

B متصل به پروتئین X (BCL2 Associated X) Bax در بافت کلیه موش های صحرایی مبتلا به دیابت گردید (۸). در مطالعه ای نیز محققین نشان دادند که انجام فعالیت ورزشی به مدت هشت هفته با سرعت ۲۷ متر بر دقیقه با مدت زمان ۱۶ دقیقه منجر به افزایش بیان miR-21 در بافت کلیه موش های صحرایی در معرض Cd گردید (۹).

علاوه بر فعالیت های ورزشی، اعتقاد بر این است که استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی در رژیم غذایی می تواند نقش ویژه و حیاتی در حفظ سلامت و مقابله با عوامل بیماری زا داشته باشد؛ از بین آنتی اکسیدان های غذایی موجود، گالیک اسید (GA (Gallic Acid که به وفور در گیاهانی همچون گردو، سماق، برگ چای و پوست درخت بلوط یافت می شود؛ توجه محققین را به خواص خود جلب کرده است (۱۰). به نظر می رسد GA به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی، کاهش گونه های فعال اکسیژن، کاهش عوامل التهابی، فعال سازی اتوفاژی، افزایش BCL-2 و کاهش Bax نقش مهمی در حفظ هموستاز سلول دارد. علاوه بر این به نظر می رسد GA با مکانیسم مهار گونه های فعال اکسیژن و خنثی سازی رادیکال های آزاد به طور مستقیم می تواند منجر به مهار کاسپاز ۳، افزایش بیان miR-125b شود (۱۱). مطالعات روی مدل های حیوانی نشان داده اند که گالیک اسید می تواند اثرات سمی کادمیوم را از طریق مهار استرس اکسیداتیو، کاهش نشانگرهای التهابی و تضعیف شاخص های استرس اکسیداتیو لندوپلاسمیک کاهش دهد (۱۲). از لحاظ تأثیر بر آپوپتوز، شواهد نشان می دهد که GA با تعدیل نسبت Bax/Bcl-2، کاهش آزادسازی سیتوکروم C و کاهش سطح کاسپاز ۳ فعال، مرگ برنامه ریزی شده سلولی را مهار می کند و بدین ترتیب نقش محافظتی در بافت کلیه دارد (۱۳).

همچنین GA قادر است پروفایل میکروRNA های کلیوی را تغییر دهد؛ برای مثال GA در مدل دیابتی بیان میکروRNA های بیماری زا را تعدیل و از طریق مسیر miR-Nrf2 تأثیر حفاظتی اعمال کرده است (۱۴). اطلاعات حاکی از این است که GA در بافت تومور کشت شده در سینه می تواند متفاوت عمل کند و این آنتی اکسیدان با القا آپوپتوز از مسیر فعال سازی استرس اکسیداتیو، افزایش کاسپاز ۳ و کاهش Bcl-2 می تواند منجر به القا آپوپتوز به تومور در موش های آزمایشگاهی مبتلا به سرطان سینه شود (۱۵).

با وجود بررسی ها با توجه به نیاز روزافزون به ارلنه های راهکار درمانی مؤثر که بتواند در زمان های کوتاه تر از بروز بیماری های ناشی از آلودگی های زیست محیطی پیشگیری نماید ضروری به نظر می رسد. علی رغم بررسی ها مطالعات محدودی در ارتباط با نقش ترکیبی تمرینات ورزشی و GA بر سلامت کلیوی در شرایط مواجهه با آلودگی های زیست محیطی وجود داشت. به گونه ای که در ارتباط با

لیزوزوم ها متالوتئین تجزیه و یون Cd^{2+} آزاد می شود؛ سپس Cd آزاد موجب آسیب مستقیم میتوکندری و القای استرس اکسیداتیو بافتی می شود (۲). تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen spaces) ROS و اختلال در سیستم های آنتی اکسیدان سلولی باعث پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب پروتئینی و DNA می شود که در ادامه به نقص عملکرد میتوکندری، نشت سیتوکروم C، فعال شدن کاسپازها (از جمله کاسپاز ۳) و مسیرهای فعال سازی آپوپتوز منجر می گردد (۳). علاوه بر این، کاسپاز-۳ نقش اجرایی در آپوپتوز کلیوی دارد و فعال شدن آن نشانگر مرگ برنامه ریزی شده اپیتلیال توبولی است؛ اما miR-21 با هدف گذاری ژن های پروآپتوتیک می تواند منجر به کاهش بیان کاسپاز ۳ و در نهایت آپوپتوز شود (۴). اطلاعات نشان می دهد که miR-21 با فعال سازی پروتئین کیناز A (Protein kinase A) AKT می تواند نقش محافظتی در برابر آپوپتوز ایفا کند و منجر به توقف آپوپتوز شود (۵).

از سویی با توجه به نیاز به ارائه راهکارهای درمانی و پیشگیری از آسیب های جسمی، اعتقاد بر این است که انجام فعالیت های بدنی منظم می تواند اثرات مطلوبی بر سلامت داشته باشد. به گونه ای که ورزش منظم می تواند منجر به بهبود عملکرد کلیه ها شود. اعتقاد بر این است که فعالیت های ورزشی با فعال سازی رونویسی از آنتی اکسیدان های آنزیمی، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام می تواند در مهار آپوپتوز کلیوی نقش مهمی داشته باشد (۶) به طوری که در مطالعه ای نشان دادند، انجام ورزش هوازی به مدت هشت هفته منجر به کاهش بیان پروتئین های آپوپتوزی بافت کلیه متعاقب قرار گرفتن در معرض دوکسوروبیسین گردید (۶).

