



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

شماره ۳۹، تابستان ۱۴۰۰  
ص:ص: ۹۶-۸۹

## فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

### بررسی اثر لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر برای ممانعت از آپوتوز و نکروز القاء شده بوسیله ویروس آنفلوآنزا سویه H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>

• حمید رضا فرزین (نویسنده مسئول)<sup>۱</sup>، سعید زیبایی<sup>۲</sup>

۱- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

۲- دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۹۴۲۱۳

Email: H.Farzin@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2021.124940

چکیده:

آنفلوآنزا مرغی ساب تایپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> شایع می باشد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان می دهد که این ساب تایپ پتانسیل تبدیل شدن به ویروس بسیار بیماری زای H<sub>5</sub>N<sub>8</sub> را داشته و خطری برای بروز سویه های نو ظهور مقاوم به داروهای ضد ویروسی محسوب می شود. لاکتوفرین قادر است برخی از عفونت های ویروسی را کنترل نماید. در مطالعه حاضر، اثر لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر برای ممانعت از آپوتوز و نکروز القاء شده بوسیله ویروس آنفلوآنزا سویه H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> مورد بررسی قرار گرفت. جهت جدا سازی لاکتوفرین از کروماتوگرافی تعویض یونی بوسیله 50 CM Sephadex C- استفاده گردید. پس از بررسی اثر سمیت سلولی لاکتوفرین خالص شده و تیر ویروس جهت بررسی جود آپاپتوز و نکروز القاء شده توسط ویروس در کشت سلولی، از رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید و مشاهده با میکروسکوپ فلئورسانس استفاده شد. نتایج نشان داد که لاکتوفرین مانع از آپوتوز القاء شده توسط ویروس آنفلوآنزا H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> در کشت سلول می شود و قادر نیست مانع از نکروز القاء شده گردد.

واژه های کلیدی: لاکتوفرین، شیر شتر، آپوتوز، نکروز، آنفلوآنزا

Applied Animal Science Research Journal No 39 pp: 89-96

**Survey effects of Lactoferrin extracted from Camel Milk to prevent Apoptosis and Necrosis induced by H9N2 Influenza virus**By: Farzin, H, R\*<sup>1</sup>. Zibae, S<sup>2</sup>

1- Assistant professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Mashhad

2- Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Mashhad

**Received: March 2021****Accepted: May 2021**

Avian influenza subtype H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> is widespread. Phylogenetic analysis shows that this subtype has the potential to become a highly pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>8</sub> virus and is a risk factor for emerging strains resistant to antiviral drugs. Lactoferrin is able to control some viral infections. In the present study, the effect of Lactoferrin extracted from camel milk to prevent apoptosis and necrosis induced by influenza H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> strain was investigated. Ion exchange chromatography by CM Sephadex -C50 was used to isolate Lactoferrin. Purified Lactoferrin cytotoxicity and virus titer Acridine orange-Ethidium bromide staining was observed to detect apoptosis and virus-induced necrosis in cell culture and observed by fluorescence microscopy. The results showed that Lactoferrin inhibited apoptosis induced by influenza H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> virus in cell culture and could not inhibit induced necrosis.

**Key words:** Lactoferrin, Camel Milk, Apoptosis, Necrosis, Influenza**مقدمه**

ویروس آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> ویروسی RNA دار از خانواده ارتومیکسوویریده است. زیر مجموعه H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در ایران جداسازی و شناسایی شده است. خسارات فراوانی به صنعت طیور کشور وارد کرده است. این ویروس پستانداران را نیز آلوده می کند. ونیز می تواند به عنوان اهدا کننده ژن داخلی برخی ویروس های جدید آنفلوآنزای انسانی عمل نماید (۴،۳). داروهای مورد استفاده برای آنفلوآنزا به دو دسته تقسیم می شوند: الف) مهار کننده کانال پروتئین انتخابی M2 (ب) مهار کننده نورآمینیداز NA. افزایش مقاومت یک نگرانی کلی در داروهای ضد ویروس می باشد. بنابراین به داروهای ضد ویروس جدید برای جلوگیری و درمان عفونت آنفلوآنزا نیاز است (۱).

