

Original Article

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

Amir Delshad^{1*}, Fereshteh Salimi², Saeed Valipour²¹Department of Sports Physiology and Immunology, Faculty of Literature and Human Sciences, University of Qom, Qom, Iran²Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, University of Qom, Qom, Iran**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 6 May 2023

Accepted: 27 Jun 2023

ePublished: 20 Apr 2024

Keywords:

- Aerobic exercise
- Mir-21
- Mir-132
- Cadmium toxicity
- Date pollen extract
- Kidney

Abstract

Background. This study aims to determine the combined effect of physical activity and the hydroalcoholic extract of palm pollen on the expression of mir-21 and mir-132 in cadmium-induced toxicity in the kidney tissue of male rats.

Methods. In this study, 48 adult and healthy male Wistar rats with a weight range of 250 ± 30 grams and 12 weeks of age were randomly divided into 6 groups: 1) control, 2) exercise, 3) cadmium, 4) cadmium + exercise, 5) cadmium + palm 200 + exercise, 6) cadmium + exercise + palm 400. All groups received three milligrams per kilogram of body weight of cadmium chloride daily by gavage, and palm pollen extract was injected intraperitoneally with doses of 200 and 400 mg of body weight. Aerobic training started with rats running on a treadmill at a speed of 27 meters per minute for 16 minutes, and one minute was added to the training every day.

Results. The results showed that there is a significant difference in the expression of miR-21 between the groups ($P=0.001$), with cadmium causing a decrease and aerobic exercise and receiving palm pollen extract leading to a significant increase in the miR-21 gene expression ($P=0.005$). Also, there is a significant difference in the expression of miR-132 between the groups ($P=0.04$), indicating that cadmium decreased this variable when compared to the control; however, the combined effect of exercise and palm pollen administration was not statistically significant ($P=0.98$).

Conclusion. Our study showed that performing moderate-intensity regular exercise along with palm pollen in cadmium-treated mice upregulated microRNAs associated with kidney toxicity.

Practical Implications. The combined effect of the proposed herbal supplement and physical activity can control the harmful effects of exposure to cadmium on industrial societies and chemical industry workers to some extent.

How to cite this article: 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. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(2):165-174. doi: 10.34172/mj.2024.023. Persian.

Extended Abstract**Background**

By purifying the blood and controlling the balance of body fluids, the kidney regulates the

pressure and removes waste materials, helps the homeostasis of the immune system, and limits inflammation by removing circulating cytokines.

*Corresponding author; Email: Ah.delshad114@gmail.com; Ah_delshad@yahoo.com

© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Group 1 carcinogens, such as cadmium and its derivatives, are known to have harmful effects and directly impact cell surfaces. The kidney is one of the most vulnerable organs in cadmium poisoning. MicroRNAs are therapeutic targets since they play a role in almost all physiological and pathological processes, and their regulatory functions in gene expression play an essential role in various molecular processes in many organs, including the kidney. Both miR-21 and miR-132 play a role as oncogenes. Since palm pollen contains flavonoids, it is a powerful antioxidant. Enhancing the immune system with both palm pollen extract and exercise can be an effective treatment for chronic renal disease. Physiologically, physical activity causes various changes in the body depending on the components of the exercise such as type, time, duration, and intensity. Understanding the detrimental effects of cadmium on renal tissue and the potential preventive benefits of aerobic exercise and palm pollen is of significant importance. This study aims to investigate the effect of a period of aerobic training along with the consumption of hydroalcoholic extract of palm pollen on the expression of mir-132 and mir-21 genes in male rats' kidney tissue induced by cadmium chloride.

