



Effect of Curcumin on Docetaxel-Induced Apoptosis in the DU145 (Prostate) Cell Line Using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide Assay

Mohammad Shokrzadeh (Ph.D)¹  , Elahe Gharekhani (Ph.D)^{*2} 

Mahboube Rahmati Kukandeh³ , Mahsa Hosseini⁴ 

¹ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ² Ph.D in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ³ Ph.D Candidate in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ⁴ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran.

Research Article

Abstract

Background and Objective: Prostate cancer is one of the most common malignancies worldwide. Docetaxel (DTX) is proposed as a well-known compound for prostate tumor chemotherapy, and its function is based on inhibiting microtubule depolymerization, disrupting microtubule balance, and consequently delaying cell cycle progression. Complications of DTX include hypersensitivity reactions, red blood cell aggregation, neutropenia, neurological problems, such as paralysis, fluid retention, bronchospasm, refractory hypotension, ADRS, respiratory impairment, cardiac dysfunction, ventricular tachycardia, cystoid macular edema, optic nerve damage, conjunctivitis, and keratopathy. This study aimed to determine the effect of curcumin on DTX-induced apoptosis in the DU145 (prostate) cell line using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Methods: This descriptive analytical study was conducted on the DU145 (prostate) cell line, purchased from the National Genetic Resources Cell Bank, at the Cell Culture Laboratory of the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences. Cells were passaged for exposure to the desired drugs. Groups included curcumin at concentrations of 2, 4, 6, 8, and 10 µg/mL and DTX at a concentration of 4.46 µg/mL. Cells were incubated in triplicate for 24 hours. For the MTT assay, the culture rate was 10⁴ cells per well. Apoptosis testing was designed for four groups (DTX at a concentration of 4.46 µM, curcumin at a concentration of 2 µM combined with DTX at an optimal concentration, curcumin at a concentration of 10 µM combined with DTX at an optimal concentration, and curcumin at a concentration of 10 µM alone), with the culture rate of 5×10⁵ cells per well in 6-well plates. After cell exposure, MTT and apoptosis determination assays were performed.

Results: DTX reduced the viability of DU145 (prostate) cells by approximately 50% (P<0.05). Groups treated with curcumin combined with DTX showed a dose-dependent decrease in cytotoxicity and an increase in the viability of DU145 (prostate) cells (P<0.05). Additionally, curcumin was able to reduce apoptosis in DU145 (prostate) cells by 90%.

Conclusion: Curcumin increases cell viability and reduces apoptosis in DU145 (prostate) cells.

Keywords: Docetaxel, Curcumin, Apoptosis

***Corresponding Author:** Elahe Gharekhani (Ph.D), E-mail: egh199012@gmail.com



Received 10 Jun 2024 Received in revised form 26 Aug 2024 Accepted 2 Nov 2024 Available Online 3 Jul 2025

Cite this article as: Shokrzadeh M, Gharekhani E, Rahmati M, Hosseini M. [Effect of Curcumin on Docetaxel-Induced Apoptosis in the DU145 (Prostate) Cell Line Using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide Assay]. J Gorgan Univ Med Sci. 2025; 27(2): 61-69. <http://dx.doi.org/10.21859/JGorganUnivMedSci.27.2.61>. [Article in Persian]





Introduction

Curcumin is the primary active compound of the turmeric plant (*Curcuma longa*). This yellow-colored herbal product also contains other compounds, such as demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. Curcumin typically exerts its effects through various pharmacological processes, including antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, apoptotic, and hepatoprotective actions. In addition to its antitoxigenic properties, some studies have shown that curcumin possesses antinephrotoxic and antihepatotoxic effects. The antioxidative, antiproliferative, and anti-angiogenic properties of curcumin have garnered significant attention in recent years. However, its poor solubility and rapid degradation have hindered its clinical application. Consequently, recent research has focused on designing and developing polymeric micelles (PMMCs) at the nanoscale to enhance the cellular delivery of curcumin. Studies have shown improved cellular uptake of curcumin when formulated with these polymeric compounds. Specifically, F68-Cis-Cur micelles have demonstrated greater cytotoxic effects against A2780 and SMMC 7721 cells compared to pure curcumin, culminating in a more pronounced reduction in mitochondrial membrane potential and induction of cellular apoptosis.

Curcumin is a flavonoid compound, and flavonoids are present in various plants. In *in vitro* studies, these compounds have been identified as antioxidants due to their unique structure, acting through the inhibition of lipid peroxidation (LPO), scavenging free radicals, and chelating metal ions. Additionally, flavonoids are recognized as antioxidant, cardioprotective, anti-inflammatory, and anticancer agents. Overall, flavonoids exert several protective effects in the brain, including positive effects against neurotoxins, suppression of neuroinflammation, and the ability to promote memory, cognitive functions, and learning.

Docetaxel (DTX), a chemotherapy drug marketed under the brand name Taxotere and others, is used to treat various cancers, including breast cancer, head and neck cancers, gastric cancer, prostate cancer, and non-small cell lung cancer (NSCLC), either as a monotherapy or in combination with other chemotherapeutic agents. DTX is a cytotoxic chemotherapeutic agent that binds to β -tubulin subunits, prevents microtubule depolymerization, and consequently leads to mitotic arrest, apoptosis, and inhibition of cell proliferation. Additionally, *in vitro* studies show it inhibits androgen receptor (AR) nuclear translocation and AR expression.