اشاره شده است که ورزش منظم و با شدت متوسط می تواند با فعال سازی پروتئین هسته ای رونویسی ۲ (Nuclear respiratory factor 2) NRF2 منجر به رونویسی از آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD (Superoxide dismutase)، کاتالاز و گلو تاتیون پراکسیداز شود و از این مسیر در مهار و کاهش تبدیل کاسپاز ۹ به کاسپاز های زیر دست مانند کاسپاز ۳ و ۸ شود (۷). در این زمینه محققین نشان دادند که ۷ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط منجر به بهبود شاخص های گلاسمیک، آنزیم کراتینین، بهبود اوره نیتروژن خون (BUN (Blood Urea Nitrogen)، کاهش کاسپاز ۳، افزایش SOD در بافت کلیه موش های آزمایشگاهی مبتلا به دیابت گردید (۷).

در مطالعه ای دیگر محققین نشان دادند که ورزش هوازی با شدت ۵۰ تا ۵۵ درصد سرعت بیشینه منجر به کاهش بیان کاسپاز ۳، افزایش پروتئین ضد آپوپتوزی خانواده لنفوم B (B-cell leukemia/lymphoma 2 protein) BCL-2 و کاهش پروتئین لنفوم

دریافت کنند. دوز انتخاب شده مطابق مطالعات معتبر، ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود (۱۶).

آماده سازی و تجویز گالیک اسید

گالیک اسید با کد ۲۷۶۴۵ از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. مکمل مورد نیاز روزانه بر اساس دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محاسبه و در محلول طعم دهنده غذا و آب آشامیدنی حل شد و به صورت خوراکی به حیوانات داده شد (۱۷).

پروتکل تمرین هوازی

ابتدا موش های صحرایی مبتلا به سرطان پروستات به مدت یک هفته با نوار گردان ویژه موش های صحرایی و تمرینات ورزشی آشنا شدند. آشنا سازی بدین صورت خواهد بود که موش های صحرایی در مدت زمان این یک هفته، روزانه ۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه بر روی نوارگردان بدون شیب دویدند. در ادامه بر اساس مطالعه McCullough و همکاران، موش های صحرایی روزانه ۶۰ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در شیب ۱۵ درجه دویدند. این نکته قابل ذکر است که تمرینات برای مدت هشت هفته و هفته ای سه جلسه انجام شد. همچنین برای رعایت اصل اضافه بار تمرینات در هفته اول تا چهارم ۳۰ دقیقه بود و از هفته چهارم تا هشتم زمان به ۶۰ دقیقه رسید (۱۸).

تشریح نمونه ها

دو روز پس از آخرین جلسه تمرین و مکمل دهی، حیوانات پس از ۱۲ ساعت ناشتایی با ترکیب کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بی هوش شدند. بی هوشی با آزمون رفلکس درد و لمس ارزیابی شد. پس از اطمینان از بی دردی، شکم حیوان باز و کلیه راست پس از جداسازی بافت های اطراف برداشت شد. نمونه ها شسته شده، در میکروتیوب منتقل و بلافاصله در ایزت مایع منجمد و تا زمان سنجش در دمای -۷۰ درجه ذخیره شدند.

اندازه گیری متغیرهای مولکولی

برای این منظور ابتدا RNA تام از بافت کلیه مطابق دستورالعمل کیت استخراج RNA شرکت سیناژن ایران جداسازی شد و غلظت و خلوص نمونه ها با جذب سنجی در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. سپس سنتز cDNA بر اساس پروتکل کیت مربوطه انجام گرفت. بیان ژن های کاسپاز ۳ و miR-21 با روش ریل تایم PCR کمی (qRT-PCR) اندازه گیری شد. تحلیل داده های بیان ژن از طریق معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ صورت گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

روش های آماری

نرمال بودن توزیع داده ها با آزمون Shapiro-Wilk و همگنی واریانس ها با آزمون Leven بررسی شد. برای بررسی اثر تزریق حلال گالیک اسید و تزریق بین گروه های C، Cd و Sham از آزمون آنالیز واریانس یک راه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. همچنین در

اثر همزمان تمرین تناوبی شدید و GA محققین نشان داده اند که تعامل این دو منجر به بهبود نشانگرهای اتوفاژی در بافت کلیه موش های صحرایی در معرض Cd می گردد (۱۰). لذا با توجه به اهمیت ارثه روش های پیشگیری کارا برای حفظ سلامت کلیه مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مصرف گالیک اسید بر تغییرات کاسپاز ۳ و miR-21 در بافت کلیه موش های صحرایی در معرض کادمیوم انجام شد.

