

The effect of endurance training and vitamin C consumption in the conditions of air pollution on the expression of apoptotic proteins BAX and Bcl-2 in the brain of male Wistar rats

Vaezi SS, Salesi M*, Daryanoosh F, Hemati-Nafar M

Department of Exercise Physiology, Faculty of Education and Psychology, University of Shiraz, Shiraz, I.R. Iran.

Received: 2022/11/21 | Accepted: 2023/05/3

Abstract:

Background: Factors such as exercises training and taking antioxidant supplements can moderate or increase apoptosis. Therefore, this present study aimed to the effect of endurance training and vitamin C consumption in the conditions of air pollution on the expression of apoptotic proteins BAX and Bcl-2 in the brain of male Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 30 Wistar rats were randomly divided into five groups: 1) polluted air control, 2) supplement, 3) training, 4) training+supplement, and 5) healthy air control. Rats trained in polluted air were maintained in a special chamber to simulate polluted air and performed endurance training protocol. Vitamin C supplement groups received the supplement at a dose of 20 mg/kg. Data analysis was done through One-Way-ANOVA and Tukey's post-hoc tests in SPSS version 26 software.

Results: There is a significant difference in BAX and BCL-2 protein gene expression between the groups ($P \leq 0.0001$). This significant difference was the increase in BAX protein expression in the training+supplement group as well as the healthy air control group compared to other groups ($P \leq 0.05$). In the training and supplement groups were seen a decrease in BCL-2 protein expression compared to the control group (polluted and healthy) ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Considering the increase in BAX and decrease in BCL-2 expression, it is possible that training in polluted air can lead to cell damage related to apoptosis. Also, the use of vitamin C supplement alone or together with training cannot modulate the apoptosis of brain cells.

Keywords: Endurance training, Vitamin C, BAX protein, BCL-2 protein

***Corresponding Author**

Email: mhsnsls@gmail.com

Tel: 0098 917 712 1998

Fax: 0098 713 613 4630

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2023; Vol. 27, No 2, Pages 144-153

Please cite this article as: Vaezi SS, Salesi M, Daryanoosh F, Hemati-Nafar M. The effect of endurance training and vitamin C consumption in the conditions of air pollution on the expression of apoptotic proteins BAX and Bcl-2 in the brain of male Wistar rats. *Feyz* 2023; 27(2): 144-53.

تأثیر تمرین استقامتی و مصرف ویتامین C در شرایط آلودگی هوا بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک BAX و Bcl-2 مغز موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

سید سعید واعظی^۱، محسن ثالثی^{۲*}، فرهاد دریانوش^۳، محمد همتی‌نفر^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: عواملی مانند تمرین‌های ورزشی و مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سبب تعدیل یا افزایش آپوپتوز شود. بنابراین هدف از انجام تحقیق حاضر، تأثیر تمرین استقامتی و مصرف ویتامین C در شرایط آلودگی هوا بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک BAX و Bcl-2 مغز موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار به صورت تصادفی به پنج گروه (۱) کنترل هوای آلوده (۲) مکمل (۳) تمرین (۴) تمرین + مکمل و (۵) کنترل هوای سالم تقسیم شدند. موش‌های صحرایی تمرین در هوای آلوده در اتاقکی مخصوص برای شبیه‌سازی هوای آلوده، نگهداری شدند و پروتکل تمرینی استقامتی را انجام دادند. گروه‌های مکمل ویتامین C، مکمل را با دوز ۲۶ mg/kg ۲۰ دریافت کردند. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و تعقیبی توکی در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. نتایج: بین گروه‌های پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BAX و Bcl-2 وجود داشت ($P \leq 0.001$). این تفاوت معنی‌دار، افزایش بیان پروتئین BAX در گروه تمرین + مکمل و همچنین گروه کنترل هوای سالم نسبت به دیگر گروه‌ها را نشان داد ($P \leq 0.05$). در گروه‌های تمرین و مکمل، کاهش بیان پروتئین Bcl-2 نسبت به گروه کنترل‌ها (آلوده و سالم) نشان داده شد ($P \leq 0.05$). نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش بیان BAX و کاهش Bcl-2، احتمالاً تمرین ورزشی در هوای آلوده می‌تواند منجر به آسیب‌های سلولی مرتبط با آپوپتوز شود. همچنین مصرف مکمل ویتامین C به‌تنهایی یا همراه با تمرین‌های ورزشی، نمی‌تواند آپوپتوز سلول‌های مغزی را تعدیل کند.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، ویتامین C، پروتئین BAX، پروتئین Bcl-2

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲، صفحات ۱۵۳-۱۴۴

مقدمه

در حال ظهور شواهد، نگرانی بالقوه‌ای در مورد مضرات آلاینده‌های استنشاقی بر سیستم عصبی مرکزی (CNS) ایجاد کرده است. قرارگرفتن در معرض آلودگی هوا با عوارض جانبی بر رشد ذهنی و عملکردهای رفتاری مانند اضطراب، کاهش توجه، کاهش ضریب هوشی، کاهش حافظه و عملکرد و شیوع بالاتر اختلال بیش‌فعالی و اختلال طیف اوتیسم همراه بوده است [۲،۳]. یافته‌های حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک همچنین از رابطه قرارگرفتن در معرض آلودگی هوا با کاهش شناختی و زوال عقل در انسان پشتیبانی می‌کند [۴-۶]. به‌عنوان یک مسیر سیگنالینگ که آپوپتوز و بقای سلول را تنظیم می‌کند، مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز BAX/Bcl-2 در بسیاری از بیماری‌ها از جمله چندین بیماری سیستم عصبی نقش دارد. پروتئین‌های مربوط به خانواده Bcl-2، نقش مهمی در ترویج یا مهار مسیر آپوپتوز ناشی از اختلال عملکرد دارند [۷]. مرگ سلولی از طریق آپوپتوز در پاسخ به محرک‌های محیطی رخ می‌دهد. تنظیم آپوپتوز برای درمان سرطان، رشد طبیعی و همچنین برای توسعه و جنین‌زایی مهم است. در مطالعات مربوط به بافت مغز انسان و مدل‌های حیوانی تجربی نشان داده شده است که خانواده Bcl-2 مرگ سلولی آپوپتوز در سیستم عصبی را تنظیم می‌کنند [۸]. Bcl-2 برخلاف BAX به‌عنوان ضدآپوپتوز عمل می‌کند که دارای

