

بررسی القای آپوپتوز از طریق فعال سازی کاسپاز 9 توسط ترکیب سیلی بینین در رده سلولی HUVEC

ژیلا نصیرزاده¹، حسین غفوری^{2*}، محمودرضا آقامعالی²

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه گیلان، رشت

2- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت

* رشت، صندوق پستی 4199613776

h.ghafoori@guilan.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/2/12 پذیرش مقاله: 94/6/3)

چکیده- سیلی بینین یک فلاونوئید طبیعی است که با توجه به مطالعات صورت گرفته، توانایی مهار رشد سرطان از طریق القای آپوپتوز در انواع سلول‌های سرطانی و همچنین سلول‌های اندوتلیالی را دارد، اما مکانیسم مولکولی آن به خوبی مشخص نشده است. در این مطالعه شواهدی مبنی بر یکی از مکانیسم‌هایی که سیلی بینین از طریق آن به القای آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال بند ناف جنین HUVEC می‌پردازد، فراهم شده است. بدین منظور، سلول‌های HUVEC در پلیت‌های 96 خانه کشت داده شدند و توانایی سیلی بینین در مهار تکثیر سلول HUVEC با روش تست MTT سنجیده شد و میزان IC_{50} ، 143 میکرومولار مشخص گردید. سنجش فعالیت کاسپاز 9 بر اثر تیمار وابسته به غلظت (100-300 میکرومولار) و وابسته به زمان (24، 48 و 72 ساعت) در غلظت 100 میکرومولار سیلی بینین با استفاده از سوبسترای کروموزنیک LEHD-PNA انجام گرفت، که بیشترین فعالیت کاسپاز 9 در غلظت 100 میکرومولار سیلی بینین پس از 48 ساعت تیمار مشاهده شد. سنجش قطعه قطعه شدن DNA بر اثر تیمار وابسته به غلظت (100-400 میکرومولار) با سیلی بینین انجام گرفت و اسمیر در نمونه DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده با غلظت 400 میکرومولار سیلی بینین مشاهده شد. اطلاعات بدست آمده از این مطالعه، توانایی سیلی بینین در مهار تکثیر سلول‌های HUVEC از طریق القای مرگ آپوپتوزی که نشانی از عملکرد ضد رگزایی این ترکیب می‌باشد را نشان می‌دهد.

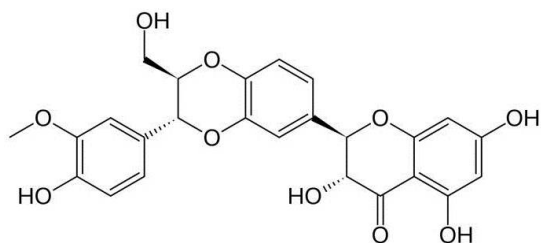
کلیدواژگان: سیلی بینین، HUVEC، MTT، آپوپتوز.

1- مقدمه

اثرات درمانی زیادی از جمله فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، اثرات مهار رشد تومور و القای آپوپتوز در سرطان را نشان داده‌اند [2]. همچنین مطالعات مختلفی به منظور یافتن مهارکننده‌های رگزایی روی انواع مختلف گیاهان صورت

امروزه استفاده از داروهای گیاهی به عنوان یک روش جایگزین درمان سرطان، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [1]. فلاونوئیدهای استخراج شده از گیاهان،

جمله پروستات [16]، شش [17]، کولون [18]، سینه [7] و پانکراس [19] مطالعه شده است.



شکل 1 ساختار شیمیایی سیلیبینین

سیلیبینین در رده سلولی HUVEC، از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش میزان فاکتورهای محرک رشد مانند Kip1/p21، Cip1/p21 و p53 القای آپوپتوز از طریق آسیب میتوکندریایی، رهایی سیتوکروم c به درون سیتوسل، فعال‌سازی کاسپاز 3 و 7، کاهش میزان پروتئین Survivin، مهار کننده کاسپاز [20] و مهار فعال‌سازی Akt، کیناز درگیر در تکثیر و آپوپتوز سلول [21] به عنوان یک ترکیب ضد رگزایی عمل می‌کند [22]. هدف این مطالعه بررسی القای آپوپتوز توسط سیلیبینین از طریق فعال‌سازی کاسپاز 9 و قطعه قطعه شدن DNA در رده سلولی HUVEC می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد شیمیایی

سیلیبینین از شرکت سیگما خریداری و در 0/01 DMSO درصد حل شد. سوسترای کروموزنیک کاسپاز 9، LEHD-pNA و کیت سنجش DNA fragmentation از شرکت Abnova خریداری گردید.

