcumin complex compared to curcumin alone. J. Inorg. Biochem, 2004; 98: 2063–2070.

(28) Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD. Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. Carcinogenesis, 1984; 5: 51-849.

(29) Van der Geyten S, Van den Eynde I, Segers IB, Kühn ER, Darras VM. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. Gen Comp Endocrinol, 2002; 128: 65-73.

(30) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995; 184: 39-51.

(31) Williams G. T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell, 1991; 65: 1097–1098.

(32) Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer Metastasis Rev, 1992; 11: 95-103.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.9.8]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]