شیر شتر دارای بیواکتیو هایی مهمی است که عملکرد بیولوژیکی خاصی دارند. لاکتوفیرین یکی از مهم ترین بیواکتیو های شیر می

باشد که عملکرد های کلیدی و متنوع ای دارد. لاکتوفیرین گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن است که وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتونی دارد. لاکتوفیرین شیر شتر در مقایسه با لاکتوفیرین گونه های دیگر در برخی خصوصیات ساختمانی و عملکردی متفاوت است. همچنین مکان گلیکوزیله شدن لاکتوفیرین در شیر شتر با بقیه حیوانات تفاوت دارد (۵). لاکتوفیرین قادر به توقف رشد سلول های سرطانی بوده و باعث تقویت سیستم ایمنی می گردد و نیز استخوانزایی را تحت تاثیر قرار می دهد. و با مهار گیرنده های ویروس و اتصال به DNA و RNA اثرات ضد ویروس خود را اعمال می نماید (۲).

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی گفته می شود که طی آن در سلول ها تراکم کروماتین درون هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم، تقسیم DNA به قطعات، تخریب اسکلت سلولی، بالونی شدن سطح سلول و تولید اجسام آپوپتیک اتفاق خواهد افتاد (۳) مولکولهای

Sephadex C-50 استفاده شد. برای بررسی خلوص پروتئین در فراکسیون های جمع آوری شده به روش SDS PAGE- و رنگ آمیزی نیترا ت نقره برای دیدن باند حاوی پروتئین در ژل آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده گردید. به منظور تایید وجود لاکتوفرین در فراکسیون ها از آزمایش عدم واکنش رنگی لاکتوفرین باترا متیل بنزیدین (TMB) استفاده شد. میزان پروتئین داخل فراکسیون ها با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری و لاکتوفرین جدا شده با استفاده از آمونیوم سولفات ۹۰٪ تغلیظ گردید.

#### بررسی اثر سمیت سلولی لاکتوفرین خالص شده:

تعداد  $10^3 \times 8$  سلول MDCK در پلیت منتقل شده بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت را تخلیه و لاکتوفرین با غلظت ۲۵۰ nM اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شد بعد از آن مایه رویی را تخلیه و پس از شستشو با PBS و سپس افزودن محیط کشت بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر سمیت سلولی لاکتوفرین نسبت به کنترل منفی (چاهک های تیمار نشده با لاکتوفرین) با استفاده از آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس دستورالعمل *Agostina* و همکاران (۲۰۱۳) از آزمایش های میزان تغییر پذیری مورفولوژی سلول با مشاهده میکروسکوپی و میزان حیات با روش MTT استفاده گردید.

#### تعیین تیترو ویروس:

بدین منظور از مایع آلتوتویک برداشت شده از تخم مرغ های تزریق شده با ویروس رقت های ۵-۱۰ تا ۹-۱۰، تهیه و از هر رقت به حفره آلتوتویک ۵ عدد تخم مرغ SPF جنین دار ۹ تا ۱۱ روزه تزریق و داخل انکوباتور قرار داده شد. و تا سه روز تخم مرغ ها مورد بررسی قرار گرفته و آزمایش HA انجام گردید. تعداد نمونه های مثبت و منفی و تعداد جنین های تلف شده مشخص و بر اساس روش *Capua, 2009* تیترو ویروس تعیین گردید.

#### بررسی جود آپاتوزیس و نکروز در کشت سلولی حاوی ویروس:

بدین منظور از رنگ آمیزی *Ethidium Bromide* (AO-EB) و مشاهده با میکروسکوپ

تنظیم کننده آپوتوز به دو گروه اصلی تقسیم می شوند: ۱- پروتئین های خانواده BCL-2 (B-cell lymphoma 2) که در غشاء خارجی میتوکندری قرار دارند ۲- کاسپازها که در شروع و اجرای آپوتوز دخیلند و می توانند به وسیله برخی محرک ها از طریق دو مسیر مرکزی آپوتوز یعنی مسیر میتوکندریایی و مسیر خارجی فعال گردند. حدود ۱۴ نوع کاسپاز شناخته شده که یازده تا از آنها منشاء انسانی دارد. سلولهای طبیعی ممانعت کننده های خاصی را بر علیه کاسپازها به کار می گیرند. *Honardoost* و همکاران (۲۰۱۳) بر اساس مطالعات القاء آپوتوز توسط ویروس سویه H9N2 از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ صورت می گیرد که مراحل فعال سازی این آنزیم از طریق فعال شدن فاکتور *Nf-KB* ناشی از القاء *TRAIL* و *FAS/FASL* و القاء رونویس ژن های پروآپتوتیک مانند *P53* و *BAX* می باشد که از این طریق موجب القاء کاسپاز ۹ می گردد.