آلودگی هوا یک مشکل مهم بهداشت محیط است که با بیماری‌های تنفسی، عوارض قلبی - عروقی، مغزی و مرگ‌ومیر همراه است. منابع متداول آلودگی هوا شامل احتراق سوخت‌های فسیلی و فرآیندهای صنعتی و کشاورزی است. آلاینده‌های هوا که یک نگرانی عمده در بهداشت و سلامت عمومی هستند شامل ذرات (PM) به‌عنوان مثال، کربن و عناصر آلی، فلزات و هیدروکربن‌های معطر چندحلقه‌ای، مونوکسید کربن (CO)، ازن (O_3)، سرب، دی‌اکسید نیتروژن (NO_2) و دی‌اکسید گوگرد (SO_2) می‌باشد [۱].

۱. دانشجوی دکتری، بخش علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، ایران
۲. دانشیار، بخش علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، ایران
۳. استادیار، بخش علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، ایران

* نشانی نویسنده مسؤله:

فارس، شیراز، میدان ارم، دانشگاه شیراز، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، بخش علوم ورزشی

تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۸

دورنویس: ۰۷۱۳۶۱۳۴۶۳۰

پست الکترونیک: mhsnsls@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۳۰

می‌شود [۱۴]. در تحقیقی دیگر تأثیر مصرف مکمل ویتامین C بر اثرات تمرین ورزشی در هوای آلوده روی نشانگرهای استرس اکسیداتیو بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که مصرف مکمل ویتامین C، تأثیری بر کاهش عوامل استرس اکسیداتیو ندارد و این عدم تأثیرگذاری را در دوز مصرفی ویتامین C دانستند [۱۵]. بنابراین به‌خوبی تأثیر منفی آلاینده‌های هوا بر آسیب، اختلال و آپوپتوز بافت‌های مختلف بدن و به‌خصوص بر مغز مشخص گردیده و نشان داده شده است که مکانیسم اثر آلودگی هوا از طریق استرس اکسایشی می‌باشد؛ در نتیجه این سؤال مطرح می‌شود که آیا آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین C می‌توانند موجب کاهش عوارض منفی آلودگی هوا به‌خصوص کاهش آپوپتوز در مغز شوند؟ همچنین تأثیرات مثبت و مفید تمرین‌های ورزشی به‌ویژه تمرین استقامتی بر کاهش آسیب‌های ساختاری و آپوپتوز مشخص گردید است اما مشکل اصلی این تمرینات اجرای آن‌ها در فضای باز و در نتیجه مواجهه با آلودگی هوا است. لذا سوال مطرح شده در این حیظه مربوط به این است که آیا تمرین استقامتی در هوای آلوده موجب تشدید اثرات مخرب آلودگی هوا می‌شود یا می‌تواند تغییراتی در بیان فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز مغز ایجاد نماید که اثرات منفی آلودگی هوا بر آپوپتوز را خنثی نماید یا خیر؟ همچنین آیا اجرای تمرین استقامتی با شدت متوسط در شرایط آلودگی هوا و همزمان مصرف مکمل ویتامین C می‌تواند باعث کاهش آپوپتوز در بافت مغز شود؟ در نتیجه، پژوهش حاضر جهت دستیابی به جواب این سوالات، به تأثیر تمرین استقامتی و مصرف ویتامین C در شرایط آلودگی هوا بر بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک BAX و Bcl-2 مغز موش‌های صحرایی نر می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

نمونه و نوع تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بود. در این پژوهش تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار نر خریداری و در قفسه‌های پلی‌کربنات (هر ۴ سر در یک قفسه) با دسترسی آزاد به آب و غذا، در آزمایشگاه مخصوص حیوانات با دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و چرخه تاریکی - روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به پنج گروه (۱ کنترل هوای آلوده، ۲ مکمل، ۳ تمرین، ۴ تمرین + مکمل و ۵ کنترل هوای سالم تقسیم شدند. اصول اخلاقی (کد اخلاق با شماره IR.SUMS.REHAB.REC.1400.006) تحقیق حاضر، مطابق با