روش ها

تهیه و نگهداری حیوانات

این مطالعه به صورت تجربی و با طرح پس آزمون همراه با گروه کنترل اجرا شد. برای انجام پژوهش، ۴۲ سر موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ-داولی با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۲۷۰ گرم و سن حدود هشت تا نه ماه از مرکز حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور تهیه شدند. انتخاب تعداد نمونه بر اساس شواهد مطالعات پیشین در حوزه مشابه انجام گرفت که در آن ها برای هر گروه هفت حیوان استفاده شده بود؛ بنابراین برای تشکیل شش گروه آزمایشی، ۴۲ حیوان وارد مطالعه شدند. پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی مرکز تحقیقات بیتاران، یک دوره هفت روزه سازگاری با محیط برای آن ها در نظر گرفته شد. تمامی مراحل کار با حیوانات مطابق با اصول بین المللی اخلاق زیستی و تحت نظارت کمیته اخلاق پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک با کد مصوب IR.IAU.ARAK.1404.103 انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد شامل چرخه ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی، رطوبت نسبی حدود ۵۵ درصد، دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد و در قفس های پلی کربناتی قابل شست و شو با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه نگهداری شدند.

گروه بندی حیوانات

در روز هشتم، حیوانات به صورت تصادفی به شش گروه تخصیص یافتند: گروه کنترل سالم (C)، گروه دریافت کننده کادمیوم (Cd)، گروه دریافت کادمیوم + حلال گالیک اسید (Sham)، گروه دریافت کادمیوم همراه با گالیک اسید (Cd+GA)، گروه مواجهه با کادمیوم همراه با تمرین هوازی (Cd+AT) و گروه دریافت همزمان کادمیوم، تمرین هوازی و گالیک اسید (Cd+AT+GA) در هر گروه ۷ حیوان قرار گرفتند.

آماده سازی محلول کادمیوم

نمک کادمیوم کلراید مورد نیاز مطالعه از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شد. بر اساس وزن حیوانات و دوز هدف، ۳۵ میلی گرم از ترکیب در حجم آب آشامیدنی روزانه گروه ها حل شد تا حیوانات، کادمیوم را به صورت خوراکی و در قالب آب مصرفی

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر

اندازه (bp)	توالی‌های آغازگر	ژن‌ها
98	Forward: 5'- AGCTTGAACGCGAAGAA -3' Reverse: 5'- GCTTCCATGGATAGTCTTTGTTTC-3'	Caspase 3
147	Forward: 5'- GCGGGGTCATGAAATCCAGT-3' Reverse: 5'- AGTGATGTGGGGACAAAACGA -3'	TBP
	Forward: GCCGCGTAGCTTATCAGACT Reverse: CTCAACTGGTGTCTGTGGA	miR-21
	Forward: CTCGCTTCGGCAGCACA Reverse: AACGCTTCACGAATTTGCGT	U6

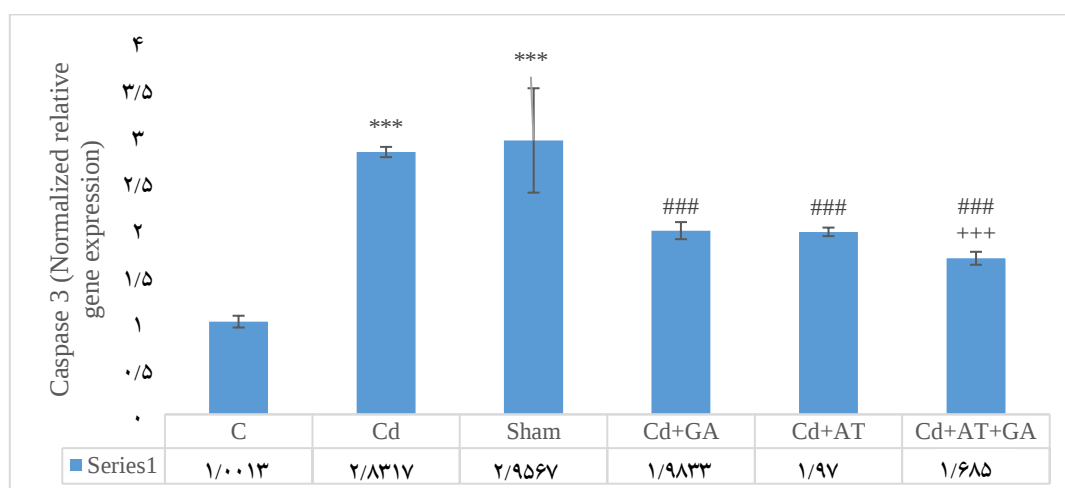
(۱/۹۷) و گالیک اسید (۱/۹۸) دارای اثر تعاملی در کاهش بیان کاسپاز ۳ بود ($P = 0/001$, $F_{102/2} = 10/837$ و اندازه اثر ۰/۸۳۷). به عبارتی با توجه به نتایج اسید گالیک تا حدودی توانست منجر به تعدیل اثر تمرین در کاهش بیان کاسپاز ۳ شود اما در نهایت این دو می‌توانند دارای اثر تعاملی در کاهش بیان ژنی کاسپاز ۳ شوند (شکل ۱).