نکروز با بر هم خوردگی توانایی سلول برای نگه داری هموئوستازی شروع می شود. با نفوذ آب و یون های خارج سلولی تمام اندام های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم شده و سپس با از هم پاشیدگی غشاء سلولی، سلول تخریب می گردد. اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیمهای لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها شده و مرگ سلول از طریق نکروز با تخریب گسترده بافتی به علت پاسخ التهابی اتفاق می افتد (۳).

#### مواد و روش ها

##### مواد:

محیط کشت سلول RPMI-1640 از شرکت *Gibco*، تریپسین، قرمز خنثی (Neutral red)، محلول *MTT-Formazan*، *Ethidium* و *Acridine orange*، *Try pan blue* از شرکت *Bromide Sigma-Aldrich* - تترا متیل بنزیدین از شرکت *AppliChem* - رده سلولی (*Madin-34*) از شرکت *MDCK Darby Canine kidney- ATCC CCL-34*

##### روش ها:

#### جدا سازی و خالص کردن لاکتوفرین:

جهت چربی زدایی و جدا سازی کازئین از آب پنیر از سانتریفیوژ و بمنظور کروماتوگرافی تعویض یونی از رزین سفادکس CM

## ۲ بررسی آماری :

بدین منظور از هر نمونه آزمایش و کنترل منفی سه تکرار در نظر گرفته شده و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS Microsoft Excel 2010. 14.0 , آزمون Student t – test انجام و داده ها با ارزش  $P < 0.5$  معنی دار تلقی گردید.

### نتایج

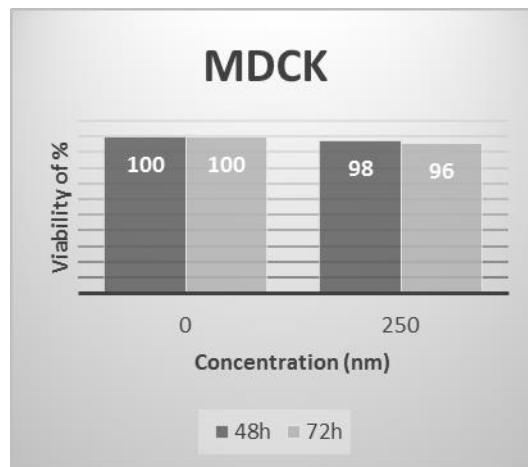
#### نتایج حاصل از استخراج وخالص سازی لاکتوفرین

وجود پروتئین فراکسیون های جمع آوری شده حاصل از شستشوی ستون ها در کروماتوگرافی تعویض یونی تایید گردید. خالص بودن پروتئین ( تک باند ۸۰ کیلو دالتون ) با استفاده از SDS- PAGE در فراکسیون با غلظت های ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، مولار را نشان داد. نتایج حاصل از تایید وجود لاکتوفرین با استفاده از واکنش رنگی باتترا متیل بنزیدین نشان داد که در فراکسیون های ۰/۶، ۰/۷، مولار، لاکتوفرین وجود داشته که پس از تغلیظ، میزان ۷۳۱/۳۸ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد.

#### نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی لاکتوفرین

**استخراج شده:** همانطور که در نمودار ۲-۳ نشان داده شده است لاکتوفرین با غلظت ۲۵۰ نانو مول هیچ اثر سمی بر روی سلول های MDCK نداشته است.

فلئورسانس استفاده شد. برای رنگ آمیزی با AO/EB سلول ها را در پلیت کشت سلولی که در آن یک لامل قرار داده شده کشت شده و ۷۲ ساعت بعد از اثر دادن ویروس و لاکتوفرین ، شستشو با PBS انجام و سلول ها با پارافمالدئید (Paraformaldehyde) ۲٪ فیکس و AO/EB اضافه و پلیت را در مکان تاریک قرار داده شد. نتایج ( لامل هر چاهک) با میکروسکوپ فلئورسانس مشاهده گردید. اگریدین ارنج (AO) رنگ حیاتی است که به DNA سلولها متصل می گردد. سلول های زنده در اثر اگریدین ارنج رنگ سبز یکنواخت می گیرند. سلول هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز می باشند رنگ سبز گرفته و دارای نقاط روشن سبز در هسته هستند که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می دهند. اتیدیم بروماید (EtBr) سلولهایی را رنگ می کند که تمامیت غشاء خود را از دست داده باشند. سلول هایی که در مراحل آخر آپوپتوز می باشند رنگ اتیدیم بروماید را از خود عبور می دهند و بدین ترتیب رنگ نارنجی می گیرند در مقایسه با سلول های آپوپتوز ثانویه که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می دهند، سلولهای نکروز شده نیز به رنگ نارنجی در آمده اما کروماتین آنها متراکم و قطعه قطعه نمی شوند (۱).