خواص پیش‌آپوپتوز است. ژن Bcl-2 در تنظیم آپوپتوز، بسیار دارای اهمیت بوده و با پروتئین‌های مختلفی که نقش کلیدی در تنظیم آپوپتوز سلولی دارند، در ارتباط است. ژن Bax، در مغز بیان شده و به‌عنوان یک پروآپوپتوز برای همولوگ Bcl-2 است. تعامل بین اعضای خانواده BCL-2، هم در سیتوزول و هم در میتوکندری، بقا یا مرگ را تعیین می‌کند. مشخص شده است که نسبت BAX/BCL-2، سرنوشت یا بقای سلول را به‌دنبال یک محرک آپوپتوز تعیین می‌کند [۹]. بسیاری از فعالیت‌های ارتقاء سلامت از فعالیت بدنی به‌عنوان مداخله استفاده می‌کنند؛ زیرا این امر به بهداشت و سلامت کمک می‌کند و بیماری‌های عروق کرونر قلب، دیابت، فشار خون بالا و انواع خاصی از سرطان، عوارض و مرگ‌ومیر را کاهش می‌دهد. همچنین، فعالیت بدنی منظم از سلامت و عملکرد مغز پشتیبانی می‌کند. به‌عنوان مثال، شناخت و سلامت روانشناختی را بهبود می‌بخشد، شروع بیماری‌های عصبی مانند بیماری آلزایمر را به تأخیر می‌اندازد و از نظر درمانی برای افسردگی کاربرد دارد [۱۰، ۱۱]. شواهد در حال‌رشد، نقش مهم مکانیسم‌های سلولی - مولکولی که از طریق آن فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش انعطاف‌پذیری عصبی و بهبود شناخت می‌شود را نشان می‌دهد. پیش‌بینی می‌گردد که ممکن است اثرات دوم هنگام انجام فعالیت بدنی در فضای باز در یک محیط شهری تشدید شوند. میزان تهویه در طول فعالیت‌های ورزشی و در محیط‌های آلوده افزایش می‌یابد، که این امر منجر به افزایش قابل‌توجه استنشاق گازهای تنفسی آلوده می‌شود [۱۰]. در تحقیقی Song و همکاران به بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین ورزشی هوازی بر محتوای پروتئین‌های Bcl-2 و Bax در موش‌های صحرایی دارای التهاب مغزی و عملکرد حرکتی پرداختند. این محققان بیان کردند که تمرین ورزشی هوازی مسیر مرتبط با آپوپتوز سلول‌های عصبی در قشر حرکتی و اختلالات حرکتی ناشی از التهاب مغز را کاهش می‌دهد [۱۲]. از طرفی دیگر نشان داده شده است مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین C می‌تواند از بدن در برابر رادیکال‌های آزاد که به سلول‌های بدن آسیب می‌رسانند، محافظت نمایند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با رادیکال‌های آزاد پیوند خورده و مانع از تأثیر مخرب این مولکول‌ها روی سلول‌ها شوند. تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی از جمله ویتامین C، فعالیت رادیکال‌های آزاد را خنثی و باعث کاهش اختلالات میتوکندری از جمله آپوپتوز می‌شود [۱۳]. در تحقیقی دیگر به بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده و مصرف ویتامین C بر سطوح عوامل سلولی مرتبط با عروق در موش‌های صحرایی پرداخته شد. در این بررسی نشان داده شد که مصرف مکمل ویتامین C در هوای آلوده، منجر به بهبود این عوامل

تأثیر تمرین استقامتی و مصرف ویتامین C در، ...

گردید. میزان گاز موردنیاز جهت رسیدن به غلظت آلاینده، مطابق آلاینده‌های روزهای آلوده سال در شهر اصفهان، توسط مهندسين شرکت ترکیب گاز از طریق فرمول $PV=nRT$ محاسبه شد. در این محاسبه از متغیرهای حجم اتاق، دمای محیط و فشار هوا استفاده گردید. میزان گازهای آلاینده مونوکسیدکربن، ۱۰ تا ۱۵ ppm. دی‌اکسید نیتروژن ۰/۳ تا ۰/۶ ppm و برای دی‌اکسید گوگرد، میزان 0.1 ± 0.05 ppm در روزهای آلوده شهر اصفهان گزارش شده بود. میزان محاسبه شده گاز برای مونوکسیدکربن ۹۵ میلی‌لیتر، دی‌اکسید نیتروژن ۴/۳ میلی‌لیتر و برای دی‌اکسید گوگرد ۴/۸ میلی‌لیتر بود که توسط سرنگ گاز از مخازن برداشت شده و به محیط اتاقک ایزوله به ابعاد $165 \times 200 \times 273$ سانتی‌متر و حجم ۹ متر مکعب تزریق شدند. میزان غلظت آلاینده‌ها توسط دستگاه Aeroqual Series 200 به‌طور مداوم در طول پژوهش، مورد پایش قرار گرفت.

اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم توانبخشی شیراز مورد توجه قرار گرفت.

ایجاد آلودگی

موش‌های صحرایی تمرین در هوای آلوده در اتاقک مخصوص نگهداری و پروتکل تمرینی را انجام دادند. عملیات ساخت اتاقک ایزوله برای نگهداری آلاینده‌ها و تمرین نمونه‌های حیوانی در دانشکده علوم ورزشی دانشگاه اصفهان انجام شد. اتاقک از جنس چوب بود و به‌وسیله چسب سیلیکون درزگیری و عایق‌بندی شد. پس از ساخته شدن اتاقک، نشت گاز از این اتاق توسط دستگاه اندازه‌گیری گازهای محیطی طی ۸ ساعت اندازه‌گیری شد. طراحی به گونه‌ای بود که اتاقک دارای دو در به‌صورت تودرتو و به‌عنوان درهای بارگیری بود تا تبادل گاز داخل اتاقک با محیط بیرون در هنگام تردد از درها به حداقل برسد (شکل شماره ۱).

آلودگی ایجادشده در این پژوهش از سیلندرهای گاز خالص، تهیه شده از شرکت ترکیب گاز پارس اصفهان ایران، استخراج



شکل شماره ۱- نمونه پلان و تصویر سه‌بعدی از اتاقک ایزوله

سرعت، از آزمون فزاینده استاندارد شده برای موش‌های صحرایی استفاده شد. آزمون شامل ۱۰ مرحله سه دقیقه‌ای با شیب صفر درجه بود. سرعت در مرحله اول ۰/۳ کیلومتر بر ساعت بود و در مراحل بعدی ۰/۳ کیلومتر بر ساعت به سرعت نوار اضافه می‌شد و سرعت به‌دست آمده در آخرین مرحله که موش‌های صحرایی قادر به دویدن نبودند به‌عنوان حداکثر سرعت دویدن، در نظر گرفته شد [۱۶]. تمرین استقامتی شامل گرم کردن به مدت ۵ دقیقه با شدت ۴۰ تا ۵۰

پروتکل تمرینی

تمامی موش‌های صحرایی به مدت یک هفته با محیط و پس از آن تمامی آن‌ها به مدت یک هفته دیگر (۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه و ۵ روز در هفته) با دویدن بر روی تردمیل آشنا شدند. موش‌های صحرایی پس از ۴۸ ساعت استراحت بعد از دوره آشنایی با تردمیل، مورد آزمون وامانده‌ساز (در شروع و بعد از ۴ هفته)، جهت سنجش حداکثر سرعت قرار گرفتند [۱۶]. جهت تعیین حداکثر

درصد سرعت بیشینه روی تردمیل و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۶۵ تا ۷۰ درصد سرعت بیشینه در دو هفته اول بود. در انتهای هر جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۵ تا ۴۵ درصد سرعت بیشینه، سرد می‌کردند (جدول شماره ۱) [۱۶].