نتایج نشان داد مقادیر مقادیر miR-21 در گروه Cd ($P = 0/001$) و Sham ($P = 0/001$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه C بود. همچنین عامل تمرین ($P = 0/001$, $F = 151/83$ و اندازه اثر ۰/۸۸) و مکمل گالیک اسید ($P = 0/001$, $F = 171/63$ و اندازه اثر ۰/۸۹) اثر معنی‌داری بر افزایش بیان miR-21 می‌باشند. همچنین تمرین و گالیک اسید دارای اثر تعاملی در افزایش بیان ژنی miR-21 می‌باشند ($P = 0/001$, $F = 28/40$ و اندازه اثر ۰/۵۸). علاوه بر این با توجه به اینکه گروه ترکیبی تمرین گالیک اسید دارای بیشترین مقدار بیان ژنی miR-21 (۰/۶۷) نسبت به گروه گالیک اسید (۰/۳۷) و تمرین (۰/۳۶) می‌باشد؛ بنابراین اگرچه تمرین تا حدی منجر به مهار اثر گالیک اسید در افزایش miR-21 می‌شود، اما این دو مداخله هنوز دارای اثر تعاملی در افزایش بیان ژنی miR-21 می‌باشند (شکل ۲).

ادامه برای بررسی اثر اصلی تمرین، مصرف گالیک اسید و اثر تعاملی آنها از آزمون آنالیز واریانس دو راهه استفاده شد. علاوه بر این برای بررسی نوع اثر متغیرهای مستقل بر وابسته از آزمون تعقیبی Bonferoni استفاده شد. تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام گرفت.

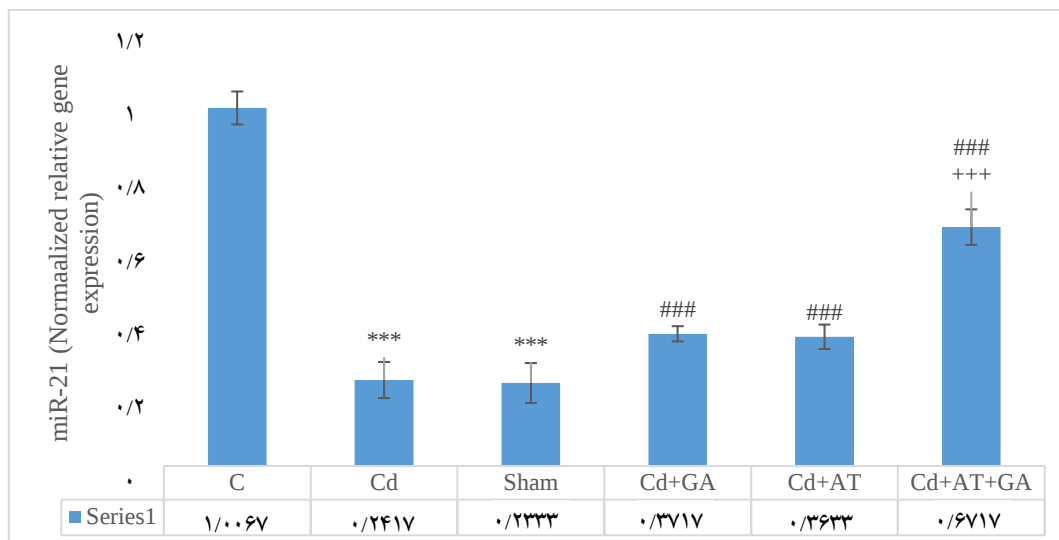
یافته‌ها

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر کاسپاز ۳ ($P = 0/001$, $F = 26/48$) و miR-21 ($P = 0/001$, $F = 451/08$) در گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد. به عبارتی مقادیر کاسپاز ۳ در گروه Cd ($P = 0/001$) و Sham ($P = 0/001$) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه C بود. در ادامه نتایج آزمون آنالیز واریانس دو راهه نشان داد عامل تمرین ($P = 0/001$, $F = 435/15$) و اندازه اثر ۰/۹۵۶ و مکمل گالیک اسید ($P = 0/001$, $F = 415/37$) و اندازه اثر ۰/۹۵۴ اثر معنی‌داری در کاهش بیان کاسپاز ۳ داشت. همچنین تمرین و گالیک اسید با اندازه (۱/۶۸) نسبت به تمرین



شکل ۱. مقادیر بیان ژنی کاسپاز ۳ در بافت کلیه در موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

***: افزایش معنی‌دار نسبت به گروه C; ###: کاهش معنی‌دار نسبت به گروه Cd تمرین و عدم دریافت مکمل; +++: کاهش معنی‌دار نسبت به گروه Cd+AT و Cd+GA. اسید گالیک تا حدودی توانست منجر به تعدیل اثر تمرین در کاهش بیان کاسپاز ۳ شود اما در نهایت این دو می‌توانند دارای اثر تعاملی در کاهش بیان کاسپاز ۳ شوند.



شکل ۲. مقادیر بیان ژنی miR-21 در بافت کلیه در موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

*** (P = 0/001): کاهش معنی‌دار نسبت به گروه C: ### (P = 0/001): افزایش معنی‌دار نسبت به گروه‌های عدم تمرین و عدم مصرف مکمل: +++ (P = 0/001): افزایش معنی‌دار نسبت به گروه Cd+AT و Cd+GA. اگرچه تمرین تا حدی منجر به مهار اثر گالیک اسید در افزایش miR-21 می‌شود، اما این دو مداخله هنوز دارای اثر تعاملی در افزایش بیان ژنی miR-21 می‌باشند.

است. از سویی به نظر می‌رسد کاهش مقادیر کاسپاز ۳ و افزایش مقادیر miR-21 نسبت به گروه‌های عدم تمرین در گروه‌های تمرین نشان دهنده‌ی اثرات مهار سیگنالینگ آپوپتوز سلول‌های کلیوی می‌باشد؛ همسو با مطالعه‌ی حاضر محققین نشان دادند که هشت هفته تمرین AT با شدت متوسط منجر به کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و ۸ در کلیه شد و آسیب اکسیداتیو و التهاب در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت گردید (۷).