Apoptosis is a physiological and biological process essential for active and normal development, as well as for maintaining homeostasis. In situations where the survival of a cell jeopardizes the existence of the living organism, the cell commits suicide through programmed death. When a cell is exposed to various environmental or even internal factors, such as ionizing radiation, cytotoxic drugs (used in cancer treatment), hyperthermia,

and glucocorticoid hormones, its contents, including DNA, undergo changes. If the cell were to continue living with these alterations, it could lead to severe abnormalities, including cellular carcinogenesis. Intracellular pathogenic bacteria, such as *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Legionella* can also contribute to guiding the cell toward this specific type of cell death during infection by altering certain intracellular metabolic and biochemical pathways.

Programmed cell death is initiated through various pathways. Some of these pathways are triggered by the binding of ligands to cell surface receptors, while others are activated by the absence of certain growth factors. Severe damage to the cell's genetic material can also initiate various pathways leading to apoptosis.

This study aimed to determine the effect of curcumin on DTX-induced apoptosis in the DU145 (prostate) cell line using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Methods

This descriptive analytical study was conducted on the DU145 (prostate) cell line, purchased from the National Genetic Resources Cell Bank, at the Cell Culture Laboratory of the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences.

Cellular Culture: The cell line was cultured in the Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin antibiotic. Cells were maintained in an incubator at 37°C with adequate humidity and 5% carbon dioxide. For various experiments, when cell confluence reached at least 70-80%, cells were detached from the flask bottom using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), without any shaking or tapping of the flask, and then centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The resulting cell pellet was resuspended in 1 mL of culture medium, and the viability of cells in the suspension was determined by mixing equal parts of trypan blue and counting with a hemocytometer under a light microscope.

The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay Procedure: In the pre-treatment phase, curcumin at concentrations of 0, 10, 25, 50, 100, and 200 μ M was applied to 96-well plates 24 hours prior to the addition of DTX at concentrations of 1.65, 0.87, 13.39, 3.0, and 6.25 mg/mL. This method serves as a competitive metabolic assay and evaluates mitochondrial function.

The cell viability percentage was calculated using the following equation:

$$\text{Cell Viability Percentage} = \frac{\text{Mean Optical Density (OD) of Treated Cells}}{\text{Mean OD of Control}} \times 100$$

The grouping was as follows:

Group 1: DTX at a concentration of 4.46 μ M (optimal)

Group 2: Curcumin at a concentration of 2 μ M combined with DTX at a concentration of 4.46 μ M



(optimal)

Group 3: Curcumin at a concentration of 10 μ M combined with DTX at a concentration of 4.46 μ M (optimal)

Group 4: Curcumin at a concentration of 10 μ M alone

Cell Apoptosis Measurement: Cellular apoptosis was investigated at the cellular level using an Annexin flow cytometry kit to assess the effects of drug exposure. Flow cytometric analysis was performed on DU145 (prostate) cells stained with Annexin V-FITC/PI.

Results

The Effect of Curcumin on Docetaxel-Induced Cell Viability in DU145 (Prostate) Cell Line Using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay: Treatment with DTX at a concentration of 46.4 μ M (IC₅₀) resulted in a 50% reduction in cell viability compared to the control group ($P < 0.001$). In groups treated with DTX combined with curcumin (2, 4, 6, 8, and 10 μ M), there was a statistically significant difference compared to the DTX-alone group ($P < 0.001$), leading to an increase in cell viability (Figure 1). Furthermore, the highest cell viability was observed in the control group, while the lowest cell viability was in the DTX-alone group.

The Effect of Curcumin on Docetaxel-Induced Apoptosis in DU145 (Prostate) Cell Line: Cells were distributed into four quadrants (Q1-Q4). Q1 cells were defined as necrotic PI (+) cells. Q2 cells indicated late apoptosis PI (+) and Annexin (+). Q3 cells represented early apoptosis with Annexin V (+). Finally, live cells were in Q4, characterized as PI (-) or Annexin V (-). Evaluation of the drug groups was performed at optimal drug concentration alone, protective agent at minimum and maximum concentrations combined with the drug at optimal concentration, and protective agent at maximum concentration alone. Significant changes in apoptotic and necrotic cells were observed in treatment using curcumin at its highest concentration (Figure 2-C) and curcumin at its highest concentration combined with DTX (Figure 2-D). Moreover, the DTX group exhibited 18.7% viable cells. The observed antitumor effect in DU145 cells

treated with curcumin in combination was greater than that of DTX alone.

Conclusion

DTX reduced the viability of DU145 (prostate) cells by approximately 50%. Additionally, groups treated with curcumin in combination with DTX showed a dose-dependent decrease in cytotoxicity, leading to an increase in DU145 (prostate) cell viability. Additionally, curcumin was able to enhance the induction of apoptosis in DU145 (prostate) cells.

Ethical Statement

The study received approval from the Research Ethics Committee at Ramsar Self-Governing Campus, Mazandaran University of Medical Sciences (IR.MAZUMS.RIB.REC.1403.006).

Funding

This article has been extracted from the doctoral dissertation of Ms. Mahsa Hosseini in Pharmacy at Ramsar Self-Governing Campus, Mazandaran University of Medical Sciences. This study was funded by the Vice-Chancellor for Research and Technology, Mazandaran University of Medical Sciences.