جدول شماره ۱- پروتکل تمرین هوایی اجرا شده روی گروه‌های تمرین در هوای آلوده

مرحله	ایجاد آلودگی در اتاقک	ورود رت‌ها به اتاقک	گرم کردن	تمرین اصلی	سرد کردن	خروج رت‌ها از اتاقک
مدت زمان	۵-۱۰ دقیقه	۲-۳ دقیقه	۵ دقیقه	۳۰ دقیقه	۵ دقیقه	۲-۳ دقیقه
شدت	-	-	۴۰-۵۰ درصد	۶۵-۷۰ درصد	۳۵-۴۵ درصد سرعت	-
			سرعت بیشینه	سرعت بیشینه	بیشینه	

سپری شدن این زمان، میکروتیوپ‌ها در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. در ادامه فاز رویی که به فاز آبی شناخته می‌شود و حاوی RNA می‌باشد به آرامی جدا شده و به میکروتیوپ جدید منتقل گردید و هم‌حجم محلول جدا شده، ایزوپروپانول ترجیحاً سرد اضافه شد و سپس ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شده تا RNA در کف میکروتیوپ رسوب کرده و مرحله آبگیری انجام شود. سوپرناتانت یا مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد به هر میکروتیوپ اضافه شد و ورتکس گردید. میکروتیوپ‌ها بلافاصله با دور ۷۵۰۰ RPM در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند که به این مرحله، مرحله آبدی گفته می‌شود و بهتر است ۲ مرتبه انجام گردد. سپس اتانول خالی شد و درب میکروتیوپ‌ها باز گذاشته شد تا اتانول اضافی تبخیر گردد زیرا حضور اتانول در مراحل بعدی به‌عنوان مهارکننده واکنش، عمل می‌کند. به هر میکروتیوپ بعد از سپری شدن ۱۰ دقیقه، به مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل اضافه شد. از RNA به‌دست‌آمده به‌منظور انجام آزمایش Real-Time PCR استفاده گردید. به‌منظور بررسی کمی و خلوص RNA تخلیص شده، از دستگاه Nano Drop و جذب نوری حاصل از آن استفاده شد. تولید cDNA از طریق اتصال پرایمری که به RNA هیبرید می‌شود و با کمک آنزیم reverse transcriptase انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده پرایمرهای عمومی Random Hexamer و Oligo dt بوده و آنزیم مورد استفاده آنزیم reverse transcriptase موجود در کیت بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز پروتئین‌ها

Gene	FORWARD (5'>3')	REVERSE (5'>3')
BAX	TTGCTACAGGGTTTCATCCAG	TGTTGTTGTCCAGTTCATCGC
BCL-2	TCAATGTGTGTGGAGCGTC	ATCCCAGCCTCCGTTATCC
GAPDH	TGCCAGCCTCGTTCATAG	ACTGTGCCGTTGAACTTGCC

ابتدا از آزمون کالموگروف - اسمیرنوف برای تعیین

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مکمل‌دهی ویتامین C در گروه‌هایی که تحت تأثیر مکمل ویتامین C بودند، ویتامین با استفاده از تکنیک گاواژ به موش‌های صحرایی خوراندند. میزان استفاده ویتامین C، ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در روز بود [۱۷].

روش بافت‌برداری

۴۸ ساعت پس از ۸ هفته دوره تمرینی، موش‌های صحرایی با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون‌صفاقی ترکیبی از ۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کتامین و سه تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن زایلازین، بی‌هوش شدند. سپس بافت مغز آن‌ها استخراج شده و این نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند.

روش آزمایشگاهی

در این تحقیق میزان بیان پروتئین‌های BAX و Bcl-2، از طریق روش آزمایشگاهی، به روش Real-Time PCR و به‌وسیله کیت مخصوص بافتی، مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور استخراج محتوای RNA از نمونه‌ها، از محلول YTIZOL از شرکت سیناکلون استفاده شد و مراحل استخراج نمونه‌ها طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت؛ بدین منظور ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت را جدا و به‌روش دستی (هاون چینی و نیتروژن مایع) هموژنیزه کرده و زیر هود شیمیایی مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول YTIZOL اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصل شده را به میکروتیوپ‌های RNase/Dnase free انتقال داده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، انکوبه شد. به هر میکروتیوپ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و ورتکس گردید و به مدت ۵ دقیقه روی یخ، انکوبه شد. بعد از

(شکل شماره ۲). از طرفی بین گروه‌های تمرین + مکمل نسبت به تمرین (افزایش) ($P=0/001$) و کنترل هوای سالم نسبت به تمرین (افزایش) ($P=0/0001$)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت (نمودار شماره ۱). همچنین نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین گروه‌های پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BCL-2 وجود داشت ($P=0/0001$) (جدول شماره ۳). نتایج تعقیبی توکی نشان داد که این تفاوت، بین جفت گروه‌های مکمل (کاهش) ($P=0/0001$)، تمرین (کاهش) ($P=0/001$) و کنترل هوای سالم (کاهش) ($P=0/01$) نسبت به کنترل هوای آلوده می‌باشد (نمودار شماره ۲). همچنین بین گروه‌های تمرین (افزایش) ($P=0/0001$)، تمرین + مکمل (افزایش) ($P=0/0001$) و کنترل هوای سالم (افزایش) ($P=0/0001$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت (نمودار شماره ۲). از طرفی بین گروه‌های تمرین + مکمل نسبت به گروه تمرین (افزایش) ($P=0/0001$) و همچنین بین گروه کنترل هوای سالم نسبت به گروه تمرین + مکمل (کاهش)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P=0/0001$) (نمودار شماره ۲).