همچنین مطالعه‌ای نشان داد تمرین AT قبل از ایسکمی ریپرفیوژن منجر به کاهش چشمگیر کاسپاز ۳ فعال، کاهش آسیب توبولی و بهبود عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی شد (۲۲). همچنین مطالعه‌ای نشان داد که تمرین منظم می‌تواند به تعدیل و تنظیم miR-21 در راستای بهبود مسیر بقا سلولی و کاهش آپوپتوز منجر شود (۲۳). ناهمسو با مطالعه‌ی حاضر در شرایطی که شدت یا حجم تمرین بسیار بالا بود متفاوت بوده است، ورزش باعث افزایش استرس اکسیداتیو، افزایش کاسپاز ۳، کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها شد. اما تمرین تداومی با شدت متوسط اثر متفاوت و متضادی بر این نشانگرها داشت (۲۴) این در حالی است که در ارتباط با تغییر miR-21 و کاهش بیان آن متعاقب تمرینات ورزشی شواهد زیادی در دسترس نیست. به طور کلی به نظر می‌رسد ورزش منظم می‌تواند با تنظیم هموستاز آنتی‌اکسیدانی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود؛ در نتیجه کاهش گونه‌های فعال اکسیژن منجر به مهار رهاش سیتوکروم C از میتوکندری، مهار تجزیه کاسپاز ۹ به کاسپاز ۳ و در نهایت کاهش آپوپتوز می‌شود (۲۵) علاوه بر این به نظر می‌رسد ورزش با تحریک و کمک به رونویسی از ژن‌ها و

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد در گروه Cd مقادیر کاسپاز ۳ به طور معنی‌داری بیشتر و مقادیر miR-21 به طور معنی‌داری کمتر از گروه C بود. اما در گروه‌های تمرین مقادیر کاسپاز ۳ به طور معنی‌داری کمتر و مقادیر miR-21 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه عدم تمرین بود. اعتقاد بر این است که Cd به دلیل پذیرنده بودن الکترون به عنوان یک رادیکال آزاد شناخته می‌شود که دارای تمایل پیوند با لیپیدها و پروتئین‌های ساختاری است و می‌تواند به عنوان یک عامل اکسایشی منجر به فعال‌سازی پروتئین‌های مسئول آپوپتوز از جمله کاسپازها شود؛ به عبارتی Cd با فعال‌سازی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)) منجر به تجزیه کاسپاز ۹ به کاسپاز اجرایی ۳ می‌شود و از این طریق منجر به راه‌اندازی آپوپتوز از مسیر خارج میتوکندریایی می‌شود (۱۹).

علاوه بر این از آنجا که در برخی از مطالعات اشاره شده است که miR-21 با هدف قرار دادن مسیر فسفاتیدیل ۳، ۴، ۵-تری فسفات فسفاتاز Akt/(PTEN) می‌تواند مسیر بیان ژنی پروتئین‌های آپوپتوزی را مهار کند؛ کاهش miR-21 واکنشی است که با افزایش ریسک آپوپتوز در سلول همراه است (۲۰). این در حالی است که مطالعه‌ی حاضر نشان داده است در گروه Cd مقادیر miR-21 حتی از گروه HC نیز به طور معنی‌داری کمتر است. اما بررسی‌های دیگر نشان می‌دهند که بیان بیش از اندازه این miR در شرایط بیماری نیز می‌تواند روند آپوپتوز را افزایش دهد (۲۱). بنابراین یافتن هدف و اندازه تغییر نسبت به گروه‌های کنترل از دلایل احتمالی تفاوت در نتایج مطالعات

همچنین نتایج نشان داد تمرین و اسید گالیک دارای اثر تعاملی در کاهش کاسپاز ۳ و افزایش مقادیر miR-21 می‌باشند. به گونه‌ای که اگرچه تمرین و گالیک اسید تا حدی اثر یکدیگر را تعدیل می‌کنند اما هنوز این دو (ترکیب تمرین و اسید گالیک) دارای اثر تعاملی در کاهش کاسپاز ۳ و افزایش miR21 می‌باشند. به نظر می‌رسد تمرین و گالیک اسید به طور هم‌زمان می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی متقابل ایجاد کند؛ برای مثال مطالعاتی در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که ترکیب GA و برنامه‌ی تمرینی باعث بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و بافت، کاهش مالون دی‌لئوئید (MDA (Malondialdehyde) و بهبود عملکرد رفتاری/عصبی گردید (۳۱، ۳۲).