Authors' Contributions

Mohammad Shokrzadeh: Project administration and design and approval of the final manuscript.

Elahe Gharehkhani: Data analysis, interpretation of the results, and drafting of the initial manuscript.

Mahboube Rahmati Kukandeh: Data collection.

Mahsa Hosseini: Project execution.

Conflicts of Interest

No conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the research officials of the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, and the thesis committee for their assistance in conducting and improving the quality of this study.

DTX led to a decrease in cell viability, while in the groups receiving curcumin, cell viability increased. Additionally, curcumin was able to increase the rate of apoptosis in DU145 (prostate) cells. Therefore, the use of antioxidant compounds is suggested to improve the efficacy and reduce the complications of chemotherapy.



تحقیقی

اثر کورکومین در القای آپوپتوز ناشی از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات) به روش MTT

دکتر محمد شکرزاده^۱، دکتر الهه قره‌خانی^{۲*}، محبوبه رحمتی کوکنده^۳، مهسا حسینی^۴

۱ استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۲ دکتری تخصصی سم‌شناسی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۳ دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۴ دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سراسر جهان است. دوستاکسل به عنوان ترکیب شناخته شده برای شیمی‌درمانی تومور پروستات پیشنهاد می‌شود و عملکرد آن مبتنی بر مهار دیپلمیریزاسیون میکروتوبول‌ها، اختلال در تعادل میکروتوبول‌ها و متعاقب آن تاخیر در پیشرفت چرخه سلولی است. از جمله عوارض جانبی دوستاکسل می‌توان به واکنش‌های حساسیتی، تجمع گلبول‌های قرمز، نوتروپنی، مشکلات عصبی مانند فلجی، احتباس مایعات، برونکواسپاسم، کاهش فشار خون مقاوم، ADRS، نقص تنفسی، نقص عملکردی قلبی، تاقیکاردی بطنی، ادم سیستمیوید ماکولا، آسیب عصب بینایی، ورم ملنجه و کراتوپاتی اشاره کرد. این مطالعه به منظور تعیین اثر کورکومین در القای آپوپتوز ناشی از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات) به روش MTT انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی DU145 (پروستات) خریداری شده از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. پاساژ سلول برای تماس با داروهای موردنظر در گروه‌های شامل غلظت‌های کورکومین ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۴/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر دوستاکسل به صورت triplicate به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزان کشت برای تست MTT برابر با ۱۰ سلول در هر چاهک بود. برای تست آپوپتوز در ۴ گروه (دوستاکسل در غلظت ۴/۶ میکرومولار، کورکومین در غلظت ۲ میکرومولار به همراه دوستاکسل در غلظت اپتیمم، کورکومین در غلظت ۱۰ میکرومولار به همراه دوستاکسل در غلظت اپتیمم و کورکومین در غلظت ۱۰ میکرومولار به تنهایی) با میزان کشت سلول در پلیت ۶ خانه به میزان 5×10^5 سلول در هر چاهک، طراحی گردید. پس از تماس با سلول‌ها تست‌های MTT و تعیین میزان آپوپتوز انجام شد.

یافته‌ها: دوستاکسل میزان حیات سلول‌های DU145 (پروستات) را نزدیک به ۵۰ درصد کاهش داد ($P < 0.05$). گروه‌های دریافت کننده کورکومین به همراه دوستاکسل به صورت وابسته به دوز از میزان سمیت سلولی کاستند و سبب افزایش میزان حیات سلول‌های DU145 (پروستات) شدند ($P < 0.05$). همچنین کورکومین توانست میزان آپوپتوز را در سلول‌های DU145 (پروستات) ۹۰ درصد کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: کورکومین سبب افزایش میزان حیات سلولی می‌گردد. همچنین کورکومین می‌تواند میزان آپوپتوز را در سلول‌های DU145 (پروستات) کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: دوستاکسل، کورکومین، آپوپتوز

* نویسنده مسؤول: دکتر الهه قره‌خانی، پست الکترونیکی: egh199012@gmail.com

نشانی: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی و داروشناسی، تلفن: ۰۱۱-۳۳۰۴۴۰۰۰ داخلی ۲۰۳۸

وصول ۱۴۰۳/۳/۲۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۳/۶/۵ پذیرش ۱۴۰۳/۸/۱۲ انتشار ۱۴۰۴/۴/۱۲

مقدمه

کورکومین ماده موثره و اصلی گیاه زردچوبه با نام انگلیسی Turmeric و نام علمی *Curcuma longa* است. این فرآورده گیاهی به رنگ زرد بوده که البته علاوه بر کورکومین ترکیبات دیگر مانند دس متوکسی کورکومین و بیس دس متوکسی نیز در آن وجود دارد. زردچوبه به عنوان چاشنی به فراوانی در غذا در کشورهای

مختلف استفاده می‌شود.^۱ این فرآورده کریستالی و متبلور در مصارف پزشکی هند کاربرد بسیاری دارد. اخیراً اثرات مفید کورکومین بر سرطان‌های معده، کولون و دهان در موش سوری به اثبات رسیده است.^۲ معمولاً کورکومین نقش خود را از طریق پروسه فارماکولوژیکی از قبیل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، آنتی‌ترومبوتیک، اپوپتیک و اثرات حفاظتی کبدی ایفا می‌کند. به جز