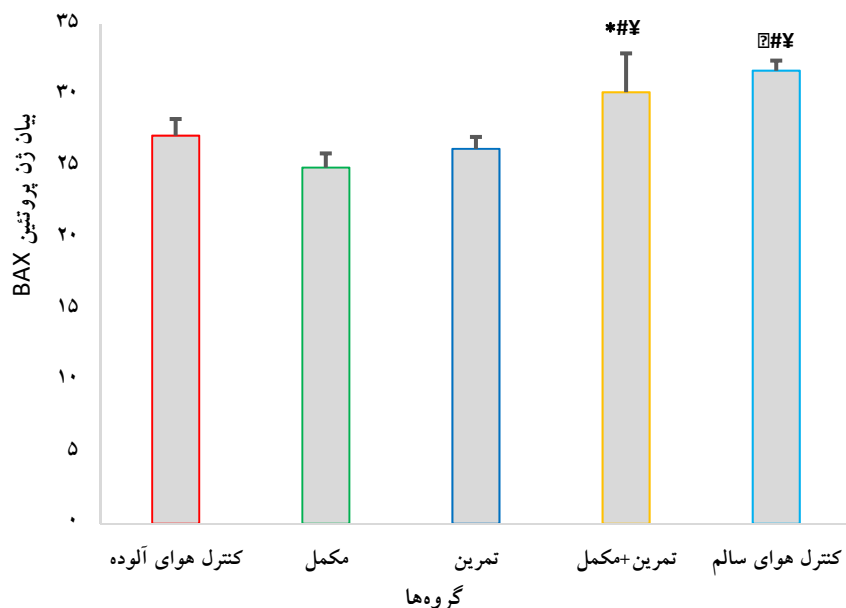
نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، از آزمون ANOVA یک‌طرفه و در صورت معنی‌دار بودن، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه جفت گروه‌ها استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ انجام گرفت. نمودارها از طریق نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ طراحی شد. سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر، $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

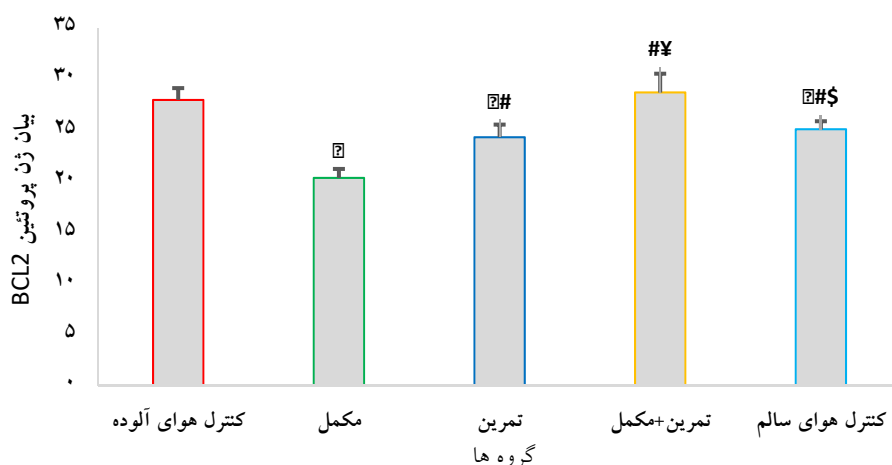
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان می‌دهد که بین گروه‌های پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BAX وجود دارد ($P=0/0001$) (جدول شماره ۳). نتایج تعقیبی توکی نشان داد که این تفاوت بین جفت گروه‌های تمرین + مکمل نسبت به کنترل هوای آلوده (افزایش) ($P=0/03$) و کنترل هوای سالم نسبت به کنترل هوای آلوده (افزایش) ($P=0/001$) داشته است (نمودار شماره ۱). همچنین بین گروه‌های تمرین + مکمل نسبت به مکمل (افزایش) ($P=0/0001$) و تمرین + مکمل نسبت به کنترل هوای سالم (افزایش) ($P=0/0001$)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت

جدول شماره ۳- نتایج آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL-2 در گروه‌های پژوهش

متغیر	گروه	میانگین	F	سطح معنی‌داری
بیان ژن پروتئین BAX	کنترل هوای آلوده	۲۷/۲۰±۱/۱۷	۲۰/۹۱	۰/۰۰۰۱
	مکمل	۲۴/۹۶±۰/۹۹		
	تمرین	۲۶/۲۷±۰/۸۴		
	تمرین + مکمل	۳۰/۲۴±۲/۷۲		
	کنترل هوای سالم	۳۱/۷۵±۰/۷۱		
بیان ژن پروتئین BCL-2	کنترل هوای آلوده	۲۷/۹۶±۱/۱۵	۴۲/۴۳	۰/۰۰۰۱
	مکمل	۲۰/۳۳±۰/۸۸		
	تمرین	۲۴/۳۱±۱/۲۳		
	تمرین + مکمل	۲۸/۶۹±۱/۸۳		
	کنترل سالم	۲۵/۰۹±۰/۷۸		



نمودار شماره ۱- میانگین و انحراف استاندارد گروه‌های پژوهش بیان ژن پروتئین BAX
 (* وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل هوای آلوده) (## وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه مکمل)
 (¥ وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین)



نمودار شماره ۲- میانگین و انحراف استاندارد گروه‌های پژوهش بیان ژن پروتئین BCL-2
 (* وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل هوای آلوده) (## وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه مکمل)
 (¥ وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین) (\$ وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین + مکمل)

نگردید. در تحقیقی شمسانی و همکاران (۲۰۱۵) در ارتباط با نقش مسیر آپوپتوز از طریق بیان پروتئین‌های BAX و BCL-2 در مغز، به بررسی تمرین استقامتی بر مرگ سلولی و بیان پروتئین‌های BAX و BCL-2 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی - جریان مجدد مغزی در موش‌های صحرایی نر پرداختند. تمرین ورزشی شامل ۴ هفته تمرین استقامتی، ۵ روز در هفته بود. نتایج، کاهش معنی‌داری را در گروه ورزشی - ایسکمی بر بیان پروتئین‌های BAX و BCL-2 هیپوکامپ نسبت به گروه ایسکمی نشان داد. این محققان بیان کردند که انجام تمرین استقامتی به صورت پیش آماده‌سازی، می‌تواند از