همچنین ترکیب ورزش و GA موجب کاهش بیان نشانگرهای آپوپتوز از جمله کاسپاز ۳ در بافت قلب موش‌های صحرایی گردید (۳۲). به نظر می‌رسد این دو مداخله می‌توانند از مسیرهای کاهش ROS، فعال‌سازی محور PI3K/AKT/NRF2، افزایش بیان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، سرکوب PTEN شود و در نهایت منجر به مهار کاسپاز ۳، ۹ و تعدیل بیان miR-21 در بافت کلیه شوند (۲۰، ۲۳، ۲۸، ۲۹). از سویی شواهد حاکی از این است که اسید گالیک می‌تواند مسیرهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری را فعال و بیان caspase-3 را تحت شرایط سلولی افزایش دهد که نشان‌دهنده‌ی نقش مستقیم آن در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده است (۳۳) اما تمرین نیز به‌طور مستقل می‌تواند تنظیم‌کننده miR-21 باشد و از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی ژنی اثرات بیولوژیک نشان دهد (۳۴)، بنابراین اسید گالیک ممکن است با تعدیل مسیرهای آپوپتوزی اثر تمرین را در کاهش caspase-3 تقویت کند، و تمرین نیز با تنظیم پاسخ سلولی مسیرهای miRNA اثرات گالیک اسید را در افزایش miR-21 تعدیل کند، اما در مجموع این دو مداخله می‌توانند هم‌افزا در کنترل بیان ژنی باشند. با توجه به اهمیت مسیرهای GRP78/ATF6/IRE1، PTEN/AKT و NRF2 در مهار یا فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی، عدم ارزیابی این مسیرها از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی مسیرهای پایین دست و بالا دستی بیشتری ارزیابی شوند. با توجه به اهمیت بررسی بافتی برای اطمینان از نتایج، عدم ارزیابی میزان آپوپتوز به روش تانل یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر بود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی روش‌های بررسی بافتی مختلف جهت اطمینان از نتایج مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تمرین، گالیک اسید و ترکیب آنها می‌توانند به طور مشخص با کاهش بیان کاسپاز ۳ و تعدیل miR-21 در کاهش آپوپتوز

miRهای دخیل در متابولیسم و چرخه‌ی سلول موجب فعال‌سازی مسیر PI3K/AKT می‌شود و این امر با تعدیل و تنظیم افزایشی miR-21 منجر به مهار مسیر پای پیش آپوپتوزی می‌شود (۲۰، ۲۵، ۲۶).

همچنین در گروه‌های مصرف اسید گالیک مقادیر کاسپاز ۳ به طور معنی‌داری کمتر و مقادیر miR-21 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه عدم مصرف مکمل بود. شواهد آزمایشگاهی و حیوانی حاکی از آن بود که گالیک اسید به‌عنوان یک فنولیک قدرتمند آنتی‌اکسیدانی قادر است شاخص‌های عملکردی و مورفولوژیک کلیه را در مدل‌های مختلف در معرض سموم بهبود دهد؛ به‌عنوان نمونه، در مدل سمیت ناشی از سیس‌پلاتین، گالیک اسید موجب کاهش نشانگرهای آسیب کلیوی، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و تعدیل بیان کاسپاز ۳ گردید (۲۷).

همچنین در یک مدل سمیت آلومینیوم نیز گالیک اسید همراه با هسپریدین موجب افزایش فعالیت ATPase و کاهش کاسپاز ۳ شد (۲۸). افزون بر این، در مدل‌های مربوط به سمیت کادمیوم و آسیب کبدی، شواهد نشان می‌دهد که گالیک اسید با سرکوب استرس اکسیداتیو منجر به کاهش نسبت Bax/Bcl-2 و کاهش کاسپاز ۳ گردید (۱۲). از سوی دیگر، چند مطالعه نشان داده‌اند که تأثیر گالیک بر میکروRNAها پیچیده است؛ برای مثال در مدل فیروز کبدی، گالیک اسید بیان miR-21 را کاهش داد و از طریق مهار مسیر عامل پس ترجمه‌ای رشد بتا/پروتئین‌های خانواده SMAD با زیر واحد ۳ (TGF-β1/Smad) اثر ضد فیروزی اعمال کرد (۲۹)؛ در حالی که دوزهای متفاوت گالیک اسید می‌تواند اثرات متفاوتی بر miRNAها به ویژه miR-21 داشته باشند و حتی در مدل‌های سرطانی به عنوان یک miR پیش آپوپتوزی عمل کند (۳۰). بنابراین ناهم‌خوانی‌های ظاهری میان مطالعات را می‌توان به تفاوت در بافت هدف، تفاوت در دوز مصرفی گالیک اسید و تفاوت در مدت مواجهه با سموم زیست محیطی اشاره نسبت داد. اما به طور کلی به نظر می‌رسد گالیک اسید از طریق تقویت و فعال‌سازی مسیر رونویسی از آنتی‌اکسیدان‌ها به واسطه افزایش بیان NRF2 و در نتیجه افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داد که منجر به مهار آپوپتوز می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد این آنتی‌اکسیدان با توانایی باقوه در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌تواند منجر به مهار رهائش سیتوکروم C- از دیواره میتوکندری شود و در نهایت آپوپتوز را مهار کند. علاوه بر این گالیک اسید با کاهش استرس اکسیداتیو برون سلولی و مهار محور GRP78/ATF6/IRE1 منجر به مهار کاسپازهای ۳ و ۹، کاهش نسبت Bax/BCL-2 می‌شود (۱۲، ۲۹). علاوه بر این گالیک اسید از طریق اثر گذاری بر محور TGF-β/NF-κB/Smad منجر به مهار مسیر PTEN/AKT شده و در نتیجه با تعدیل miR-21 منجر به مهار آپوپتوز می‌شود (۱۲، ۲۷-۲۹).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه همکاری داشتند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

بافتی اثرگذار باشند. هر چند با توجه به نقش‌های متفاوت miR-21 بررسی‌های بیشتری مورد نیاز است.