2-2- کشت سلول

سلول‌های HUVEC در محیط کشت DMEM (Dalbecco's Modified Eagle Medium) و 10% سرم جنین گاوی (FBS) و 10% محلول استرپتومایسین/

گرفته است. از جمله ترکیبات گیاهی که اثرات ضد رگزایی در *in vivo* و *in vitro* نشان داده‌اند، جنیستین، شیکونین، ترکیبات شیمیایی گیاه سویا و غیره می‌باشند [3].

سیلیبینین (شکل 1) که محتوای اصلی کمپلکس سیلی مارین است [4]، از گیاه *Silybum marianum* استخراج شده [5] و به دلیل اثراتش در درمان بیماری‌های کبدی، توجهات زیادی را به خود جلب کرده است [6]. این ترکیب در بسیاری از رده‌های سلولی سرطانی از جمله سلول‌های سرطان پروستات، کولون، سینه و شش اثرات درمانی نشان داده است [7]. اثر سیلیبینین در درمان سرطان به دلیل عملکرد ضد رادیکال آزاد و ضد رگزایی بودن آن می‌باشد [8]. رگزایی فرایندی است که طی آن رگ‌های خونی جدید شکل گرفته و منجر به گسترش تومور می‌گردد [9]. از مهم‌ترین راه‌کارهای مقابله با سرطان مهار رگزایی بوده که بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. از آنجا که سلول‌های اندوتلیالی دستکاری نشده بوده و مقاومت دارویی کمتری را نشان می‌دهند [10]، به منظور مطالعه اثر ضد رگزایی یک ترکیب، سلول‌های اندوتلیال بند ناف جنین (HUVEC) می‌توانند رده‌ی سلولی مناسبی باشند.

یک مهارکننده رگزایی می‌تواند منجر به جلوگیری از تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی از طریق القای آپوپتوز شود [11]. آپوپتوز مرگ سلولی برنامه ریزی شده می‌باشد که از دو مسیر خارجی و داخلی تشکیل شده است [12]. این مسیرها با فعال‌سازی کاسپازها، اتصال لیگاند‌های مرگ به گیرنده‌های مرگ، رهایی سیتوکروم C و دیگر مکانیسم‌های مولکولی همراه است [13]. در کنار تغییرات مولکولی، برخی تغییرات ظاهری از جمله جوانه زدن غشا، قطعه قطعه شدن DNA و هسته که نشانه‌های آپوپتوز در سلول‌اند [14]، اتفاق می‌افتد.

آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال عروقی (VEC) نقش مهمی در مهار رگزایی تومور بدخیم ایفا می‌کند [15]. القای آپوپتوز توسط سیلیبینین در انواع سلول‌های سرطانی از

ساعت انکوبه گردیدند. DNA استخراج شده از هر نمونه توسط کیت DNA fragmentation مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج روی آگارز 1/2% مشاهده شد.

3- نتایج

3-1- بررسی کشندگی ترکیب سیلی بینین

به منظور بررسی اثر مهار رشدی سیلی بینین روی سلول‌های HUVEC سلول‌ها در پلیت 96 خانه کشت داده شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت 20-600 میکرومولار سیلی بینین به مدت 24 ساعت، مهار رشد سلولی وابسته به غلظت را نشان داد (نمودار 1) و عدد IC_{50} ، 143 میکرومولار تعیین گردید.

3-2- تأثیر سیلی بینین بر روی فعالیت کاسپاز 9

همان‌طور که در نمودار 2 نشان داده شده است، فعالیت کاسپاز 9 در سلول‌های HUVEC تیمار شده با سیلی بینین با غلظت 100 میکرومولار، طی 48 ساعت افزایش یافت. هم چنین بیشترین میزان فعالیت کاسپاز 9 طی 48 ساعت تیمار با غلظت 100 میکرو مولار سیلی بینین دیده شد (نمودار 3).

