

Effects of Royal Jelly on Apoptosis and the Expression of Apoptotic Genes on Testicular Tissue in Male Balb/C Mice Treated with Daunorubicin

Mansour Safaei Pourzamani¹,
Shahrbanoo Oryan²,
Cyrus Jalili³,
Parichehr Yaghmaei⁴,
Ali Ghanbari⁵

¹ PhD student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Professor, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received November 20, 2022 ; Accepted March 13, 2023)

Abstract

Background and purpose: Daunorubicin is an effective drug in chemotherapy, but its clinical use is limited due to serious side effects. Royal jelly as a natural compound obtained from bees can be helpful in preventing the damage caused by daunorubicin. The present study aimed to evaluate the effects of royal jelly on the number of apoptotic cells and the expression of genes involved in apoptosis in mice treated with daunorubicin.

Materials and methods: In this experimental study, 77 Balb/c mice were randomly divided into seven groups (n= 11 per group): sham, control, royal jelly (50 and 100 mg/kg), daunorubicin (2 mg/kg), and royal jelly (50 and 100 mg/kg) + daunorubicin. The mice received saline (0.09%), IP daunorubicin, and royal jelly orally for eight weeks. To estimate the number of apoptotic cells and the expression of genes related to apoptosis in testis, we used ELISA test and Real-time PCR assay, respectively. Data analysis was done applying One-way Analysis of Variance and Tukey's test in SPSS.

Results: Daunorubicin caused significant increase in the number of apoptotic cells, and expression levels of *p53*, *Bax*, *caspase 3*, *caspase 8*, and *caspase 9* ($P<0.01$) and a significant decrease in the *bcl-2* gene expression ($P<0.01$). In treatment groups, these changes were moderated by royal jelly.

Conclusion: Royal jelly administration, by reducing the number of apoptotic cells and affecting the expression of genes involved in apoptosis, improves the damage caused by daunorubicin on the testicular tissue of mice.

Keywords: apoptosis, testicular tissue, toxicity, daunorubicin, royal jelly

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (220): 19-30 (Persian).

Corresponding Author: Ali Ghanbari - School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
(E-mail: aghanbari@kuma.ac.ir)

اثرات ژل رویال بر درصد سلول‌های آپوپتوزی و بیان ژن‌های آپوپتوزی بافت بیضه در موش‌های نر نژاد Balb/c تیمار شده با داروی دانوروبیسین

منصور صفایی پور زمانی¹

شهر بانو عریان²

سیروس جلیلی³

پریچهر یغمایی⁴

علی قنبری⁵

چکیده

سابقه و هدف: دانوروبیسین یک داروی مؤثر در شیمی‌درمانی است، اما استفاده بالینی از آن به دلیل عوارض جانبی جدی، دارای محدودیت است. به نظر می‌رسد که ژل رویال؛ یکی از ترکیبات طبیعی حاصل از زنبور عسل، می‌تواند در جلوگیری از آسیب‌های ناشی از دانوروبیسین مفید باشد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات ژل رویال بر درصد سلول‌های آپوپتوزی و نیز میزان بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در موش‌های تیمار شده با دانوروبیسین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی 77 سر موش نر نژاد Balb/c به طور تصادفی به 7 گروه (11 موش در هر گروه) شامل شام، کنترل، ژل رویال (50 و 100 میلی‌گرم/کیلوگرم)، دانوروبیسین (2 میلی‌گرم/کیلوگرم)، ژل رویال (50 و 100 میلی‌گرم/کیلوگرم) + دانوروبیسین تقسیم شدند. موش‌ها به مدت 8 هفته سالی (0/09 درصد) و دانوروبیسین را به صورت داخل صفاقی و ژل رویال را به شکل خوراکی دریافت نمودند. جهت تعیین درصد سلول‌های آپوپتوزی و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در بیضه به ترتیب از روش الیزا و تکنیک Real-time PCR استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها: دانوروبیسین سبب افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های آپوپتوز و بیان ژن‌های p53، Bax، caspase 3، caspase 8 و caspase 9 ($P < 0/01$) و کاهش معنی‌دار بیان ژن bcl-2 ($P < 0/01$) شد، در حالی که در گروه درمان این تغییرات با تجویز ژل رویال تعدیل شد.

استنتاج: تجویز ژل رویال با کاهش درصد سلول‌های آپوپتوزی و اثر بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز، سبب بهبود آسیب‌های ناشی از دانوروبیسین روی بافت بیضه موش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، بافت بیضه، سمیت، دانوروبیسین، ژل رویال

مقدمه

دیده از طریق فعال شدن آپوپتوز است. دانوروبیسین؛ یک آنتی‌بیوتیک ضدسرطان از گروه آنتراسایکلین است که جهت درمان میلوما، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی است که توسط طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی ایجاد می‌شود. یکی از اقدامات داروهای شیمی‌درمانی حذف سلول‌های آسیب

E-mail: aghanbari@kuma.ac.ir

مؤلف مسئول: علی قنبری - کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی دکتر، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

2. استاد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

3. استاد، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

4. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

5. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: 1401/8/29 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/10/1 تاریخ تصویب: 1402/12/22

و لوسمی‌های میلوئیدی استفاده می‌شود که به واسطه القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، رشد تومورها را متوقف می‌کند (1). با وجود اثرات ضدسرطانی دانوروبیسین، استفاده بالینی از این دارو به دلیل عوارض جانبی جدی آن، از جمله اختلال در گلبول‌سازی، آسیب به بافت قلب و بروز زخم‌های دهانی محدود شده است (2). افزون بر این، پس از مدتی استفاده از دارو، بدن نسبت به همه داروهای ضدسرطان دچار مقاومت دارویی می‌شود (3). بروز اثرات جانبی و ایجاد مقاومت دارویی از چالش‌های اصلی در مورد استفاده از داروهای ضد سرطان مانند دانوروبیسین در شیمی‌درمانی بیماران سرطانی هستند. یکی از راه کارهای حل این مشکلات داروهای ضد سرطان، استفاده از داروهای کمکی است تا بتوان با کم‌ترین دوز و مدت درمان، بیشترین اثرات سودمند این داروها را به دست آورد.