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین گروه‌های پژوهش تغییر معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BAX وجود دارد. این تفاوت معنی‌دار، افزایش بیان ژن پروتئین BAX در گروه تمرین + مکمل و همچنین گروه کنترل هوای سالم نسبت به دیگر گروه‌ها بود. همچنین بین گروه‌های پژوهش حاضر تغییر معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BCL-2 وجود داشت. در گروه‌های تمرین و مکمل، کاهش بیان ژن پروتئین BCL-2 نسبت به گروه کنترل‌ها (آلوده و سالم) مشاهده شد؛ اما در گروه تمرین + مکمل افزایش معنی‌داری مشاهده

همکاران (۲۰۱۸) تأثیر آلودگی هوا و ذرات معلق و بیان پروتئین‌های آپوپتوتیکی در مغز را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که در اثر آلودگی هوا و وجود ذرات معلق در آن، سطوح mRNA و بیان پروتئین Bcl-2 و نسبت Bcl-2/Bax در کورتکس مغز کاهش می‌یابد و در نتیجه باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که آلودگی هوا شرایط فیزیولوژیکی را برهم می‌زند [۲۰]. نتایج تحقیقات گزارش شده، افزایش بیان پروتئین BAX و کاهش بیان پروتئین BCL-2 را نشان می‌دهد و این نتایج را می‌توان تا حدودی در یافته‌های تحقیق حاضر نیز مشاهده کرد. افزایش بیان ژن پروتئین BAX در گروه تمرین + مکمل مشاهده شد و این در حالی است که هر کدام از این عوامل به تنهایی نیز منجر به کاهش بیان ژن پروتئین BAX می‌شوند؛ هرچند این مقادیر غیرمعنی‌دار بودند. در ارتباط با پروتئین BCL-2، نیز چنین رفتاری در گروه‌ها نسبت به یکدیگر مشاهده شد. این موضوع می‌تواند حاصل اختلال در متابولیسم، شرایط فیزیولوژیکی آزمودنی‌ها و همچنین شرایط محیطی نگهداری و تمرین آن‌ها باشد. در ارتباط با نتایج تحقیق حاضر تناقض در میزان بیان ژن گروه‌های این تحقیق نسبت به گروه کنترل سالم، وجود دارد. میزان بیان ژن BAX در گروه کنترل سالم، در بالاترین میزان نسبت به دیگر گروه‌ها بود و این در حالی است که میزان بیان ژن پروتئین BCL-2 نیز نسبت به بیشتر گروه‌ها، کمتر بود. این تغییر متفاوت می‌تواند به علت شرایط محیطی آزمایشگاهی و فیزیولوژیکی آزمودنی‌ها و تناقض در رفتار سلولی پروتئین‌ها نسبت به انجام تمرین استقامتی و مصرف مکمل ویتامین C باشد. البته شایان ذکر است که فرارنداشتن گروه‌های تحقیق حاضر در هوای سالم و انجام ندادن مقایسه، می‌تواند خود دلیلی به کاستی‌های انجام این پژوهش باشد و دیگر محققان باید این کاستی را مدنظر قرار دهند. با این وجود نشان داده شده است که مواجهه و در معرض آلودگی هوا قرار گرفتن، باعث ایجاد اختلال، آسیب و آپوپتوز به‌ویژه در بافت مغز می‌شود. در مسیر ایجاد آپوپتوز، BAX از سیتوپلاسم به غشای سلول انتقال یافته و تغییراتی در سد نفوذپذیری غشاء خارجی ایجاد می‌کند که این تغییرات باعث آزاد شدن سیتوکروم C و سایر فاکتورهای پیش‌برنده آپوپتوز از میتوکندری می‌شوند و در نهایت منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA می‌گردند. Bcl-2 در داخل سلول، با BAX هتروداایمر است و در صورت بیان اضافی آن، به صورت همودایمر درآمده و مانع از آپوپتوز می‌شود [۲۱]. ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان فراوان و قوی در بدن موجودات زنده است که می‌تواند نقش بسزایی در کاهش استرس‌های اکسیداتیو و حفاظت از ساختارهای سلولی باشد. نقش‌های حفاظتی ویتامین C روی دستگاه‌های بدن به‌خصوص