3-3- قطعه قطعه شدن DNA

تیمار 100 و 200 میکرومولار از سیلی بینین هیچ قطعه قطعه شدن را در DNA نشان نداد. DNA استخراج شده از سلول‌های HUVEC تیمار شده با غلظت 400 میکرومولار سیلی بینین به شکل اسمیر در ژل آگارز ظاهر گردید (شکل 2).

4- بحث

امروزه درمان‌های جایگزین و مکمل در زمینه سرطان به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله راه‌های درمانی جایگزین، استفاده از رژیم‌های غذایی مخصوص، درمان‌های سنتی و درمان‌های گیاهی می‌باشند.

سیلی بینین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5% CO_2 و رطوبت 95% انکوبه گردید.

2-3- سنجش سمیت سلولی ترکیب سیلی بینین: تست

MTT

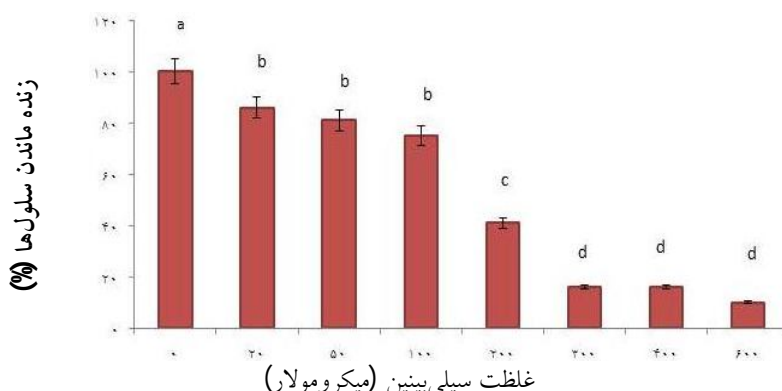
سلول‌ها در پلیت 96 خانه کشت داده شدند و با سیلی بینین در غلظت 20 تا 600 میکرومولار به مدت 24 ساعت تیمار گردیدند. محلول MTT با غلظت 0/5 میلی‌گرم در میلی لیتر به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت 4 ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس 100 میکرولیتر DMSO برای حل کردن کریستال‌های فورمازان اضافه گردید و جذب نوری آنها توسط الایزا ریدر (BioTek آمریکا) در طول موج 490 نانومتر خوانده شد.

2-4- اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاسپاز 9

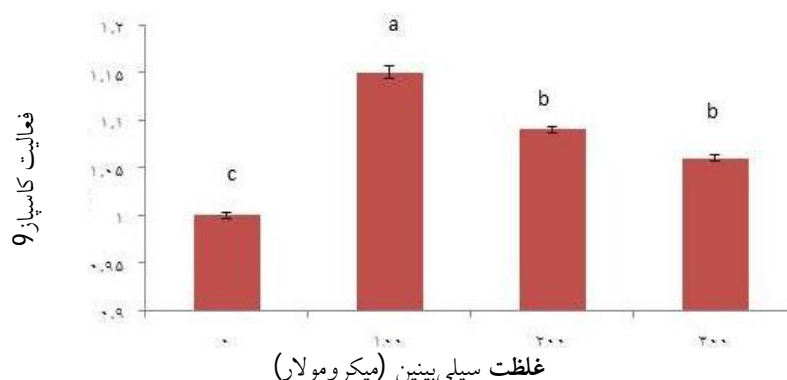
به منظور سنجش فعالیت کاسپاز 9، سلول‌ها در فلاسک کشت سلول 25 cm^2 کشت داده شدند و با غلظت سیلی بینین 100 تا 300 میکرومولار به مدت 48 ساعت تیمار شدند. همچنین سلول‌ها تحت تیمار با غلظت 100 میکرومولار سیلی بینین در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت قرار گرفتند. پس از آن تریپسین و در 50 میکرولیتر بافر لیز کننده سلول به مدت یک ساعت انکوبه شدند. غلظت پروتئینی سلول‌ها توسط تست برادفورد اندازه‌گیری گردید. میزان 50 میکرولیتر بافر واکنش 2X (حاوی DTT 10 میلی‌مولار) به هر نمونه اضافه و به دنبال آن 5 میکرولیتر سوپسترای 4 میلی مولار LEHD-pNA (با غلظت نهایی 200 میکرومولار) اضافه گردید و به مدت 1 تا 2 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در 405 نانومتر قرائت شد.