دانوروبیسین با ایجاد تغییرات در پتانسیل غشای میتوکندری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، سبب القای مرگ آپوپتوتیک و نکروتیک سلول‌های لوسمی حاد می‌شود که باعث نفوذپذیری غشای میتوکندری و القای آپوپتوز متعاقب آن می‌شود (4). اثر دانوروبیسین به دلیل مسدود کردن چرخه سلولی در فاز G2 و نیز القای مرگ سلولی است (5). علاوه بر این، دانوروبیسین باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی مانند انقباض سلولی و تراکم هسته‌ای (از ویژگی‌های معمول آپوپتوز هستند)، می‌شود (6).

آپوپتوز اغلب به عنوان فرآیند خودکشی سلولی شناخته می‌شود، زیرا پروتئین‌های خود سلول در نابودی آن شرکت می‌کنند. داروهای شیمی‌درمانی باعث آسیب می‌شوند و این تعادل بین سیگنال‌های طرفدار و ضد آپوپتوز است که در نهایت سرنوشت سلول را تعیین می‌کند. مکانیسم‌های شروع آپوپتوز که شامل سیگنال‌های درونی و بیرونی هستند، پیچیده بوده و تداخل قابل توجهی بین آن‌ها وجود دارد. مسیر ذاتی آپوپتوز که به عنوان مسیر میتوکندری آپوپتوز نیز شناخته می‌شود،

به دنبال آسیب DNA و فعال شدن *p53* آغاز می‌شود. این امر باعث ایجاد آبخاری از رویدادهایی می‌شود که منجر به نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری شده و در نهایت باعث از دست رفتن پتانسیل غشای میتوکندری، توقف سنتز ATP میتوکندری و فعالیت‌های انتقال وابسته به پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود. جهت ایجاد این فرایندهای داخل سلولی، بیان ژن‌های *caspase* و ژن‌های خانواده *bcl-2* دخیل هستند (7). امروزه ترکیبات طبیعی با خواص منحصر به فرد خود مانند عوارض جانبی کم و در دسترس بودن و قیمت نسبتاً پایین، توجه محققان و درمانگران را برای تسکین عوارض جانبی داروهایی مانند دانوروبیسین جلب کرده است (8-11).

ژل رویال که به عنوان یک محصول پزشکی تجاری استفاده می‌شود، در واقع یکی از فرآورده‌های زنبور عسل است که حاوی انواع مواد مغذی از جمله پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها (C و B) و مواد معدنی (آهن، کلسیم، مس، پتاسیم، منیزیم، روی و گوگرد) است (12). این ترکیب طبیعی، دارای اثرات فیزیولوژیکی و دارویی بسیاری از جمله خواص ضد التهابی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی، کاهش فشارخون، کاهش قند خون، کاهش کلسترول خون، ضد عفونی‌کننده و ضد باکتریایی است (13، 14). علاوه بر این اثرات ضد ضد آپوپتوزی ژل رویال در مقابل آسیب ناشی از نیکوتین، استرپتوزوتوسین، کادمیوم و آسیب گرمایی در بافت بیضه مدل‌های حیوانی گزارش شده است (15-18).

جامعه امروزی درگیر بیماری‌های پیچیده و خطرناکی همچون انواع سرطان‌ها شده است، به طوری که دومین علت مرگ و میر در جهان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به‌شمار می‌آید. درمان این بیماری‌ها عموماً کاری دشوار بوده و صدمات اقتصادی و اجتماعی زیادی به سیستم سلامت وارد می‌کند. امروزه به دلیل عوارض جانبی مرتبط با استفاده از داروهای شیمی‌درمانی، نیاز به تعیین استراتژی‌های جدید در درمان و بهبود سرطان‌های مختلف به شدت احساس می‌شود. در این راستا، ترکیبات

آزمایشات حیوانی براساس دستورالعمل هلسینکی و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد.

گروه‌های مورد مطالعه و طراحی تجربی مطالعه: 77

سر موش نر نژاد Balb/c به صورت تصادفی به هفت گروه مساوی (هر گروه 11 سر) تقسیم شدند. گروه‌ها براساس شرح پیرو به مدت 8 هفته تیمار شدند: گروه 1 (شم):

موش‌هایی که هیچگونه دارویی دریافت نکردند، گروه 2 (کنترل): موش‌هایی که نرمال سالین را به صورت

داخل وریدی دریافت نمودند، گروه 3 (ژل رویال 50

میلی گرم/کیلوگرم): موش‌هایی که ژل رویال با دوز 50

میلی گرم/کیلوگرم را به صورت خوراکی دریافت نمودند،

گروه 4 (ژل رویال 100 میلی گرم/کیلوگرم): موش‌هایی

که ژل رویال با دوز 100 میلی گرم/کیلوگرم را به صورت

خوراکی دریافت نمودند، گروه 5 (دانورویسین):