نمودار ۲-۳- تاثیر لاکتوفرین با غلظت ۲۵۰ نانو مول بمدت ۷۲ ساعت بر روی زنده ماندن سلول های MDCK

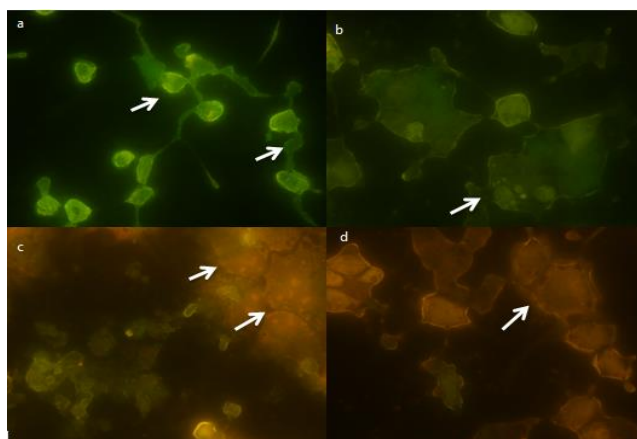
### نتایج حاصل از تعیین تیترو ویروس:

نتایج نشان داد که تیترو ویروس ۹/۵ واحد دریک میلی لیتر می باشد.

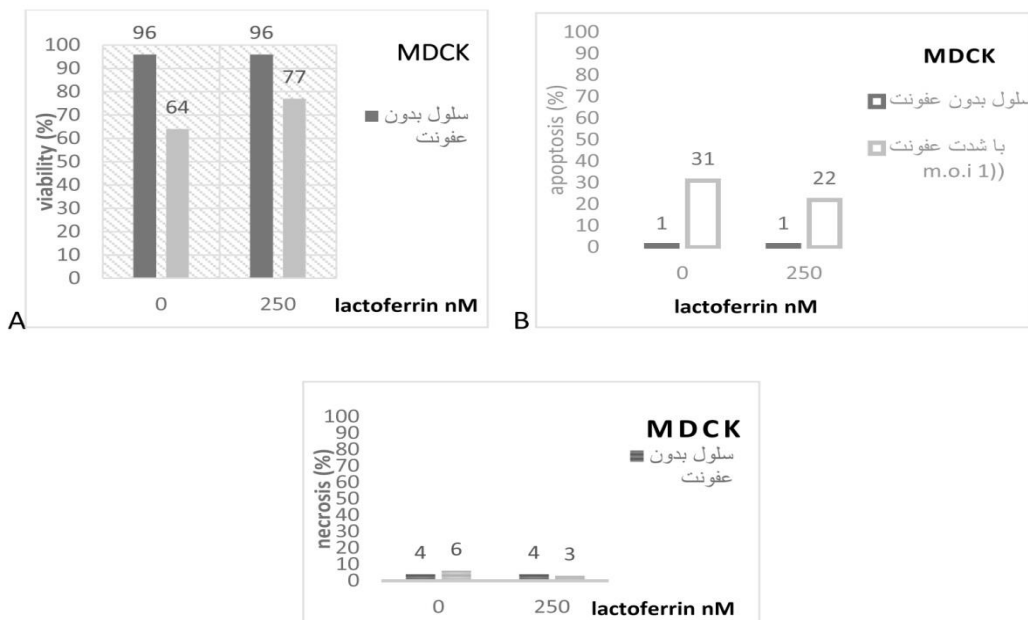
### بررسی جود آپتوزیس و نکروز در کشت سلولی حاوی ویروس:

نتایج نشان داد که لاکتوفیرین استخراج شده از شیر شتر نسبت به گروه کنترل به میزان زیاد مانع از آپتوزیس شده توسط ویروس آنفلوآنزا بر سلولهای MDCK شده است (نتایج معنی دار می باشد).