2-5- سنجش قطعه قطعه شدن DNA

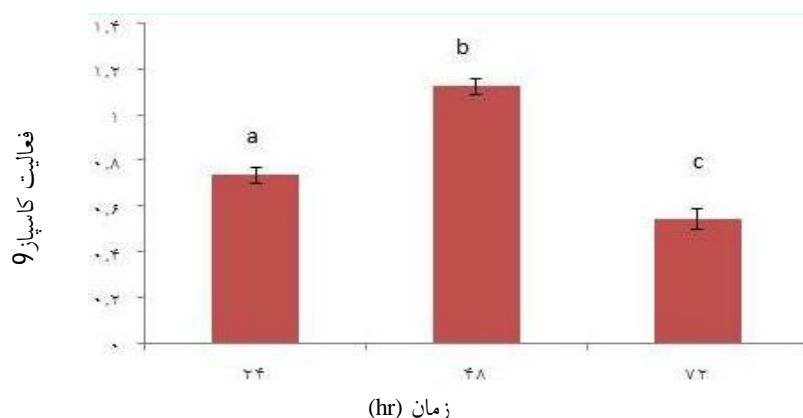
سلول‌ها در فلاسک‌های سلولی 25 cm^2 کشت داده شدند و با غلظت 100-400 میکرومولار سیلی بینین به مدت 48



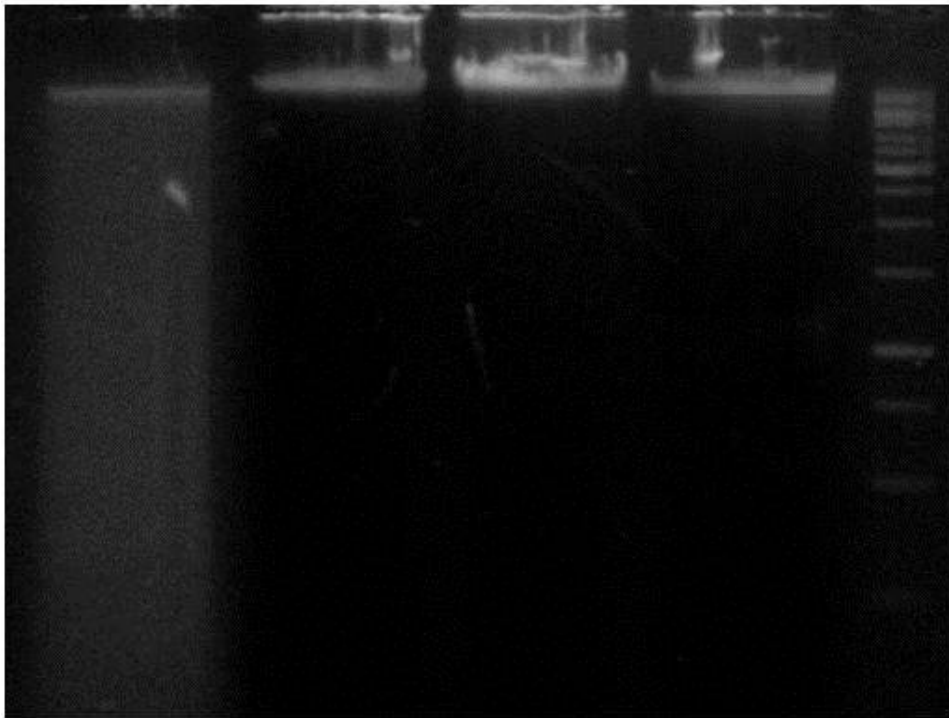
نمودار 1 سیلی بینین میزان زنده ماندن HUVEC را کاهش می‌دهد. سلول‌ها با سیلی بینین 20 تا 600 میکرومولار به مدت 24 ساعت تیمار شدند. تست آماری Tukey's post hoc تفاوت معناداری در میزان زنده ماندن سلول‌ها در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلی بینین نشان داد. این نمودار کاهش قابل توجهی در میزان زنده ماندن سلول‌ها در اثر افزایش غلظت سیلی بینین ($p < 0.05$) نشان می‌دهد.