موش‌هایی که دانورویسین با دوز 2 میلی گرم/کیلوگرم

را به صورت داخل وریدی دریافت نمودند، گروه 6 (ژل

رویال 50 میلی گرم/کیلوگرم + دانورویسین): موش‌هایی

که به طور همزمان ژل رویال با دوز 50 میلی گرم/

کیلوگرم را به صورت خوراکی و نیز دانورویسین با دوز

2 میلی گرم/کیلوگرم را به صورت داخل وریدی دریافت

نمودند، گروه 7 (ژل رویال 100 میلی گرم/کیلوگرم +

دانورویسین): موش‌هایی که به طور همزمان ژل رویال با

دوز 100 میلی گرم/کیلوگرم را به صورت خوراکی و نیز

دانورویسین با دوز 2 میلی گرم/کیلوگرم را به صورت

داخل وریدی دریافت نمودند. دوزهای مورد استفاده

برای ژل رویال و دانورویسین بر اساس مطالعه قبلی از

همین نویسندگان تعیین شد (10). نرمال سالین، ژل رویال

و دانورویسین از شرکت سیگما (Sigma) خریداری

شدند. خرید تمام مواد مورد استفاده در آزمایش توسط

محققین صورت گرفت. 24 ساعت بعد از آخرین

تزریق، حیوانات بوسیله اتر بی‌هوش شدند و سپس بافت

بیضه برداشته شد و با Ice saline cold شستشو داده شد

و سپس هوموژنیزه شدند و سوپرناتانت جدا شد.

طبیعی به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کاهش عوارض داروهای ضدسرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و به عنوان داروی کمکی برای داروهای ضد سرطان، در مطالعات و کارآزمایی‌های بالینی مورد استفاده گسترده قرار گرفته‌اند. براساس نتایج مطالعات گذشته، به نظر می‌رسد که ژل رویال به عنوان یک ترکیب طبیعی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی می‌تواند در کاهش عوارض جانبی ناشی از دانورویسین سودمند باشند. نظر به این که یکی از عوارض جانبی دانورویسین؛ از داروهای شیمی‌درمانی سرطان‌های مختلف، تأثیر مخرب بر سیستم تناسلی مردانه و کاهش باروری است (10) و از آنجا که هیچ گزارشی در مورد اثر ژل رویال بر میزان آپوپتوز و بیان ژن‌های آپوپتوزی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی تیمار شده با دانورویسین یافت نشد، بنابراین در مطالعه حاضر اثرات ژل رویال بر درصد سلول‌های آپوپتوزی و بیان ژن‌های آپوپتوزی در موش‌های نر نژاد Balb/c تیمار شده با داروی دانورویسین مورد مطالعه قرار گرفت.

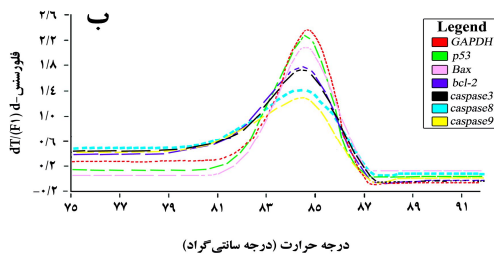
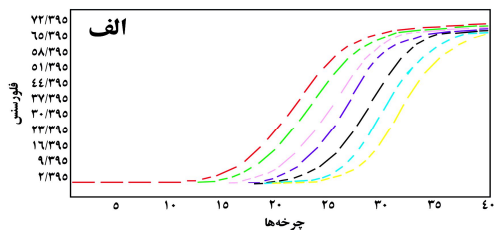
مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های نر نژاد Balb/c بالغ (دو ماهه) و وزن 28 ± 2 گرم که از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند، استفاده شد. موش‌ها به خانه حیوانات دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران انتقال یافته و به منظور تطابق حیوانات با محیط، قبل از شروع مطالعه موش‌ها به مدت یک هفته بدون دریافت هیچگونه مداخله نگهداری شدند. در طول مدت انجام آزمایش، موش‌ها در شرایط چرخه نور/تاریکی 12 ساعته، دمای کنترل شده 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 25-30 درصد، با دسترسی آزاد به رژیم غذایی استاندارد (شرکت بهپور، ایران) و آب قرار گرفتند. پروتکل تحقیق مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و دانشگاه آزاد اسلامی (IR.KUMS.REC.1398.695) قرار گرفت. تمامی

در بانک اطلاعات مرکز ملی اطلاعات بافت بیضه هوموژنیزه با استفاده از کیت ELISA (Cat.No.11544675001; Roche) کارخانه سازنده کیت اندازه گیری شد. در این روش آنتی‌بادی‌های آنتی‌هیستون بر روی دیواره میکروپلیت‌ها تثبیت شد. محلول مسدودکننده برای اشباع محل‌های اتصال غیر اختصاصی روی دیواره‌ها به کار گرفته شد. سپس، اتصال نوکلئوزومی از طریق اجزای هیستونی آن‌ها به آنتی‌بادی ضد هیستون بی حرکت انجام شد. آنتی-DNA-پراکسیداز (POD) با بخش DNA نوکلئوزوم واکنش داد. در طول شستشو، پراکسیداز متصل نشده از نمونه خارج شد. در نهایت، از 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) جهت تجزیه و تحلیل سطوح پراکسیداز استفاده شد و توسط یک لایزایریدر در طول موج‌های 405 نانومتر اندازه‌گیری صورت گرفت. در نهایت نتایج به صورت درصد آپوپتوز بیان شد که از نسبت جذب نمونه تیمار شده (آپوپتوز) به نمونه تیمار نشده (شاهد) محاسبه شد (19).