عوامل مختلف محیطی یا حتی درونی همانند پرتوهای یونیزه کننده، داروهای گشنده سلول (در درمان سرطان‌ها) هایپرترمی و هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی قرار گیرد؛ درونمایه آن از جمله DNA دستخوش تغییراتی می‌شوند که در صورت ادامه حیات آن منجر به ناهنجاری‌های شدیدی از جمله سرطانی شدن سلول می‌شوند. عوامل دیگری نظیر برخی باکتری‌های بیماری‌زای داخل سلولی مانند سالمونلا، شیگلا، لیستریا و لژیونلا نیز در هنگام عفونت‌زایی خود با تغییر، در برخی مسیرهای متابولیکی و زیست شیمیایی داخل سلولی می‌توانند در هدایت سلول به سمت این نوع خاص از مرگ مؤثر باشند.^{۱۳}

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق مسیرهای مختلفی برانگیخته می‌شود. برای مثال زمانی که سلول کشنده طبیعی (یکی از انواع لنفوسیت T) به سلول‌های سرطانی یا آلوده به ویروس متصل می‌شود؛ پروتئینی به نام پرفورین ترشح می‌کند. این پروتئین منفذی در غشای سلول ایجاد کرده و آنزیم القاء کننده مرگ برنامه‌ریزی شده وارد سلول می‌شود و با به راه انداختن زنجیره‌ای از واکنش‌های به هم پیوسته باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود.^{۱۴} برخی از این مسیرها در اثر اتصال لیگاند‌هایی به گیرنده‌های سطح سلول و برخی دیگر از این مسیرها در اثر فقدان برخی عوامل رشد راه‌اندازی می‌شوند. آسیب‌های شدید به ماده ژنتیکی سلول نیز می‌تواند مسیرهای مختلفی که منجر به آپوپتوز می‌شوند را راه‌اندازی کند.^{۱۵} این مطالعه به منظور تعیین اثر کورکومین در القای آپوپتوز ناشی از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات) به روش MTT انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی DU145 (پروستات) (شکل یک) خریداری شده از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال‌های ۱۴۰۳-۱۴۰۲ انجام شد.

کشت سلولی: رده سلولی در محیط کشت RPMI با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری گردید. برای انجام تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۸۰-۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند؛ توسط تریپسین-اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) بدون هیچگونه shake و ضربه به فلاسک حاوی سلول، از ته فلاسک جدا شدند. سپس در دور RPM ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون

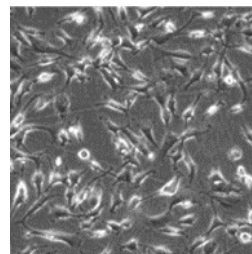
آثار آنتی‌توکسیژنیک کورکومین در بعضی مطالعات آثار ضدنفروتوکسیک و آنتی‌هپاتوتوکسیک دارد.^{۴،۳} خواص آنتی‌اکسیداتیو، آنتی‌پرولیفراتیو سلولی و آنتی‌آپوپتوزیک کورکومین در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است؛ اما حلالیت کم کورکومین و تخریب شدید آن باعث عدم امکان معرفی آن در کاربرد بالینی شده و در سال‌های اخیر مطالعات و بررسی‌هایی برای تهیه و طراحی PMMCs (polymeric micelles) در مقیاس نانو برای بهبود انتقال سلولی کورکومین انجام و مشاهده شده جذب سلولی کورکومین با این ترکیبات پلی‌مریک بهتر بوده است.^۵ F68-Cis-Cur micelles اثرات سایتوتوکسیک بیشتری علیه سلول‌های A2780 و SMMC 7721 نسبت به کورکومین خالص داشته و سبب کاهش بیشتر پتانسیل غشا میتوکندریایی و ایجاد آپوپتوز سلولی شده است.^{۶،۷}

کورکومین یک ترکیب فلاونولی است و فلاونوئیدها در گیاهان مختلفی وجود دارند. انسان به‌طور اساسی این ترکیبات را از طریق مصرف میوه، سبزی و نوشیدنی‌ها به‌دست می‌آورد. در تحقیقات *in vitro* این ترکیبات از طریق مهار لیپید پروکسیداسیون، به‌چنگ انداختن رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کننده یون‌های فلزی، به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت مطرح گردید که این خاصیت به دلیل وجود ساختار بی‌نظیر آنها ذکر شد.^۸ همچنین فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت، محافظت کننده قلبی، ضدالتهاب و ضدسرطان شناخته شده‌اند.^۹ به‌طور کلی فلاونوئیدها در مغز دارای چند اثر حفاظتی شامل اثر مثبت در مقابل سموم عصبی، سرکوب التهاب‌های عصبی و توانایی افزایش (promote) حافظه و کارکردهای شناختی و یادگیری هستند.^{۱۰}

دوستاکسل (Docetaxel) نوعی داروی شیمی‌درمانی است که با نام تجاری تاکسوتر (Taxotere) یا سایر نام‌های تجاری در درمان برخی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان، سرطان‌های سر و گردن، سرطان معده، سرطان پروستات و سرطان ریه (نوع غیرسلول کوچک) به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته است.^{۱۱} DTX یک ماده شیمی‌درمانی سیتوتوکسیک است که به زیر واحد β -توبولین متصل شده و از این طریق از دپلمریزاسیون میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌کند و منجر به توقف میتوزی، آپوپتوز و مهار تکثیر سلولی می‌شود. همچنین از انتقال هسته‌ای گیرنده آندروژن (AR) و بیان AR در آزمایشات جلوگیری می‌کند.^{۱۲}