آسیب مغزی محافظت کند [۱۸]. در راستای نتایج تحقیق شمسائی و همکاران، در تحقیق حاضر نیز کاهش معنی‌دار بیان ژن پروتئین BCL-2 در گروه تمرین نسبت به گروه‌های کنترل در هوای سالم و آلوده مشاهده شد. این در حالی است که بیان ژن پروتئین BAX در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل هوای آلوده، تغییر معنی‌داری را نشان نداد و البته نسبت به گروه کنترل هوای سالم، کاهش معنی‌داری یافته بود. از عوامل مقایسه‌ای بسیار مهم در هر دو تحقیق نسبت به یکدیگر، می‌توان به نوع آزمودنی‌ها اشاره کرد که در تحقیق شمسائی و همکاران آزمودنی‌ها دچار آسیب‌ها و سکنه مغزی و در تحقیق حاضر موش‌های صحرایی، سالم بودند. همچنین شرایط محیطی تمرین نیز بسیار حائز اهمیت است. در تحقیق حاضر، تمرین در هوای آلوده انجام شد و این در حالی است که محیط تمرینی در تحقیق شمسائی و همکاران طبیعی بود. در بخش نتایج تحقیق حاضر در ارتباط با بیان ژن پروتئین BAX نشان داده شد که انجام تمرین و مصرف مکمل ویتامین C، تأثیر معنی‌داری ندارد. با این وجود ترکیب تمرین + مکمل، منجر به افزایش بیان ژن BAX شد؛ این افزایش می‌تواند نشان‌دهنده آسیب بیشتر برای آزمودنی‌ها، به سبب تمرین در هوای آلوده باشد. بنابراین می‌توان گفت که حتی مصرف آنتی‌اکسیدان قدرتمندی مانند ویتامین C نیز، نمی‌تواند از مضرات تمرین در هوای آلوده جلوگیری کند و بنابراین باید از تمرین در هوای آلوده خودداری کرد؛ البته یکی از عوامل مهم دیگر می‌تواند میزان دوز مصرفی ویتامین C باشد. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین و مصرف مکمل ویتامین C در هوای آلوده، منجر به کاهش BCL-2 می‌شود و در صورت ترکیب با یکدیگر، بیان ژن آن را تا حدودی نسبت به گروه کنترل هوای آلوده، افزایش می‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هر کدام از این دو مورد به تنهایی نمی‌توانند بیان ژن BCL-2 را که می‌تواند از آسیب سلولی جلوگیری کند، افزایش دهند و در صورت ترکیب این دو مورد، تا حدی می‌توانند سبب جبران این کاهش شوند. رفتارهای متفاوت در بیان ژن هر دو پروتئین BAX و BCL-2 حاکی از تأثیرات متفاوت عواملی مانند انجام و اصول تمرین‌های ورزشی، مکمل‌ها، شرایط محیطی و غیره می‌باشد. مکان تمرین می‌تواند یک عامل اساسی در تأثیرگذاری بر عوامل سلولی و مسیرهای مرتبط باشد. در این راستا Huang و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیقی، فعالسازی مسیرهای آپوپتوز به‌وسیله قرارگیری در معرض آلودگی هوا و PM را مورد بررسی قرار دادند و در پایان محققان چنین نتیجه‌گیری نمودند که آلودگی هوا منجر به کاهش زمان زنده‌ماندن سلول و افزایش آپوپتوز از طریق افزایش بیان BAX، کاهش Bcl-2 و افزایش تولید ROS می‌شود [۱۹]. همچنین در تحقیقی دیگر، Zhang و

محیطی طبیعی (غیرآزمایشگاهی) متفاوت است. با این وجود مصرف مکمل به صورت ترکیبی با انجام تمرین استقامتی در شرایط هوای آلوده منجر به افزایش بیان ژن BAX و BCL-2 شد. احتمالاً انجام تمرین های ورزشی از نوع هوازی در مکان هایی با هوای آلوده، می تواند سبب ایجاد آسیب های سلولی به بافت هایی مانند مغز شود.

نتیجه گیری

در نهایت، براساس نتایج تحقیق حاضر می توان نتیجه گرفت که احتمالاً تمرین هوازی در هوای آلوده می تواند بیان ژن پروتئین BAX و BCL-2 را دچار اختلال کند. همچنین، نشان داده شد که تمرین و مصرف مکمل ویتامین C به تنهایی تأثیر معنی داری بر بیان ژن BAX ندارد و در مقابل بیان ژن پروتئین BCL-2 را کاهش می دهد. براساس این نتایج می توان نتیجه گرفت که احتمالاً تمرین های هوازی مانند تمرین استقامتی در هوای آلوده می تواند سبب ایجاد آسیب های سلولی در بافت مغز شود و مصرف ویتامین C تأثیر مثبتی (افزایش بیان ژن پروتئین BAX در گروه تمرین + مکمل) بر معکوس کردن این آسیب های سلولی ندارد. در مقابل افزایش بیان ژن پروتئین BCL-2 در گروه تمرین + مکمل نشان می دهد که بدن از طریق بعضی عوامل با تغییر شرایط، از آسیب های بیش از حد بدنی جلوگیری می کند. در نهایت، باید برای انجام تمرین در شرایط محیطی با هوای آلوده عواملی مانند ریزآلاینده ها و همچنین شرایط تمرینی مانند مدت زمان و شدت تمرین را که می توانند در ایجاد آسیب تأثیرگذار باشند، بررسی کرد. برای روشن شدن تأثیرگذاری تمرین در هوای آلوده باید تحقیق های بیشتری در این زمینه انجام شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به صورت رساله دکتری در دانشگاه شیراز جمع آوری و ارائه شده است. از تمامی عزیزانی که ما را در این امر یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

References:

- [1] De Prado Bert P, Mercader EM, Pujol J, Sunyer J, Mortamais M. The effects of air pollution on the brain: a review of studies interfacing environmental epidemiology and neuroimaging. *Cur Environ Health Rep* 2018; 5(3): 351-64.
- [2] Suades-González E, Gascon M, Guxens M, Sunyer J. Air pollution and neuropsychological development: a review of the latest evidence. *Endocrinol* 2015; 156: 3473-82.

سیستم عصبی مورد تأیید قرار گرفته است [۲۲]. در تحقیقی، کرمانیان و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثرات مکمل ویتامین C بر آپوپتوز ناشی از سرب در هیپوکامپ موش های صحرایی بالغ پرداختند. مکمل ویتامین C، به طور قابل توجهی آپوپتوز سلول های هیپوکامپ ناشی از سرب را کاهش داد و همچنین بیان پروتئین BAX هیپوکامپ نیز کاهش یافت [۲۳]. در مطالعه حاضر نیز کاهش غیرمعنی دار در گروه مکمل و افزایش معنی دار در گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه کنترل در هوای آلوده مشاهده شد. در هر دو تحقیق، آلودگی اتفاق افتاده اما شرایط و نحوه ایجاد آن متفاوت بوده است. در تحقیق حاضر آلودگی از طریق تنفس در هوای آلوده بوده و در تحقیق کرمانیان از طریق، سرب ایجاد گردیده است. با این وجود به نظر می رسد که ویتامین C به تنهایی می تواند بیان ژن پروتئین BAX را کاهش داده و از آپوپتوز سلول های مغزی جلوگیری کند. در این راستا در تحقیقی دیگر نشان داده شد که مصرف ویتامین C می تواند نسبت پروتئین های BAX/BCL-2 را تعدیل کند. در این تحقیق نعمت الهی و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی تأثیر ویتامین C بر آپوپتوز و نسبت پروتئین های BAX/BCL-2 در لئوسیت های خون محیطی بیماران طی اقدامات مداخله ای قلبی پرداختند. این محققان نشان دادند که ممکن است ویتامین C بیان پروتئین های BAX و BCL-2 را در حفظ لئوسیت های خون محیطی در بیماران تحت درمان قلبی در آپوپتوز ناشی از تشعشع، تعدیل کند [۲۴]. با وجود تأثیرگذاری مکمل ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، نتایج این تأثیرگذاری در نتایج تحقیق حاضر مشاهده نشد و این با نتایج تحقیق نعمت الهی و همکاران متناقض است. در تحقیق حاضر مکمل ویتامین C به تنهایی تغییر معنی داری در بیان ژن پروتئین BAX نداشت و از طرفی دیگر بیان ژن پروتئین BCL-2 نیز کاهش یافت. این نشان می دهد که مصرف مکمل ویتامین C نمی تواند در شرایط هوای آلوده تأثیرگذاری قابل قبولی داشته باشد. البته شایان ذکر است که ایجاد آلودگی در تحقیق حاضر به صورت آزمایشگاهی بوده است که نسبت به شرایط آلودگی