نمودار 2 تأثیر سیلی بینین بر روی فعالیت کاسپاز 9 در HUVEC. سلول‌ها با غلظت 100، 200 و 300 میکرومولار سیلی بینین به مدت 48 ساعت تیمار شدند. فعالیت کاسپاز 9 در سلول‌های HUVEC تیمار شده با سیلی بینین افزایش داشت. تست آماری Tukey's post hoc تفاوت معناداری در میزان فعالیت کاسپاز 9 در غلظت‌های مختلف سیلی بینین نشان داد. این نمودار تغییر قابل توجهی در میزان فعالیت کاسپاز 9 ($p < 0.05$) در اثر تغییر غلظت سیلی بینین نشان می‌دهد.



نمودار 3 تأثیر سیلی بینین بر روی فعالیت کاسپاز 9 در HUVEC. سلول‌ها به مدت 24، 48 و 72 ساعت تحت تیمار سیلی بینین با غلظت 100 میکرومولار قرار گرفتند. تست آماری Tukey's post hoc تفاوت معناداری در میزان فعالیت کاسپاز 9 در زمان‌های مختلف تیمار با سیلی بینین نشان داد. این نمودار تغییر قابل توجهی در میزان فعالیت کاسپاز 9 ($p < 0.05$) در اثر تغییر مدت زمان تیمار با سیلی بینین نشان می‌دهد.



شکل 2 DNA کروموزومی HUVEC استخراج گردید و بر روی ژل آگارز 1/2% الکتروفورز انجام گرفت. ستون 1: DNA مارکر، ستون 2: DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار نشده، ستون‌های 3، 4 و 5: به ترتیب DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده با غلظت 100، 200 و 400 میکرومولار

آپوپتوز، دلیل اصلی رشد و پیشرفت سرطان می‌باشد. شواهد زیادی مبنی بر اهمیت اندوتلیوم در فرایند رگزایی در تکثیر تومورهای حاوی مایع که به شکل کیستیک می‌باشند، وجود دارد. تکثیر تومور مبتنی بر رشد اندوتلیوم بوده و حجم نهایی سلول اندوتلیالی نتیجه تعادل ظرفی بین سیگنال‌های آپوپتوزی و تکثیری در اطراف تومور است [11].

عملکرد کاسپازها برای انجام فرایند آپوپتوز ضروری است. دوازده نوع کاسپاز در انسان شناخته شده اند که به دو دسته کاسپازهای آغازگر و کاسپازهای اجرایی تقسیم می‌شوند [25]. کاسپازهای 3 و 9 از جمله کاسپازهای آغازگر هستند که با ایجاد برش در فرم زیموژن کاسپازهای اجرایی، آنها را فعال می‌کنند [26].

در مطالعه حاضر اثر سیلی‌بینین بر فعالیت کاسپاز 9 و هم چنین قطعه قطعه شدن DNA بررسی شد. بدین منظور

درمان‌های گیاهی توسط گیاهانی انجام می‌گیرد که از مناطق مختلف مثل آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکای شمالی برای مصارف درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند [1].

گیاه *Silybum marianum*، گیاه بومی مناطق معتدل اروپا و آفریقای شمالی و خاورمیانه است [23]. اثرات درمانی این گیاه به واسطه یکی از چندین فلاوولیگنان استخراج شده از آن به نام سیلی‌بینین می‌باشد که به دو ایزوفرم دیاسترومری A و B وجود دارد. دانه این گیاه طی بیشتر از 2000 سال برای درمان اختلالات کبدی مثل سیروز کبدی، یرقان و هپاتیت استفاده می‌شود [8]. اثربخشی سیلی‌بینین در درمان سرطان از طریق سرکوب رشد تومور، به دام انداختن سلول در مرحله G1/S چرخه سلولی و همچنین سرکوب محصولات ژن‌های آنتی آپوپتوتیک مثل Bcl-2 و Bcl-x1 مورد مطالعه قرار گرفته است [24] غیر فعال شدن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا

می‌شود. از آنجا که ورود به مسیر آپوپتوز در بین سلول‌ها غیر هم‌زمان است، سلول‌هایی که متحمل فرایند مرگ سلولی آپوپتوتیک هستند، هر کدام می‌توانند در مراحل مختلف فرایند آپوپتوز از مورفولوژی نرمال تا مراحل نهایی لیز سلولی قرار داشته باشند. در بیشتر مطالعات، DNA استخراج شده از انواع رده‌های سلولی و انواع معرف‌های القاگر آپوپتوز، مخلوطی از حالت اسمیر و نردبانی قطعات DNA را نشان می‌دهد [30]. با استناد به این مطالعه، می‌توان اسمیر ایجاد شده در ژل آگارز را نشانه‌ای از DNA قطعه قطعه شده دانست.