باشد. نمی توان کاملا اطمینان داشت که لاکتوفیرین استخراج شده از شیر شتر از چه مسیری مانع القاء آپتوزیس می شود ولی با توجه به تحقیقات صورت گرفته، *Agostina* و همکاران (۲۰۱۳) احتمالاً مسیر اثر لاکتوفیرین شتر نیز از مسیر کاسپاز ۳ می باشد. همچنین نتایج نشان داد که لاکتوفیرین استخراج شده از شیر شتر نسبت به گروه کنترل مانع از نکروز القاء شده توسط ویروس آنفلوآنزا بر سلولهای MDCK نشده است (نتایج معنی دار نمی باشد).



تصویر (۳-۴): سلول های MDCK رنگ آمیزی شده با AO/ET مشاهده شده با میکروسکوپ فلئورسانس (a) سلول های زنده (b) مراحل اولیه آپتوزیس (c) مراحل ثانویه آپتوزیس (d) نکروز



نمودار (۳-۴): تاثیر لاکتوفیرین با غلظت ۲۵۰ نانو مول جهت درصد سلول های زنده (A) آپتوزیس (B) نکروز (C) القاء شده توسط ویروس آنفلوآنزا  $H_3N_2$  بر روی سلول های MDCK

## توصیه ترویجی

با توجه به نتایج مقاله توصیه می گردد تا هنگام سرما خوردگی (مخصوصا با علائم آنفلوآنزا) از شیر شتر استفاده گردد

## بحث

در دسترس بودن طیف گسترده از داروهای ضد ویروس برای مبارزه با آنفلوآنزا بسیار مهم می باشد. به خصوص دانستن ترکیبی از داروهای ضد آنفلوآنزا با هدف های مختلف ویروس یا دارای مکانیسم های عمل مختلف بسیار اهمیت دارد که باعث درمان فعال تر آنفلوآنزا و به حداقل رساندن ظهور سویه های مقاوم ویروس می شود.

از سوی دیگر با توجه به مثبت شدن آنتی بادی ضد H9N2 در کارکنان صنعت طیور این ویروس توانایی آلوده کردن بافت پوششی نای انسان را پیدا کرده است و به نظر می رسد بروز تغییرات در آن در راستای آلوده نمودن انسان است (۵).

کودکانی که با شیر تغذیه می شوند بر علیه بیماری های عفونی، تنفسی و مجاری روده ای مقاوم می باشند. شیر علاوه بر ترشح IgA،

IgM دارای ترکیبات متعددی به غیر از آنتی بادی از جمله لاکتوفرین می باشد که دارای فعالیت ضد میکروبی می باشد. از سال ۱۹۹۴ فعالیت ضد ویروس لاکتوفرین انسانی و گاوی بر علیه ویروسهای دارای پوشش و فاقد پوشش نشان داده شده است. لاکتوفرین شتر قادر است همآگلوتیناسیون ویروس را مهار نماید (۷).

همان طور که *Grazia* و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادند لاکتوفرین گاوی به ناحیه ای از HA (ساب تایپ HA2) متصل می شود که دارای توالی حفاظت شده می باشد که نشان دهنده ویژگی گسترده فعالیت ضد آنفلوآنزایی لاکتوفرین می باشد (۸،۵).

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی در حقیقت یک سری از وقایع است، که از بین بردن موثر سلول و محتویات آنرا با نهایت کارایی به انجام می رساند. گرچه بعضی از ویروس ها آپوپتوز را سرکوب می کنند ولی چندین نوع ویروس باعث القاء آپوپتوز در اواخر مرحله عفونت در سلول میزبان شده که در نهایت باعث