References

1. Yan LJ, Allen DC. Cadmium-induced kidney injury: oxidative damage as a unifying mechanism. *Biomolecules* 2021; 11(11): 1575.
2. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39(1): 267–94.
3. Thévenod F, Lee WK. Live and let die: roles of autophagy in cadmium nephrotoxicity. *Toxics* 2015; 3(2): 130–51.
4. Song N, Zhang T, Xu X, Lu Z, Yu X, Fang Y, et al. miR-21 protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by preventing epithelial cell apoptosis and inhibiting dendritic cell maturation. *Front Physiol* 2018; 9: 790.
5. Huang R, Ding L, Ye Y, Wang K, Yu W, Yan B, et al. Protective effect of quercetin on cadmium-induced renal apoptosis through cyt-c/caspase-9/caspase-3 signaling pathway. *Front Pharmacol* 2022; 13: 990993.
6. Davari F, Alimanesh Z, Alimanesh Z, Salehi O, Hosseini SA. Effect of training and crocin supplementation on mitochondrial biogenesis and redox-sensitive transcription factors in liver tissue of type 2 diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 2022; 128(5): 1215–20.
7. Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere CB, et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(4): F700–F708.
8. Azizi S, Saghebjo M, Mohiti- Ardakani J. Reducing effects of aerobic exercise training combined with berberine chloride supplementation on the apoptotic markers of kidney in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Middle East J Rehabil Health Stud* 2019; 6(4): e96483.
9. Delshad A, Salimi F, Valipour S. The effect of physical activity along with the consumption of hydroalcoholic extract of date pollen on the expression of some microRNAs in cadmium-induced toxicity in rat kidney tissue [in Persian]. *Med J Tabriz Uni Med Sci* 2024; 46(2): 165–74.
10. Zarei M, Hematfar A, Hosseini S A, Sameni A. The effects of eight weeks of high-intensity interval training and gallic acid supplementation on mTORC1 and ULK1 gene expression in the kidney tissue of cadmium-exposed rats [in Persian]. *Feyz Med Sci J* 2025; 29(4): 303–15.
11. Zahedi F, Kowsar R, Khodabandeh Z, Dara M, Alaei S. Protective effects of gallic acid against lead acetate-induced toxicity in mice ovary: focus on apoptosis, inflammation, and folliculogenesis. *Food Sci Nutr* 2025; 13(7): e70638.
12. Gelen V, Sengul E, Yildirim S, Cinar I. The role of GRP78/ATF6/IRE1 and caspase-3/Bax/Bcl2 signaling pathways in the protective effects of gallic acid against cadmium-induced liver damage in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2023; 26(11): 1326–33.
13. Alhazmi AI, El-Refaei MF, Abdallah EA. Protective effects of gallic acid against nickel-induced kidney injury: impact of antioxidants and transcription factor on the incidence of nephrotoxicity. *Ren Fail* 2024; 46(1): 2344656.
14. Lee AT, Yang MY, Tsai IN, Chang YC, Hung TW, Wang CJ. Gallic acid alleviates glucolipotoxicity-induced nephropathy by miR-709-NFE2L2 pathway in db/db mice on a high-fat diet. *J Agric Food Chem* 2024; 72(41): 22645–60.
15. Moghtaderi H, Sepehri H, Delphi L, Attari F. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *Bioimpacts* 2018; 8(3): 185–94.
16. Momeni L, Fathi Moghadam H, Hosseini S, Nikbakht M. Interactive effects of endurance training and selenium consumption on the intrinsic apoptosis pathway in the liver tissue of cadmium-exposed rats. *J Nutr Sci & Diet* 2020; 5(3–4).
17. Ojo AO, Rotimi DE, Ojo AB, Ogunlakin AD, Ajiboye BO. Gallic acid abates cadmium chloride toxicity via alteration of neurotransmitters and modulation of inflammatory markers in Wistar rats. *Sci Rep* 2023; 13(1): 1577.
18. McCullough DJ, Nguyen LMD, Siemann DW, Behnke BJ. Effects of exercise training on tumor hypoxia and vascular function in the rodent preclinical orthotopic prostate cancer model. *J Appl Physiol* 2013; 115(12): 1846–54.
19. Jiaxin S, Shengchen W, Yirong C, Shuting W, Shu L. Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils. *Fish Shellfish Immunol* 2020; 99: 284–90.
20. Mollajan E, Yazdani S, Ghasemzadeh M. miR-21 in cardiovascular disease: new insights and emerging therapeutic potential. *Discov Appl Sci* 2025; 7(5): 447.
21. Alipour Ghazichaki N, Torabi Pelet Kale G, Hosseini SA, Noori F, Fallah M, Abdi A, et al. Curcumin and aerobic training mitigate cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via miR-21 and miR-133 modulation in the rat hippocampus. *Neurol Res* 2026; 48(7): 941–56.
22. de Lima WV, Visona I, Schor S, Almeida WS. Preconditioning by aerobic exercise reduces acute ischemic renal injury in rats. *Physiol Rep* 2019; 7(14): e14176.