مطالعه Singh و همکاران نشان داد که کاسپاز 3 در سلول HUVEC تیمار شده با سیلی‌بینین، افزایش می‌یابد، از آنجا که فعال شدن کاسپاز 3 برای قطعه قطعه شدن DNA ضروری است [31]. قطعه قطعه شدن DNA مشاهده شده در این مطالعه، می‌تواند با فعال بودن کاسپاز 3 مرتبط باشد.

به طور کلی این یافته‌ها تأیید خوبی بر مطالعه Singh و همکاران می‌باشد، که حاکی از اثر ضد رگرایی سیلی‌بینین از طریق القای مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در HUVEC بود. مطالعات بیشتری به منظور درک عمیق‌تر مکانیسم القای آپوپتوز توسط سیلی‌بینین در سطح بیان ژن کاسپازها و سایر مولکول‌ها و مواد درگیر در القای آپوپتوز در این رده سلولی مورد نیاز است.

5- منابع

- [1] Cassileth, B. R. and C. C. Chapman (1996). "Alternative and complementary cancer therapies." *Cancer* 77(6): 1026-1034.
- [2] Kuo, S.-M. (1997). "Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism." *Critical Reviews in Oncogenesis* 8(1): 47-69.
- [3] Wang, S., Z. Zheng, et al. (2004). "Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts." *Life sciences* 74(20): 2467-2478.
- [4] Imã Nek, V. M., N. Kottovã , et al. (2000).

ابتدا میزان اثر مهارى بر رشد سلول‌های HUVEC تیمار وابسته به غلظت سیلی‌بینین بررسی شد. نتایج، روند افزایشی مهار رشد این رده سلولی را در اثر تیمار با غلظت‌های 20 تا 600 میکرومولار، با میزان IC_{50} 143 میکرومولار نشان داد. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های 100، 200 و 300 میکرومولار سیلی‌بینین افزایش معناداری در فعالیت کاسپاز 9 در غلظت 100 میکرومولار نسبت به نمونه کنترل نشان داد. تیمار وابسته به زمان (24، 48 و 72 ساعت) سلول‌ها در غلظت 100 میکرومولار سیلی‌بینین افزایش معناداری در فعالیت کاسپاز 9 پس از 48 ساعت تیمار نشان داد. تیمار وابسته به غلظت سیلی‌بینین (100-400 میکرومولار) قطعه قطعه شدن DNA در غلظت 400 میکرومولار سیلی‌بینین را به دنبال داشت. سیلی‌بینین آپوپتوز را در سلول‌های HUVEC القا می‌کند و موجب مهار تکثیر این سلول‌ها می‌گردد [22].

Singh و همکاران در سال 2005 نشان دادند که تیمار HUVEC با سیلی‌بینین منجر به اختلال در پتانسیل غشای میتوکندری‌های سلول‌ها، فعال شدن کاسپاز 3 و 7 و افزایش میزان پروتئین Bax می‌گردد. رهایی سیتوکروم C یکی از اتفاقات اصلی فرایند آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی می‌باشد [27]. سیتوکروم C رها شده به درون سیتوزول، به همراه کاسپاز 9 و Apaf-1 کمپلکس پروتئینی آپوپتوزوم را تشکیل می‌دهد [28]. نتایج به دست آمده از این مطالعه مطابق با مطالعه Singh و همکاران می‌باشد. از آنجا که فعالیت کاسپاز 9 در اثر تیمار با سیلی‌بینین افزایش می‌یابد، به نظر می‌رسد که سیتوکروم C رها شده، کمپلکس آپوپتوزوم را با کاسپاز 9 تشکیل می‌دهد.