جدول شماره 1: اطلاعات پرایمرها برای Real-time PCR جهت مطالعه اثر دانوروبیسین و ژل رویال بر بیان ژن آپوپتوز در بافت بیضه موش‌های نر نژاد Balb/c

ژن	توالی پرایمر	دمای Annealing (°C)	اندازه (بافت)
<i>GAPDH</i>	F: ACCTCAACTACATGGTCTAC R: TTGTCATTGAGAGCAATGCC	58	172
<i>p53</i>	F: CATCATCAGCTGGAAGACTC R: TCAGCTCTCGGAACATCTC	58	178
<i>Bax</i>	F: GCTGATGGCAACTTCAACTG R: GATCAGCTCGGGCACTTAG	56	156
<i>bcl-2</i>	F: AGCGTCAACAGGGAGATGTC R: TTCCACAAAGGCATCCCAGC	58	149
<i>caspase 3</i>	F: TGTCATCTCGCTCTGGTACG R: CCCTTCTGCTGCTTCTG	58	137
<i>caspase 8</i>	F: ACAATGCCAGATTCTCCCTAC R: CAGACAGTATCCCCGAGGTTTG	59	147
<i>caspase 9</i>	F: CATCTTGTGTCTACTCCACC R: CAGCTTTTCCGAGGAAGT	59	142

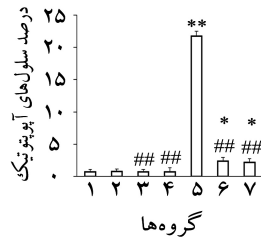


نمودار شماره 1: نمودارهای تکثیر و ذوب Real-time PCR، الف: نمودار تکثیر، ب- نمودار ذوب

از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta C_T}$ برای تجزیه و تحلیل تفاوت‌های فولدها استفاده شد. مقادیر کمی چرخه آستانه (CT) به دست آمد. مقادیر CT حاصل از نمونه‌ها

بررسی میزان آپوپتوزیس: میزان آپوپتوز در نمونه بافت بیضه هوموژنیزه با استفاده از کیت ELISA (Cat.No.11544675001; Roche) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده کیت اندازه‌گیری شد. در این روش آنتی‌بادی‌های آنتی‌هیستون بر روی دیواره میکروپلیت‌ها تثبیت شد. محلول مسدودکننده برای اشباع محل‌های اتصال غیر اختصاصی روی دیواره‌ها به کار گرفته شد. سپس، اتصال نوکلئوزومی از طریق اجزای هیستونی آن‌ها به آنتی‌بادی ضد هیستون بی حرکت انجام شد. آنتی-DNA-پراکسیداز (POD) با بخش DNA نوکلئوزوم واکنش داد. در طول شستشو، پراکسیداز متصل نشده از نمونه خارج شد. در نهایت، از 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) جهت تجزیه و تحلیل سطوح پراکسیداز استفاده شد و توسط یک لایزایریدر در طول موج‌های 405 نانومتر اندازه‌گیری صورت گرفت. در نهایت نتایج به صورت درصد آپوپتوز بیان شد که از نسبت جذب نمونه تیمار شده (آپوپتوز) به نمونه تیمار نشده (شاهد) محاسبه شد (19).

تکنیک PCR کمی (Real-time PCR, QPCR): توسط این تکنیک بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز، با پرایمرهای خاص آنها تأیید می‌شود. این تکنیک شامل سه مرحله استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش QRT-PCR می‌باشد. به‌طور خلاصه، RNA کل با استفاده از کیت RNAeasy Plus Mini Kit استخراج شد. با استفاده از پرایمر پلی T-tail موجود در کیت یک مرحله‌ای RT-PCR، RNA کل (≥ 1 میکروگرم) رونویسی معکوس شد. cDNA با استفاده از کیت رونویسی معکوس QuantiTect Reverse Transcription شرکت Qiagen، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده تکثیر شد. کپی‌های cDNA با جذب در 260 نانومتر شمارش شدند. مقدار کمی cDNA با QuantiFast® SYBER® Green یا PCR Master Mix از Qiagen و پرایمرها ترکیب شد و در سه تکرار با استفاده از RT-PCR بیدرننگ Rotor-Gene 6000 مورد سنجش قرار گرفت. پرایمرها



نمودار شماره 2: هیستوگرام اثرات تجویز ژل رویال و دانوروبیسین بر سلول‌های آپوپتوزیک در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. - مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین برای هر گروه (11 موش در هر گروه) ارائه شده است. - مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی انجام شد.

* و ** تفاوت معنی دار (به ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/01$) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم؛ ## تفاوت معنی دار ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه دانوروبیسین

گروه‌ها شامل: 1- شم، 2- کنترل، 3- ژل رویال 50 میلی گرم/کیلوگرم، 4- ژل رویال 100 میلی گرم/کیلوگرم، 5- دانوروبیسین، 6- ژل رویال 50 میلی گرم/کیلوگرم + دانوروبیسین، 7- ژل رویال 100 میلی گرم/کیلوگرم + دانوروبیسین