آپوپتوز روندی فیزیولوژیک و زیستی برای نمو فعال و طبیعی و همچنین حفظ هموستازی است. در مواردی که زنده ماندن یک سلول، موجودیت موجود زنده را به‌خطر اندازد؛ سلول با مرگ برنامه‌ریزی شده، خودکشی می‌کند. زمانی که سلول تحت تأثیر

سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریانبلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰-۸۰ درصد برای انجام تست استفاده شد.^{۱۶}



شکل ۱: سلول‌های DU145

روش انجام آزمون MTT: در حالت pre-treatment کورکومین صفر، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μM ، ۲۴ ساعت قبل از داروی دوستاکسل ۱/۶۵ mg/ml، ۰/۸۷، ۰/۱۳/۳۹ و ۳/۰ به پلیت‌های ۹۶ خانه تریت شدند.^{۱۷} برای تهیه غلظت‌های مختلف کورکومین (با کد ۷-۳۷-۴۵۸)، پودر کورکومین ۱/۱ میلی گرم در یک میلی لیتر DMSO حل شد. از این محلول غلیظ ۳۶۰ میکرولیتر در ۵۹۴۰ میکرولیتر RPMI رقیق شد تا به غلظت ۲۰۰ میکرومولار برسد و سپس رقت‌های موردنظر را با استفاده از محیط کشت تهیه کردیم. این روش یک تست متابولیک رقابتی و ارزیابی عملکرد میتوکندریایی است.

MTT نمک زرد رنگ که یک تترازول است در میتوکندری سلول‌های زنده به فورمازان ارغوانی کاهش یافته که نامحلول است. واکنش کاهش زمانی رخ می‌دهد که آنزیم‌های ردوکتاز میتوکندریایی فعال باشد. لذا این تغییر می‌تواند به‌طور مستقیم در ارتباط با تعداد سلول‌های زنده باشد.^{۱۶} مراحل آزمایش به شرح زیر است.

به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۹۰ میکرولیتر محیط کشت که حاوی ۱۰^۴ عدد سلول از هر رده سلولی بود؛ اضافه کردیم. برای هر غلظت ۳ چاهک در نظر گرفته شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی سلول‌های کاشته شده برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند تا سلول‌ها به مرحله رشد لگاریتمی خود رسیدند. طی زمان انکوباسیون، از چگونگی رشد سلول‌ها و عدم آلودگی آنها اطمینان حاصل شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، ترکیبات مورد مطالعه (ال آرژنین در غلظت‌های تعریف شده با فاصله زمانی ۲۴ ساعت پیش از داروی آمیکاسین) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از افزودن غلظت‌های موردنظر پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای را برای مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور قرار دادیم تا سلول‌ها به مدت کافی در تماس با مواد مورد آزمایش قرار گرفتند. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای را از انکوباتور

خارج کرده و محیط کشت و سایر مواد افزوده شده را با کمک پیت از چاهک‌ها خارج نمودیم و سلول‌ها را سه مرتبه و هر بار با ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین شستشو دادیم. به هر چاهک ۲۰ μL محلول MTT اضافه نموده و پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای را به مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار دادیم. پس از طی شدن زمان لازم، محلول MTT درون چاهک‌ها را خارج کردیم و ۱۰۰ μL محلول DMSO به هر چاهک افزوده (برای حل نمودن فورمازان نامحلول) و به مدت ۱۵ دقیقه آنرا میکس کرده تا فورمازان کاملاً حل گردید.

پس از ۱۵ دقیقه، جذب کلنی‌های سلولی رنگ گرفت. در هر چاهک را با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت درصد زنده ماندن سلول با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

میانگین جذب نوری (OD) سلول‌های تحت درمان تقسیم بر میانگین OD کنترل ضرب در عدد ۱۰۰ گروه‌بندی به شرح زیر بود.

گروه اول: دوستاکسل در غلظت ۴/۴۶ میکرومولار (اِپتیمم)
گروه دوم: کورکومین در غلظت ۲ میکرومولار به همراه دوستاکسل در غلظت ۴/۴۶ میکرومولار (اِپتیمم)
گروه سوم: کورکومین در غلظت ۱۰ میکرومولار به همراه دوستاکسل در غلظت ۴/۴۶ میکرومولار (اِپتیمم)
گروه چهارم: کورکومین در غلظت ۱۰ میکرومولار به تنهایی

اندازه‌گیری میزان Cell Apoptosis: برای بررسی آپوپتوز از کیت فلو‌سایتومتری Annexin در سطح سلولی و تحت تاثیر شرایط تماس با داروها استفاده شد. آنالیز فلو‌سایتومتری با رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI سلول‌های DU145 (پروستات) انجام شد. میزان کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه برابر با ۵×۱۰^۵ سلول در هر چاهک بود. در روش Annexin سلول‌ها پس از جمع‌آوری پس از مرحله انکوباسیون ۴۸ ساعته با معرف Annexin نشان‌دار شده و با دستگاه فلو‌سایتومتری براساس مهاجرت سلول‌ها و جذب لیزر نوری شمارش سلول‌های آپپتوتیک به وسیله دستگاه انجام و نسبت آپوپتوز و نکروز تعیین گردید.^{۱۸}