با وجود اینکه قطعه قطعه شدن DNA یکی از نشانه‌های آپوپتوز است و DNA قطعه قطعه شده به شکل نردبانی در ژل آگارز دیده می‌شود [29]، در برخی مطالعات DNA قطعه قطعه شده به شکل اسمیر نیز در ژل آگارز مشاهده

- "Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells." Anticancer research 23(3B): 2649-2655.
- [18] Kaur, M., B. Velmurugan, et al. (2009). "Silibinin suppresses growth and induces apoptotic death of human colorectal carcinoma LoVo cells in culture and tumor xenograft." Molecular cancer therapeutics 8(8): 2366-2374.
- [19] Ge, Y., Y. Zhang, et al. "Silibinin causes apoptosis and cell cycle arrest in some human pancreatic cancer cells." International journal of molecular sciences 12(8): 4861-4871.
- [20] Sah, N. K., Z. Khan, et al. (2006). "Structural, functional and therapeutic biology of survivin." Cancer letters 244(2): 164-171.
- [21] Osaki, M., M. a. Oshimura, et al. (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." Apoptosis 9(6): 667-676.
- [22] Singh, R. P., S. Dhanalakshmi, et al. (2005). "Silibinin strongly inhibits growth and survival of human endothelial cells via cell cycle arrest and downregulation of survivin, Akt and NF- κ B: implications for angioprevention and antiangiogenic therapy." Oncogene 24(7): 1188-1202.
- [23] Turner, C. E., R. W. Pemberton, et al. (1987). "Host utilization of native *Cirsium* thistles (Asteraceae) by the introduced weevil *Rhinocyllus conicus* (Coleoptera: Curculionidae) in California." Environmental Entomology 16(1): 111-115.
- [24] Agarwal, R., C. Agarwal, et al. (2006). "Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side." Anticancer research 26(6B): 4457-4498.
- [25] Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science 281(5381): 1312-1316.
- [26] McIlwain, D. R., T. Berger, et al. "Caspase functions in cell death and disease." Cold Spring Harbor perspectives in biology 5(4): a008656.
- [27] Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell 102(1): 33-42.
- [28] Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." Biochimie 84(2): 203-214.
- [29] Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Experimental cell research "Extract from *Silybum marianum* as a nutraceutical: A double-blind placebo-controlled study in healthy young men." Czech J. Food Sci. Vol 19(3): 106-110.
- [5] Bombardelli, E. and P. Morazzoni (1995). "Hypericum perforatum." Fitoterapia 66(1): 43-68.
- [6] Sujatha, K., L. N. Mathuram, et al. (2003). "Hepatoprotective effect of silymarin in experimentally induced aflatoxicosis in broilers." Toxicology International 10(1): 55-59.
- [7] Tiwari, P., A. Kumar, et al. "Silibinin-induced apoptosis in MCF7 and T47D human breast carcinoma cells involves caspase-8 activation and mitochondrial pathway." Cancer investigation 29(1): 12-20.
- [8] Gazak, R., D. Walterova, et al. (2007). "Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine." Current medicinal chemistry 14(3): 315-338.
- [9] Klagsbrun, M. and M. A. Moses (1999). "Molecular angiogenesis." Chemistry & biology 6(8): R217-R224.
- [10] Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." nature 407(6801): 249-257.
- [11] Brown, J. M. and L. D. Attardi (2005). "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." Nature Reviews Cancer 5(3): 231-237.
- [12] Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicologic pathology 35(4): 495-516.
- [13] Guchelaar, H. J., A. Vermes, et al. (1997). "Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy." Pharmacy world & science: PWS 19(3): 119-125.
- [14] Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovascular research 45(3): 528-537.
- [15] Soff, G. A. (2007). Role of Apoptosis in Anti-Angiogenic Cancer Therapies. Apoptosis, Senescence, and Cancer, Springer: 537-555.
- [16] Tyagi, A. K., R. P. Singh, et al. (2002). "Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis." Clinical Cancer Research 8(11): 3512-3519.
- [17] Sharma, G., R. P. Singh, et al. (2002).

[31] JÄnnicke, R. U., M. L. Sprengart, et al. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." Journal of Biological Chemistry 273(16): 9357-9360.

256(1): 12-18.

[30] Collins, J. A., C. A. Schandl, et al. (1997). "Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis." Journal of Histochemistry & Cytochemistry 45(7): 923-934.