سنجش میزان بیان ژن‌های $p53$ و Bax نشان داد که در موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین به تنهایی، میزان بیان این دو ژن به طور قابل توجهی ($P < 0/01$) نسبت به گروه‌های شم و کنترل افزایش پیدا کرده بود. موش‌های دریافت کننده ترکیب دانوروبیسین و ژل رویال به طور معنی داری میزان بیان ژن‌های $p53$ و Bax بالاتری در مقایسه با گروه‌های شم و کنترل داشتند ($P < 0/05$). میزان بیان ژن‌های $p53$ و Bax در موش‌های دریافت کننده ژل رویال به تنهایی و نیز موش‌های دریافت کننده ترکیب دانوروبیسین و ژل رویال به طور معنی داری کم تر از موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین به تنهایی، بود ($P < 0/01$). از نظر آماری اختلاف معنی داری بین دو گروه دریافت کننده ترکیب دانوروبیسین و ژل رویال وجود نداشت ($P > 0/05$) (نمودار شماره 3 الف و ب). در موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین، نیز دریافت کننده ترکیب دانوروبیسین و ژل رویال با هر دو دوز، کاهش معنی داری در بیان ژن $bcl-2$ در مقایسه با موش‌های

بر روی منحنی استاندارد رسم شد و تعداد کپی‌ها با استفاده از GAPDH به عنوان کنترل داخلی محاسبه شد (20).

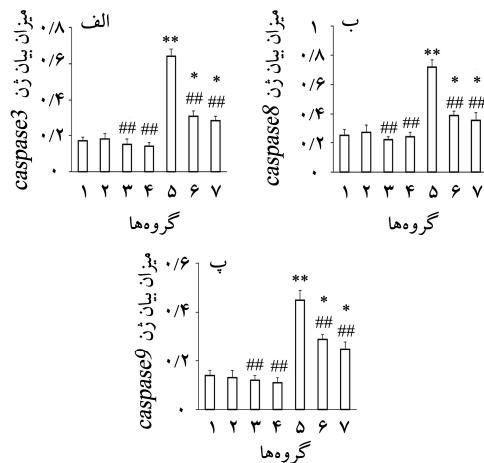
روش تجزیه و تحلیل: داده‌های حاصل از اندازه گیری پارامترهای مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه 16) تجزیه و تحلیل شدند و به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شدند. ANOVA یک طرفه و به دنبال آن تست تعقیبی توکی Tukey برای مقایسه چندگروهی داده‌های کمی استفاده شد. اختلافات در سطح $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه با استفاده از روش الیزا در نمودار شماره 2 نشان داده شده است. درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین به تنهایی، به طور معنی داری (حدود 21 برابر) بیش تر از موش‌های گروه‌های شم و کنترل بود ($P < 0/01$). تیمار موش‌ها با دانوروبیسین و ژل رویال به طور همزمان، سبب کاهش معنی دار درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه در مقایسه با موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین به تنهایی شد ($P < 0/01$) اما همچنان به طور معنی داری بالاتر از موش‌های گروه‌های شم و کنترل بود ($P < 0/05$). به عبارت دیگر، تجویز ژل رویال درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه موش‌ها را کاهش داده بود اما نتوانسته بود در مدت زمان مطالعه سطح آن را به مقادیر طبیعی بازگرداند. درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه در موش‌های دریافت کننده ژل رویال به تنهایی، به طور معنی داری کمتر از موش‌های دریافت کننده دانوروبیسین به تنهایی بود ($P < 0/01$). مقایسه بین گروهی موش‌های دریافت کننده ترکیب دانوروبیسین و ژل رویال نشان داد که اگرچه با افزایش دوز ژل رویال، درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه کاهش یافت اما این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$) (نمودار شماره 2).

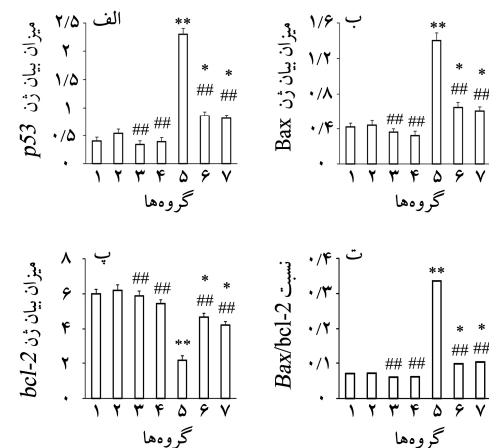
گروه‌های کنترل و شم؛ ## تفاوت معنی‌دار ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه دانورویسین
 گروه‌ها شامل: 1- شم، 2- کنترل، 3- ژل رویال 50 میلی‌گرم/ کیلوگرم، 4- ژل رویال 100 میلی‌گرم/کیلوگرم، 5- دانورویسین، 6- ژل رویال 50 میلی‌گرم/کیلوگرم + دانورویسین، 7- ژل رویال 100 میلی‌گرم/کیلوگرم + دانورویسین

نتایج ارزیابی بیان ژن‌های *caspase 3* و *caspase 8* و *caspase 9* در تمودار شماره 4 الف-ج نشان داده شده است. اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های *caspase 3* و *caspase 8* و *caspase 9* در بافت بیضه موش‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان بیان این سه ژن در گروه دریافت‌کننده دانورویسین به‌تنهایی، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شم و کنترل بود ($P < 0/01$). تیمار همزمان موش‌ها با ژل رویال و دانورویسین سبب کاهش معنی‌دار بیان این سه ژن در مقایسه با موش‌هایی که دانورویسین به‌تنهایی دریافت کرده بودند، شد ($P < 0/01$)، اما همچنان نسبت به موش‌های گروه‌های شم و کنترل بیان این ژن‌ها بیش‌تر بود ($P < 0/05$). مقایسه بین گروهی موش‌های دریافت‌کننده ترکیب دانورویسین و ژل رویال اختلاف آماری قابل توجهی را نشان نداد ($P > 0/05$).