روش آماری مورد استفاده: همه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism Ver.3 و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey- Kramer multiple comprehension test) صورت گرفت و سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر کورکومین در بقاء سلولی ناشی از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات) به روش MTT: گروه تیمار شده با دوستاکسل در غلظت ۴/۴۶ میکرومولار (IC₅₀) به میزان ۵۰ درصد نسبت به گروه

همراه دوستاکسل (شکل ۲-D) معنی دار بودند. همچنین گروه دوستاکسل ۱۸/۷ درصد سلول‌های زنده را نشان داد. اثر ضدتوموری مشاهده شده در سلول‌های DU145 در درمان به همراه کورکومین بیشتر از دوستاکسل به تنهایی بود.

بحث

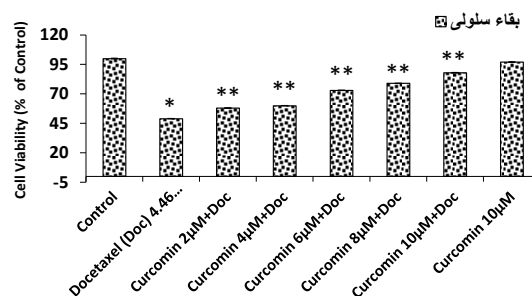
در مطالعه حاضر، دوستاکسل میزان حیات سلول‌های DU145 (پروستات) را نزدیک به ۵۰ درصد کاهش داد. همچنین گروه‌های دریافت کننده کورکومین به همراه دوستاکسل به صورت وابسته به دوز از میزان سمیت سلولی کاست و سبب افزایش میزان حیات سلول‌های DU145 (پروستات) گردید. همچنین کورکومین توانست القاء آپوپتوز در سلول‌های DU145 (پروستات) را افزایش دهد. این نتایج با برخی مطالعات^{۱۹-۲۱} همسو بود.

در مطالعه Giordano و Tommonaro کورکومین فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها، فاکتورهای رونویسی، کیناز، سیتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های پروآپوپتوز (توسط تنظیم مثبت) و ضدآپوپتوز (با تنظیم پایین) را تعدیل نمود. این ترکیب پلی فنل، به تنهایی یا همراه با سایر عوامل می‌تواند دارویی موثر برای درمان سرطان باشد.^{۲۲}

در مطالعه افشارزاده و همکاران مشخص شد که کورکومین به عنوان یک ترکیب غذایی طبیعی می‌تواند فعالیت ضدتوموری PTX را در برابر سرطان‌های مختلف افزایش دهد. علاوه بر این، تجویز کورکومین به دلیل فعالیت‌های دارویی عالی، اثرات نامطلوب PTX را کاهش می‌دهد. این موضوعات با تاکید بر مسیرهای مولکولی مورد بحث قرار می‌گیرند تا جبهتی برای مطالعات بیشتر در آشکارسازی سایر شبکه‌های سیگنالینگ ارائه دهند.^{۱۹}

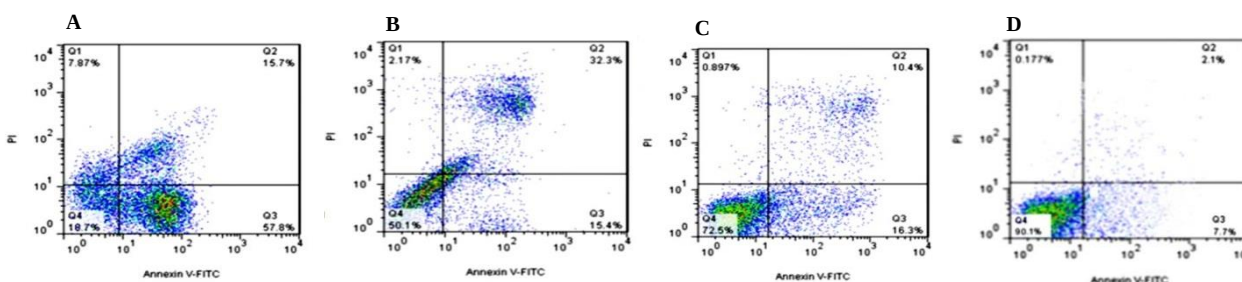
در مطالعه Zeng و همکاران کورکومین باعث آپوپتوز و توقف چرخه سلولی CAF (Cancer-associated fibroblast) گردید که عمدتاً توسط مسیر استرس شبکه آندوپلاسمی با واسطه ROS ایجاد می‌شود. افزایش تنظیم ROS ناشی از کورکومین باعث ایجاد استرس شبکه آندوپلاسمی CAFها از طریق محور PERK-eIF2 α -ATF4 می‌شود. کورکومین به طور انتخابی با القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز G2-M، CAFهای پروستات را مهار نمود که

کنترل باعث کاهش حیات سلولی شد ($P < 0.001$). در گروه‌های دریافت کننده دوستاکسل به علاوه کورکومین (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومولار) نسبت به گروه دوستاکسل به تنهایی تفاوت آماری معنی داری داشت ($P < 0.001$) و باعث افزایش حیات سلولی گردید (نمودار یک). همچنین بیشترین میزان حیات سلولی مربوط به گروه کنترل و کمترین میزان حیات سلولی مربوط به گروه دوستاکسل به تنهایی بود.