- [3] Flores-Pajot MC, Ofner M, Do MT, Lavigne E, Villeneuve PJ. Childhood autism spectrum disorders and exposure to nitrogen dioxide, and particulate matter air pollution: a review and meta-analysis. *Environ Res* 2016; 151: 763-76.

- [4] Power MC, Adar SD, Yanosky JD, Weuve J. Exposure to air pollution as a potential contributor to cognitive function, cognitive decline, brain imaging, and dementia: a systematic review of epidemiologic research. *Neurotoxicol* 2016; 56: 235-53.

- [5] Clifford A, Lang L, Chen R, Anstey KJ, Seaton A. Exposure to air pollution and cognitive functioning across the life course—a systematic literature review. *Environ Res* 2016; 147: 383–98.
- [6] Chen H, Kwong JC, Copes R, Tu K, Villeneuve PJ, van Donkelaar A, et al. living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson’s disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study. *Lancet* 2017; 389(10070):718–726.
- [7] Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, et al. Association of Bax expression and Bcl2/Bax ratio with clinical and molecular prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *J Med Biochemistry* 2016; 35(2): 150.
- [8] Zhang Y, Yang X, Ge X, Zhang F. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 726-33.
- [9] Mahdavi S, Khodarahmi P, Roodbari NH. Effects of cadmium on Bcl-2/Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus. *Human Exp Toxicol* 2018; 37(3):321-8.
- [10] Bos I, De Boever P, Int Panis L, Meeusen R. Physical activity, air pollution and the brain. *Sports Med* 2014; 44(11):1505-18.
- [11] Erickson KI, Weinstein AM, Lopez OL. Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer’s disease. *Arch Med Res* 2012; 43(8):615–21.
- [12] Song SH, Jee YS, Ko IG, Lee SW, Sim YJ, Kim DY, et al. Treadmill exercise and wheel exercise improve motor function by suppressing apoptotic neuronal cell death in brain inflammation rats. *J Exerc Rehabil* 2018; 14(6):911-919.
- [13] Gangwar RS, Bevan GH, Palanivel R, Das L, Rajagopalan S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol* 2020; 34: 101545.
- [14] Eatemady-Boroujeni A, Kargarfard M, Alaei H. The effects of aerobic training in polluted air and vitamin c supplementation on serum levels of endothelin-1 and nitric oxide in wistar rats. *JIMS* 2020; 38(576):339-46.
- [15] Eatemadyboroujeni A, Kargarfard M, Alaei H. Can vitamin C supplementation reverse the effects of exercise training in polluted air on oxidative stress markers? A randomized controlled trial. *ARYA Atherosclerosis* 2021; 17(1): 1.
- [16] Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-De-Castro R. A Program of Moderate Physical Training for Wistar Rats Based on Maximal Oxygen Consumption. *J Strength Conditioning Res* 2007; 21(3): 751.
- [17] Nematbakhsh M, Pezeshki Z, Eshraghi-Jazi F, Ashrafi F, Nasri H, Talebi A, et al. Vitamin E, vitamin C, or losartan is not nephroprotectant against cisplatin-induced nephrotoxicity in presence of estrogen in ovariectomized rat model. *Int J Nephrol* 2012; 2012: 121-8.
- [18] Shamsaei N, Rajabi H, Aboutaleb N, Nikbakht F, Motamedi P, Khaksari M, et al. Effects of exercise pre-conditioning on hippocampus expression of Bcl-2 and bax protein and apoptosis following ischemia/reperfusion injury in male rats. *J Knowl Health* 2015; 10(2): 24-32.
- [19] Huang X, Shi X, Zhou J, Li S, Zhang L, Zhao H, et al. The activation of antioxidant and apoptosis pathways involved in damage of human proximal tubule epithelial cells by PM 2.5 exposure. *Envir Sci Eur* 2020; 32(1):1-3.
- [20] Zhang T, Zheng X, Wang X, Zhao H, Wang T, Zhang H, et al. Maternal exposure to PM2. 5 during pregnancy induces impaired development of cerebral cortex in mice offspring. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1): 257.
- [21] Mahdavi Lafmejani S, Khodarahmi P, Hayati Rodbari N. Effects of intraperitoneal administration of cadmium on apoptotic Bcl-2 and Bax genes expression in rat hippocampal cells. *J Genetics* 2017; 12(1): 81-89.
- [22] Kanbara H, Shahrooz R, Shalizer JA, Razi M. Efficacy of vitamin C against oxidative damages and apoptosis in hepatocytes of mice treated with phenylhydrazine. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2016; 17 (6): 62-72.
- [23] Kermanian F, Mehdizadeh M, Nourmohammadi I. Effects of vitamin C supplementation on lead-induced apoptosis in adult rat hippocampus. *Neural Regen Res* 2010; 5(5):364-7.
- [24] Nematollahi H, Gh H, Jorat MV. The Effect of Vitamin C on Apoptosis and Bax/Bcl-2 Proteins Ratio in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients during Cardiac Interventional Procedures. *JBPE* 2020; 10(4): 421.