نمودار شماره 4: هیستوگرام اثرات تجویز ژل رویال و دانورویسین بر میزان بیان ژن‌های *caspase 3*، *caspase 8* و *caspase 9* در گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

گروه‌های شم و کنترل مشاهده شد ($P < 0/01$). موش‌های دریافت‌کننده ژل رویال به‌تنهایی و نیز دریافت‌کننده همزمان ژل رویال و دانورویسین میزان بیان ژن *bcl-2* افزایش معنی‌داری نسبت به موش‌هایی که دانورویسین به‌تنهایی دریافت کرده بودند، نشان داد ($P < 0/01$). مقایسه بین گروهی موش‌های گروه‌های ژل رویال (50 و 100 میلی‌گرم/کیلوگرم) + دانورویسین تفاوت آماری قابل توجهی را در میزان بیان این ژن نشان نداد ($P > 0/05$) (نمودار شماره 3 ج). محاسبه نسبت *Bax/bcl-2* حاکی از افزایش قابل توجه این نسبت در گروه دریافت‌کننده دانورویسین به‌تنهایی و نیز دریافت‌کننده همزمان ژل رویال و دانورویسین در مقایسه با گروه‌های شم و کنترل بود ($P < 0/01$). نسبت *Bax/bcl-2* در گروه‌های دریافت‌کننده ژل رویال به‌تنهایی و نیز دریافت‌کننده همزمان ژل رویال و دانورویسین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دانورویسین به‌تنهایی، کاهش قابل توجهی ($P < 0/01$) داشت (نمودار شماره 3 د).



نمودار شماره 3: هیستوگرام اثرات تجویز ژل رویال و دانورویسین بر میزان بیان ژن‌های *p53*، *Bax*، *bcl-2* و نسبت *Bax/bcl-2* در گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

- مقادیر به‌صورت انحراف معیار \pm میانگین برای هر گروه (11 موش در هر گروه) ارائه شده است.

- مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی انجام شد.

* و ** تفاوت معنی‌دار (به‌ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/01$) در مقایسه با

- مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین برای هر گروه (11 موش در هر گروه) ارائه شده است.
 - مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی انجام شد.
 * و ** تفاوت معنی دار (به ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/01$) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم؛ ## تفاوت معنی دار ($P < 0/01$) در مقایسه با گروه دانورویسین
 گروه‌ها شامل: 1- شم، 2- کنترل، 3- ژل رویال 50 میلی‌گرم/کیلوگرم، 4- ژل رویال 100 میلی‌گرم/کیلوگرم، 5- دانورویسین، 6- ژل رویال 50 میلی‌گرم/کیلوگرم + دانورویسین، 7- ژل رویال 100 میلی‌گرم/کیلوگرم + دانورویسین

بحث

دانورویسین یکی از داروهای شیمی‌درمانی سرطان‌های مختلف است که بر اساس مطالعه قبلی ما، اثرات نامطلوبی بر سیستم تناسلی مردانه دارد (10). از سوی دیگر گزارش شده است که محصولات زنبور عسل اثرات مثبتی بر عملکرد تولیدمثلی پستانداران دارند (21). لذا در مطالعه حاضر اثرات دانورویسین بر میزان آپوپتوز و تغییرات بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در موش کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/c مورد بررسی قرار گرفت و اثرات احتمالی ژل رویال بر این متغیرها مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور کلی، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که داروی دانورویسین سبب القای آپوپتوز در بافت بیضه و نیز افزایش بیان ژن‌های *p53*، *Bax*، *caspase 3*، *caspase 8*، *caspase 9* و کاهش بیان ژن *bcl-2* شد. این درحالی است که تجویز ژل رویال سبب بهبود این پارامترها به‌دنبال تجویز دانورویسین شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه پس از دریافت دانورویسین بود. همسو با این نتایج، گزارش شده است که دانورویسین سبب افزایش آپوپتوز در رده‌های سلولی لوسمی شد (22). مطالعات دیگری نیز افزایش میزان آپوپتوز در بافت بیضه در گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین را گزارش نمودند (11، 23، 24). با توجه به مطالعه قبلی ما به‌نظر می‌رسد که تولید سطوح بالا از رادیکال‌های آزاد و

پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تجویز دانورویسین (10)، باعث ایجاد آسیب به پروتئین‌های داخل سلولی و DNA بیضه شده و درنهایت آپوپتوز در بافت بیضه رخ داده است. داده‌های این مطالعه همسو با نتایج یک مطالعه قبلی، نشان داد که دانورویسین سبب افزایش بیان ژن *p53* شد (22). این اثر دانورویسین به‌دلیل آسیب DNA و متعاقب آن بیان ژن *p53* رخ می‌دهد که به نوبه خود فعالیت توپوایزومراز II (آنزیم مسئول همانندسازی DNA) را مهار می‌کند. بیان ژن *p53* به‌طور مستقیم بر فعالیت *bcl-2* به عنوان بخشی از برنامه مستقل رونویسی مرگ سلولی تأثیر می‌گذارد (25). در واقع، *p53* سیتوزولی به پروتئین‌های خانواده *bcl-2* پرو آپوپتوتیک (مانند Bax) متصل می‌شود که به‌نوبه خود منجر به افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری، آزاد سازی سیتوکروم C و فعال شدن کاسپازهای 3 و 9 می‌شود (26، 27). مطالعات قبلی نیز گزارش نموده‌اند که افزایش بیان ژن *p53* سبب آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در بافت بیضه شده است (28، 11).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، مقایسه بیان ژن‌های *Bax* و *bcl-2* نشان داد که سطح بیان ژن *Bax* پس از تجویز دانورویسین بالاتر بود. درفرآیند آپوپتوز *Bax* و *bcl-2* به ترتیب به‌عنوان ژن پیش‌برنده و ژن متوقف‌کننده آپوپتوز شناخته می‌شوند (29). مطالعه حاضر همراستا با سایر مطالعات، نقش ژن‌های *p53*، *Bax* و *bcl-2* را در آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در بافت بیضه نشان می‌دهد (11، 28). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه قبلی در خصوص اثر دانورویسین بر بیان ژن‌های *Bax* و *bcl-2* در سلول‌های لوسمی، مطابقت داشت (22). ژن *bcl-2*، غشاء میتوکندری را از اثرات مخرب *Bax* محافظت می‌نماید. کاهش در بیان/پایداری ژن *bcl-2* منجر به آزاد شدن سیتوکروم C از طریق غشای میتوکندری می‌شود که به نوبه خود منجر به فعال شدن مسیرهای وابسته به کاسپاز می‌شود (30، 31). تنظیم نسبت *Bax/bcl-2* که باعث ارتقای اندونوکلئازهای کاسپاز می‌شود یکی

بر تعداد سلول‌های آپوپتوزی بافت بیضه و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، کاملاً مطابقت داشت (11). نتایج مطالعه قبلی ما نشان داد که ژل رویال به دلیل فعالیت‌های استروژنی و آنتی‌اکسیدانی و نیز کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها، در تعدیل آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از دانورویسین در بیضه موش مؤثر بود (10). بنابراین می‌توان اظهار داشت که کاهش قابل توجه آپوپتوز پس از تجویز ژل رویال از طریق تنظیم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بیضه، تنظیم آبخار ژن‌های دخیل در آپوپتوز، مهار مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری و هم‌چنین تنظیم آپوپتوز سلول‌های زیای رخ می‌دهد. اثر محافظتی ژل رویال از بافت بیضه در برابر آسیب‌های مرتبط با نیکوتین و استرس گرمایی توسط مطالعات قبلی گزارش شده است (۱۷،۱۸).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با استفاده از ژل رویال می‌توان اثربخشی داروهای ضدسرطان نظیر دانورویسین را بهبود بخشید و عوارض جانبی آن‌ها را بر بافت‌های طبیعی تعدیل نمود. در این مطالعه بررسی بر روی موش‌های سالم انجام شد و پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده بر روی موش‌های سرطانی نیز انجام شود. هم‌چنین، مطالعات بیش‌تری در مورد القاء آنژیوژنز و مرگ آتوفازی توسط داروی دانورویسین و اثرات بهبود دهنده ژل رویال در مدل‌های سرطانی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی فیزیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات است که با شماره 980615 تصویب شده است. کد اخلاق IR.KUMS.REC.1398.695 می‌باشد. نویسندگان از کارشناسان گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه قدردانی می‌نمایند.

دیگر از مسیرهای آپوپتوز است که تحت تأثیر دانورویسین در بیضه قرار می‌گیرد. کاسپاز 3 در شرایط آسیب DNA و اختلالات فاکتور رشد، و نیز مسیر وابسته به پروتئین *bcl-2* فعال می‌شود. این مسیر وابسته به میتوکندری است و دخالت پروتئین‌های سیستئین یا کاسپازها (کاسپازهای 3، 8، 9 و 6) ضروری است. براساس نتایج مطالعه حاضر، تجویز دانورویسین سبب فعال شدن کاسپازهای 3، 8 و 9 شد. کاسپازها دسته‌ای از پروتئازهای سیستئینی هستند که نقش مهمی در فرآیند آپوپتوز بر عهده دارند (32). فعال شدن کاسپاز 9 در نتیجه اختلال در غشای خارجی میتوکندری است که موجب تغییر پتانسیل غشا و نفوذپذیری آن می‌شود (33). در حقیقت، کاسپازهای 8 و 9، کاسپازهای آغازگر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز هستند و موجب فعال شدن کاسپاز 3 یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست می‌شود (34). کاسپاز 3 اندونوکلئازهای سیتوپلاسمی را فعال می‌کند و در نهایت باعث تخریب مواد هسته‌ای، پروتئین‌ها و ساختارهای اسکلت سلولی می‌شود (35). هم‌سو با نتایج این مطالعه، گزارش شده است که پس از تجویز دانورویسین، افزایش سطح بیان فعالیت کاسپازهای 3 و 8 منجر به آپوپتوز در سلول‌های لوسمی شد (22). نتایج یک مطالعه نشان داد که دانورویسین منجر به فعال شدن کاسپازهای پایین دستی (عمدتاً کاسپاز 3) می‌شود که مسئول جداسازی سوبستراهای مهم در مرحله تخریب مرگ سلولی است (36). مشابه این نتایج، نتایج مطالعات دیگر نشان داد که دوکسوروبیسین باعث افزایش کاسپازهای فعال 3، 8 و 9 می‌شود (36،۲۸،۱۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز توأم ژل رویال با داروی دانورویسین سبب کاهش درصد سلول‌های آپوپتوزی، بیان ژن‌های *caspase 3*، *Bax*، *P53*، *caspase 9*، *caspase 8* و افزایش بیان ژن *bcl-2* شد. این نتایج با مطالعه قبلی ما در خصوص اثر تجویز هم‌زمان ژل رویال و داروی ضدسرطان دوگورویسین