نمودار ۱: اثر کورکومین در بقاء سلولی ناشی از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات) به روش MTT
* اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل ($P < 0.001$)
** اختلاف آماری معنی دار با گروه دوستاکسل در غلظت IC50 ($P < 0.001$)

اثر کورکومین در القای آپوپتوز از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات): نتایج آنالیز فلوسایتومتری در شکل ۲ آمده است. سلول‌ها در چهار بخش (Q1-Q4) توزیع شدند. سلول‌های Q1 به عنوان سلول‌های نکروز شده (+) PI تعریف شدند. سلول‌های Q2 به آپوپتوز دیررس (+) PI و (+) Annexin دلالت دارند. سلول‌های بخش Q3 نشان‌دهنده آپوپتوز اولیه (+) Annexin V هستند. در نهایت، سلول‌های زنده در Q4 هستند که (-) PI یا (-) Annexin V هستند. ارزیابی گروه‌های دارو در غلظت اپتیم به تنهایی، ماده محافظتی در کمترین و بیشترین غلظت به همراه دارو در غلظت اپتیم و ماده محافظتی در بیشترین غلظت به تنهایی انجام شد و میزان تغییرات سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک در درمان با کورکومین در بیشترین غلظت (شکل ۲-C) و کورکومین در بیشترین غلظت به



شکل ۲: کورکومین در القای آپوپتوز از دوستاکسل در رده سلولی DU145 (پروستات)
A) گروه دوستاکسل به تنهایی (۴/۶۴ میکرومولار)، B) گروه دوستاکسل به همراه کورکومین (۲ میکرومولار)، C) گروه دوستاکسل به همراه کورکومین (۱۰ میکرومولار)، D) گروه کورکومین (۱۰ میکرومولار)

متابولیت‌هایش شده که در نتیجه سطح پایینی از کورکومین آزاد در پلاسما ($<2.5 \text{ ng/ml}$) مشاهده شده است.^{۲۵}

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که دوستاکسل سبب کاهش میزان حیات سلولی می‌گردد که در گروه‌های دریافت‌کننده کورکومین سبب افزایش میزان حیات سلولی گردید. همچنین کورکومین توانست میزان آپوپتوز را در سلول‌های DU145 (پروستات) افزایش دهد. لذا می‌توان از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای بهبود عملکرد و کاهش اثرات جانبی پروسه شیمی‌درمانی استفاده نمود.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.RIB.REC.1403.006) قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مهسا حسینی برای اخذ درجه دکتری حرفه‌ای در رشته داروسازی از پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. این مطالعه مورد حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران قرار گرفت.

مشارکت نویسندگان

دکتر محمد شکرزاده: مدیریت و طراحی پروژه و تایید نسخه نهایی مقاله.

دکتر الهه قره‌خانی: آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله.

محبوبه رحمتی: جمع‌آوری داده‌ها

مهسا حسینی: انجام پروژه.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از مسئولان پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و هیئت داوران پایان‌نامه که ما را در انجام و ارتقای کیفی این مطالعه یاری دادند؛ اعلام می‌کنند.

References

1. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci.* 2006 Mar;78(18):2081-87. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>.
2. Anand P, Sundaram C, Zhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett.* 2008 Aug;267(1):133-64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.025>.
3. Naik SR, Thakare VN, Patil SR. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Exp*

نشان‌دهنده کاربرد جدید کورکومین در درمان تومور است.^{۲۰} در مطالعه Bolger و همکاران با استفاده از NF-kB به عنوان یک هدف سلولی برای کورکومین، رابطه بین قدرت کورکومین به عنوان یک مهارکننده NF-kB در کشت سلولی، فارماکوکینتیک کورکومین و اثرات ضدسرطانی و ضدالتهابی کورکومین در پیش‌بالینی بررسی شد. مدل‌های سرطان و التهاب نشان می‌دهد که هم کورکومین و هم متابولیت فاز II محلول‌تر کورکومین گلوکونید ممکن است نقش کلیدی در اثرات درمانی کورکومین در داخل بدن با واسطه در NF-kB ایفا کنند.^{۲۳} به احتمال زیاد در مطالعه ما نیز کورکومین از همین مسیر سبب بهبود اثرات ناشی از دوستاکسل شده است.

در مطالعه Xie و همکاران فعالیت ضدسرطانی کورکومین و مشتقات آن عمدتاً به تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال مربوط دانسته شد. با این حال، به دلیل دسترسی خوراکی کم کورکومین، متابولیسم سریع و سایر خواص فارماکوکینتیک، کاربرد کورکومین را در درمان سرطان محدود می‌کند.^{۲۴} همان‌گونه که در مطالعه نیز کورکومین توانست سبب القای مسیر آپوپتوز شود.