23. Improtia Caria AC, Vasques Nonaka CK, Pereira CS, Pereira Soares MB, Macambira SG, de Freitas Souza BS. Exercise training-induced changes in microRNAs: beneficial regulatory effects in hypertension, type 2 diabetes, and obesity. *Int J Mol Sci* 2018; 19(11): 3608.
24. Nazanin M, Tolouei-Azar J, Razi M. Running exercise training-induced impact on oxidative stress and mitochondria-related apoptosis in rat's testicles. *Andrologia* 2022; 54(9): e14520.
25. Afzal M, Greco F, Quinzi F, Scionti F, Maurotti S, Montalcini T, et al. The effect of physical activity/exercise on miRNA expression and function in non-communicable diseases—a systematic review. *Int J Mol Sci* 2024; 25(13): 6813.
26. Agahi MRH, Mosallanejad Z, Salehi OR. The effects of resistance training and spirulina on the performance of the antioxidant system with emphasis on mir125b, mir146a and cognitive function in stanazolol-induced neurotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2022; 366: 110112.
27. Eslamifar Z, Moridnia A, Sabbagh S, Ghaffaripour R, Jafaripour L, Behzadifard M. Ameliorative effects of Gallic acid on cisplatin-induced nephrotoxicity in rat variations of biochemistry, histopathology, and gene expression. *Biomed Res Int* 2021; 2021(1): 2195238.
28. Obafemi TO. Ameliorate Electrolyte Imbalances in AlCl₃-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *Biochem Res Int* 2022; 2022(1): 6151684.
29. Hussein RM, Anwar MM, Farghaly HS, Kandeil MA. Gallic acid and ferulic acid protect the liver from thioacetamide-induced fibrosis in rats via differential expression of miR-21, miR-30 and miR-200 and impact on TGF- β 1/Smad3 signaling. *Chem Biol Interact* 2020; 324: 109098.
30. Paolini A, Curti V, Pasi F, Mazzini G, Nano R, Capelli E. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. *Int J Oncol* 2015; 46(4): 1491–7.
31. Hajimoradi M, Fazilati M, Gharib-Naseri MK, Sarkaki A. Gallic acid and exercise training improve motor function, nerve conduction velocity but not pain sense reflex after experimental sciatic nerve crush in male rats. *Avicenna J Phytomed* 2015; 5(4): 288-97.
32. Akbari M, Moradi L, Alizadeh R, Abbasi Dalooi A. Investigating the effects of endurance training and gallic acid on Annexin-5 and caspase-3 of cardiac tissue in male wistar rats undergoing boldenone [in Persian]. *Complement Med J* 2018; 8(2): 2279–92.
33. Zhao XL, Cao ZJ, Li KD, Tang F, Xu LY, Zhang JN, et al. Gallic acid: A dietary metabolite's therapeutic potential in the management of atherosclerotic cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2025; 15: 1515172.
34. Vakili J, Ghale Gir S, Khani M, Azali Alamdari K. The effect of Eight Weeks High- Intensity Interval Training (HIIT) on the Expression of miRNA-21 and miRNA-1 in Diabetic Male Rats [in Persian]. *Pejouhesh dar Pezeshki* 2022; 46(4): 99-110.

The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training Combined with Gallic Acid Consumption on Changes in Caspase 3 and miR-21 in Kidney Tissue of Rats Exposed to Cadmium

Nase Nazari¹, Bahram Abedi², Abbas Mehranpour³

Original Article

Abstract

Background: Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal that can cause irreversible tissue damage, particularly in the kidneys. Although exercise and antioxidants have been reported to exert protective effects against renal disorders, the combined effects of aerobic training (AT) and gallic acid (GA) remain unclear. Therefore, this study investigated the effects of eight weeks of AT combined with GA supplementation on caspase-3 and miR-21 expression in the kidney tissue of Cd-exposed rats.

Methods: Forty-two male Sprague–Dawley rats (8–9 months old, 250–270 g) were randomly assigned to healthy control (HC), Cd, sham, Cd+GA, Cd+AT, and Cd+AT+GA groups. GA was administered orally at 20 mg/kg/day. The exercise groups performed treadmill running for eight weeks, three sessions/week, at 15 m/min and a 15° incline, with session duration progressively increased from 15 to 60 min. Data were analyzed using One-way ANOVA with Tukey's post hoc test and two-way ANOVA with Bonferroni correction.

Findings: Compared with HC, the Cd group showed higher caspase-3 and lower miR-21 expression ($P = 0.001$). Exercise and GA significantly reduced caspase-3 expression ($P = 0.001$), with a significant exercise×GA interaction ($P = 0.001$). Both exercise and GA significantly increased miR-21 expression ($P = 0.001$), with a significant interaction effect ($P = 0.001$).

Conclusion: Exercise and GA were associated with reduced caspase-3 and increased miR-21 expression in Cd-exposed rats, suggesting potential modulation of apoptotic responses.

Keywords: Aerobic exercise; Gallic acid; Apoptosis; Kidney; Cadmium

Citation: Nazari N, Abedi B, Mehranpour A. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training Combined with Gallic Acid Consumption on Changes in Caspase 3 and miR-21 in Kidney Tissue of Rats Exposed to Cadmium. J Isfahan Med Sch 2026; 44(872): 1375- 83.

1- Department of Sports Physiology, Maha.C., Islamic Azad University, Mahallat, Iran

2- Department of Physical Education, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Faculty of Physical Education, Tolo Mehr University of Qom, Qom, Iran

Corresponding Author: Bahram Abedi, Department of Physical Education, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: Bahram.Abedi@iau.ac.ir