گسترش ویروس می شوند. آنفلوآنزا A و B محرک آپوپتوز در کشت سلولی می باشند. نتایج این تحقیق و محققین دیگر نشان داد که لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر نسبت به گروه کنترل به میزان زیاد مانع از آپوپتوز القاء شده توسط ویروس آنفلوآنزا بر سلولهای MDCK می گردد. نمی توان کاملاً اطمینان داشت که لاکتوفرین استخراج شده از شیر شتر از چه مسیری مانع القاء آپوپتوز می شود ولی با توجه به تحقیقات صورت گرفته (۱)، احتمالاً مسیر اثر لاکتوفرین شتر نیز از مسیر کاسپاز ۳ می باشد. اگرچه احتمال اینکه لاکتوفرین مانع رونویسی ژنهای القاء کننده آپوپتوز از جمله HA، NA و NP گردد نیز وجود دارد. در حال حاضر هیچ مدرکی برای ویروس آنفلوآنزا وجود ندارد که چه عاملی مستقیماً باعث القای آپوپتوز می شود. تا به امروز چندین عامل که باعث القاء آپوپتوز می شود در ویروس آنفلوآنزا شناخته شده است که عبارتند از: NA، NS1، dsRNA و محصور ژن PB1-f2. عنصر اصلی تجهیز کردن آپوپتوز توسط سویه H9N2 سیستم پروتئولایتیک تشکیل شده از خانواده پروتئازهای سیستمی می باشد که کاسپاز نامیده می شود. دو گروه از کاسپازها شناخته شده اند. کاسپازهای آغاز کننده مانند کاسپاز ۸ و ۹ که باعث شکست و آغاز دیگر کاسپازها می شوند. گروه دوم کاسپازهای فعال که شامل کاسپاز ۳، ۶ و ۷ می باشند که باعث شکست دیگر لایه های سلولی می شوند در نتیجه ساختار سلولی را به هم می زنند یا آنزیم ها را غیر فعال می کنند. کاسپاز ۳ به عنوان نقش مرکزی در تنظیم آپوپتوز به شدت مورد مطالعه قرار گرفته است (۵).

Agostina و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد آپوپتوزی لاکتوفرین گاوی به خصوص در غیر فعال کردن کاسپاز ۳ را مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش توسط ویروس آنفلوآنزا آپوپتوز بر سلولهای MDCK القاء شد در نهایت توسط لاکتوفرین تحت درمان قرار گرفتند نشان داد که لاکتوفرین مانع فعالیت کاسپاز ۳ می شود. این یافته بسیار مهم است چون ویروس آنفلوآنزا با فعال کردن آپوپتوز از طریق کاسپاز ۳ انتشار پیدا می کند (۱).

- 4-Isui, A. García,M. Siqueiros,T. C. Arévalo,G.S.and Rascón-Cruz ,Q. 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein.An overview Biochimical et biophysica Acta. Mar;1820(3):226-36.
- 5- Khan, J. Kumar, P. Raghvendra, P. Sahani, M, Sharma, S and. Srinivasan, A. (2001) Camel Lactoferrin, a Transferrin-cum-Lactoferrin: Crystal Structure of Camel Apolactoferrin at 2.6 Å Resolution and Structural Basis of its Dual Role. J. Mol. Biol. 309, 751±761.
- 6- SchultzCherry, S. Koci, M. Thompson, E. and Tumpey, TM. (2003) Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis. Avian Dis;23:968-71
- 7-Sorina.V,N. (2020) Structure and inhibitory activity of lactoferrin in relation to influenza virus.Journal of Infection and Immuniti. Volume 10, No. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POL-1156>
- 8-Supert ,F . Agamennone ,M Pietranton ,A. Grazia Ammendolia,M.(2019) Bovine Lactoferrin Prevents Influenza A Virus Infection by Interfering with the Fusogenic Function of Viral Hemagglutinin. Viruses , 11, 51; doi:10.3390/v11010051

همچنین نتایج نشان داد که لاکتوفیرین استخراج شده از شیر شتر نسبت به گروه کنترل مانع از نکروز القاء شده توسط ویروس آنفلوآنزا بر سلولهای MDCK نشده است .

#### منابع

- 1- Agostina P, Eleonora D, Maria Grazia A, Concetta F, Antonella T, Simona P, Isabella D, Fabiana S. (2010) Bovine lactoferrin inhibits Influenza A virus induced programmed cell death in vitro. Biometals 23:465–475.
- 8-González,C. Susana ,A. Sigifredo, A.G.and Quintín ,R,C. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents , 33: 301–308.
- 2-Grazia Ammendolia,M. Agamennone ,M. Pietranton ,A. Lannutti,F. Anna Siciliano,R .De Giulio,B. Amici,C. Superti,F.(2012). Bovine lactoferrin-derived peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus. Pathogens and Global Health VOL.106 Pages 12-19 - Published online: 12 Nov 2013
- 3- Honardoost , M. Soleimanjahi, H. and Rajaei, F. (2013) Apoptosis: programmed cell death. Medical Sciences, Qazvin, Iran. JQUMS, Vol.17, No.3, pp. 48-57.