در مطالعه Bisht و همکاران ترکیبات رژیم کورکومین، رزوراتول و فلاونوئید به عنوان ضدالتهاب و محافظ هسته و DNA بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که پلی‌فنول‌ها جلوی استرس اکسایشی منجر به جهش و سرطان را به راه‌انداختن آبشاری از واکنش‌های سلول و خصوصاً DNA می‌گیرند.^{۱۶} همچنین در مطالعه دیگری مشخص شد درمان ترکیبی کورکومین و دوستاکسل از تکثیر و آپوپتوز به‌طور قابل توجهی بالاتر از گروه تحت درمان با کورکومین و دوستاکسل به تنهایی جلوگیری کرده است. جالب توجه است که درمان ترکیبی با کورکومین و دوستاکسل بیان COX-2، p53، NF-kappa B، phospho-AKT، PI3K، RTKs را تعدیل می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که کورکومین می‌تواند یک مدعی درمانی بالقوه در افزایش اثربخشی دوستاکسل در درمان PCa باشد.^{۲۱} در مطالعه‌ای علی‌رغم اثرات مفید کورکومین در بسیاری از بدخیمی‌ها مصرف بالینی آن به دلیل فراهمی زیستی پایین آن و حالیت پایین آن محدود است. در بررسی بالینی گزارش شده که مصرف خوراکی کورکومین 8gm/day با تبدیل سریع آن به

Toxicol Pathol. 2011 Jul;63(5):419-31. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.03.001>.

4. Singh R, Sharma P. Hepatoprotective Effect of Curcumin on Lindane-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats. *Toxicol Int.* 2011 Jul;18(2):124-29. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.84264>.

5. Rahimi HR, Nedaieinia R, Sepehri Shamloo A, Nikdoust S, Kazemi Oskuee R. Novel delivery system for natural products: Nano-curcumin formulations. *Avicenna J Phytomed.* 2016 Jul-Aug;6(4):383-98.

6. Fang XB, Zhang JM, Xie X, Liu D, He CW, Wan JB, et al. pH-sensitive micelles based on acid-labile pluronic F68-curcumin conjugates for improved tumor intracellular drug delivery. *Int J Pharm*. 2016 Apr;502(1-2):28-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.029>.
7. Chen XJ, Pang D, Li LP, Chen YQ, Tan XR. A hypothesis on the relationship between tea drinking and sexual activity. *World J Hypertens*. 2013;3(4):32-36. <http://dx.doi.org/10.5494/wjh.v3.i4.32>.
8. Piskula MK, Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*. 1998 Jul;128(7):1172-78. <https://doi.org/10.1093/jn/128.7.1172>.
9. Lopes Lda S, Marques RB, Fernandes HB, Pereira Sda S, Ayres MC, Chaves MH, et al. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. *J Biomed Sci*. 2012 Jul;19(1):68. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-68>.
10. Spencer JP. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr*. 2009 Dec;4(4):243-50. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0136-3>.
11. Soltani N, Ghafouri H. Investigation of the apoptosis induction potential of synthetic sorafenib-derived compounds in breast cancer cells. *JCT*. 2023;13(4):298-310. <https://doi.org/10.52547/JCT.13.3.298>.
12. Sekino Y, Teishima J. Molecular mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resist*. 2020 Aug;3(4):676-85. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.37>.
13. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jul;17(7):395-417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
14. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res*. 2020 Feb 26;9:F1000 Faculty Rev-148. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>.
15. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
16. Bisht K, Wagner KH, Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*. 2010 Nov;278(1):88-100. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.008>.
17. Kuhestani S, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh S. [Protective Effects of Simvastatin on Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Gingival Fibroblasts Cells Exposed to Venlafaxine]. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2022;31(205):81-88. [Article in Persian]
18. Banaee F, Poureini F, Mohammadi M, Najafpour GD, Moghadamnia AA. Encapsulation of curcumin in gliadin-pectin in a core-shell nanostructure for efficient delivery of curcumin to cancer cells in vitro. *Colloid Polym Sci*. 2022;300(9):1063-73.
19. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hashemi F, Moghadam ER, Hashemi F, Entezari M, et al. Curcumin in cancer therapy: A novel adjunct for combination chemotherapy with paclitaxel and alleviation of its adverse effects. *Life Sci*. 2020 Sep;256:117984. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117984>.
20. Zeng Y, Du Q, Zhang Z, Ma J, Han L, Wang Y, et al. Curcumin promotes cancer-associated fibroblasts apoptosis via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Nov;694:108613. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108613>.
21. Banerjee S, Singh SK, Chowdhury I, Lillard JW Jr, Singh R. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2017 Mar;9(2):235-45. <https://doi.org/10.2741/e798>.
22. Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and Cancer. *Nutrients*. 2019 Oct;11(10):2376. <https://doi.org/10.3390/nu11102376>.
23. Bolger GT, Pucaj K, Minta YO, Sordillo P. Relationship between the in vitro efficacy, pharmacokinetics and in vivo efficacy of curcumin. *Biochem Pharmacol*. 2022 Nov;205:115251. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115251>.
24. Xie L, Ji X, Zhang Q, Wei Y. Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. *Biomed Pharmacother*. 2022 Feb;146:112567. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112567>.
25. Bounaama A, Djerdjouri B, Laroche-Clary A, Le Morvan V, Robert J. Short curcumin treatment modulates oxidative stress, arginase activity, aberrant crypt foci, and TGF- β 1 and HES-1 transcripts in 1,2-dimethylhydrazine-colon carcinogenesis in mice. *Toxicology*. 2012 Dec;302(2-3):308-17. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.014>.