References

- Murphy T, Yee KW. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2017; 18(16): 1765-1780.
- Morrow GR, Black PM. Anticipatory nausea and vomiting side effects experienced by cancer patients undergoing chemotherapy treatment. In: *Effect of cancer on quality of life*. Florida: CRC Press; 2021. p. 251-268.
- Stojak M, Mazur L, Opydo-Chanek M, Łukawska M, Oszczapowicz I. In vitro induction of apoptosis and necrosis by new derivatives of daunorubicin. *Anticancer Res* 2013; 33(10): 4439-4443.
- Chikayama S, Kimura S, Kobayashi Y, Abe T, Maekawa T, Kondo M. Effects of daunorubicin on cell growth, cell cycle and induction of apoptosis in HL-60 cells. *Haematologia* 1998; 29(2): 115-121.
- Rao J, Xu D-R, Zheng F-M, Long Z-J, Huang S-S, Wu X, et al. Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Trans Med* 2011; 9(1): 1-15.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 99-163.
- Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A rev. *JFF* 2012; 4(1): 39-52.
- Zangeneh MM, Zangeneh A. Novel green synthesis of Hibiscus sabdariffa flower extract conjugated gold nanoparticles with excellent anti-acute myeloid leukemia effect in comparison to daunorubicin in a leukemic rodent model. *Appl Organomet Chem* 2020; 34(1): e5271.
- Safaei Pourzamani M, Oryan S, Jalili C, Yaghmaei P, Ghanbari A. Protective effects of royal Jelly on the male reproductive system in Daunorubicin-treated mice. *SJKU* 2022; 27(1): 28-38.
- Safaei Pourzamani M, Oryan S, Yaghmaei P, Jalili C. Royal jelly alleviates side effects of Doxorubicin on male reproductive system: a mouse model simulated human chemotherapy cycles. *Res J Pharmacogn* 2022; 9(1): 77-87.
- Miguel MG, El-Guendouz S. Volatile compounds of royal jelly In: Alvarez-Suarez J. (eds) *Bee Products-Chemical and Biological Properties*. Switzerland: Springer; 2017. P 191-197.
- Ahmad S, Campos MG, Fratini F, Altaye SZ, Li J. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *Int J Mol Sci* 2020; 21(2): 382.
- Martinello M, Mutinelli F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* 2021; 10(1): 71.
- Karaca T, Demirtaş S, Karaboğa İ, AYVAZ S. Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci* 2015; 45(1): 27-32.
- Almeer RS, Soliman D, Kassab RB, AlBasher GI, Alarifi S, Alkahtani S, et al. Royal jelly abrogates cadmium-induced oxidative challenge in mouse testes: involvement of the Nrf2 pathway. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12): 3979.
- Mahdivand N, Shalizar-Jalali A, Nejati V, Najafi G, Rahmani F. Adaptogenic potential of royal jelly in reproductive system of heat stress-exposed male rats. *J Therm Biol* 2021; 96: 102827.

17. Nazar-Zadeh M, Jalili C, Nikgoftar Fathi A, Ghanbari A, Bakhtiari M. Royal-jelly-based apitherapy can attenuate damages to male reproductive parameter following nicotine administration. *Animal Model Exp Med* 2022; 5(2): 133-140.
18. Shahneh FZ, Valiyari S, Azadmehr A, Hajiaghaee R, Yaripour S, Bandehagh A, Baradaran B. Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by *Echinophora platyloba* DC: in vitro analysis. *Adv Pharmacol Sci* 2013; 2013: 512931.
19. Darakhshan S, Ghanbari A. Tranilast enhances the anti-tumor effects of tamoxifen on human breast cancer cells in vitro. *J Biomed Sci* 2013; 20(1): 1-13.
20. Hashem NM, Hassanein EM, Simal-Gandara J. Improving reproductive performance and health of mammals using honeybee products. *Antioxidants* 2021; 10(3): 336.
21. Al-Aamri HM, Irving HR, Bradley C, Meehan-Andrews T. Intrinsic and extrinsic apoptosis responses in leukaemia cells following daunorubicin treatment. *BMC Cancer* 2021; 21(1): 438.
22. Trivedi P, Tripathi D, Jena G. Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: role of NFκB, p38 and caspase-3. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(4): 838-847.
23. Öztürk E, Kaymak E, Akin A, Karabulut D, Ünsal HM, Yakan B. Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Hum Exp Toxicol* 2020; 39(10): 1364-1373.
24. Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3): 843-850.
25. Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-xL-binding interface using NMR. *FEBS Lett* 2004; 559(1-3): 171-174.
26. Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, et al. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Boil* 2004; 6(2): 121-128.
27. Rizk SM, Zaki HF, Mina MA. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2014; 67: 176-186.
28. Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, Rousset C, Johnston MV, Hagberg H. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms? *Pediatr Res* 2007; 61(4): 444-450.
29. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Boil* 2008; 18(4): 157-164.
30. Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X, et al. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 2009; 108(2): 427-436.
31. Lopez J, Tait S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 2015; 112(6): 957-962.
32. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(5): 1106-1121.
33. Green DR. Caspase activation and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2022; 14(8): a041020.
34. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(4): a008656.

35. Masquelier M, Zhou QF, Gruber A, Vitols S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(6): 1047-1056.
36. Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, Samadi N. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(3): 351-359.