Methods

In this experimental study, 48 healthy adult male rats with a weight range of 250 ± 30 grams and an age of 12 weeks were examined. Mice were randomly divided into 6 groups: 1) control, 2) training, 3) cadmium chloride, 4) cadmium toxicity + exercise, 5) cadmium toxicity + date pollen 200 + exercise, and 6) cadmium toxicity + exercise + date pollen 400. In order to induce kidney damage, mice received cadmium chloride at a dose of 3 mg/kg body weight (diluted with distilled water) by gavage. Also, date pollen extract was injected intraperitoneally with doses of 200 and 400 mg/kg body weight. The aerobic exercise protocol consisted of rats running on a treadmill at a speed of 27 m/min. The exercise started with duration of 16 minutes, and one minute was added to the exercise every day. After 48 hours from the last exercise session, mice were dissected, and their kidney tissues were removed and stored in RNAlater®-ICE liquid

nitrogen (-85°C) until RNA isolation. For the biochemical analysis of mir-132 and mir-21 gene expression, the samples were transferred to the laboratory and measured by the RT-PCR method. The mean and standard deviation were used to test and analyze the data. First, the normality of the data distribution and the equality of variances were evaluated using the Shapiro-Wilk and Levin tests, respectively. Then, one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare changes between the groups, and then Bonferroni's post hoc test was used for comparison to determine the exact location of this difference ($P\geq 0.05$). All statistics were done using SPSS version 24 software.

Results

The results showed that there is a significant difference in the expression of miR-21 between the groups ($P=0.001$). The treatment with cadmium caused a decrease, while aerobic exercise and receiving date pollen extract resulted in a significant increase in miR-21 gene expression ($P=0.05$). In addition, miR-132 expression was significantly lower in the cadmium-exposed group compared to the control group ($P=0.04$). However, exercise with date pollen consumption was not statistically significant ($P=0.98$) and there was no difference in the expression of mir-132 and mir-21 genes between palm pollen 200 and date pollen 400 groups.

Conclusion

The present study showed that performing moderate-intensity regular exercise with palm pollen in cadmium-treated rats led to the regulation of microRNAs related to nephrotoxicity. When cadmium enters the body, it is transported into the bloodstream via red blood cells and albumin, accumulates in the kidneys, and causes inflammatory responses in the immune system. Therefore, the prevention and treatment of cadmium poisoning are of great importance. Ample evidence suggests that overexpression of miR-21 provides protection against renal ischemic injury. Furthermore, miR-21 is a key inhibitor of dendritic cell maturation. Studies show that miR-21 is expressed in hematopoietic cells of the immune system, including B/T cells,

monocytes, macrophages, and dendritic cells. Also, miR-132, due to evolutionary conservation, has a similar sequence and structure in humans, mice, monkeys, and other species and is involved in the functioning and growth of neurons, circadian rhythm control, angiogenesis, and regulation of innate immune responses. On the other hand, physical activity can significantly affect the immune system and can be considered an effective approach in the treatment and management of chronic kidney disease. Date pollen is a powerful and nutritious diet because it contains flavonoid components and bioactive, volatile unsaturated fatty acids, which function as antioxidants, anti-cancer agents, and stimulants. When compared to the control group, mir-132 gene expression decreased by 52% in the

cadmium group, but increased by 23% in the aerobic exercise group. No significant difference was seen between the date pollen groups and the control group during exercise at either dose. Additional research is needed to determine whether an increase in the miR-132 variable occurs in response to an increase in exercise intensity or in the dose of date pollen. The findings show that cadmium reduced mir-21 and mir-132 expression. However, physical activity has a protective effect against excessive reduction of miR-21 and miR-132. Also, physical activity along with the consumption of date pollen prevented the decrease of mir-21, which can protect kidney tissue against diseases caused by cadmium chloride.

اثر فعالیت بدنی به همراه مصرف عصاره‌ی هیدروالکلی گرده نخل بر بیان برخی از microRNAs در سمیت القا شده کادمیوم در بافت کلیه موش‌های صحرایی

امیر دلشاد*^۱، فرشته سلیمی^۲، سعید ولی‌پور^۲

^۱گروه فیزیولوژی و ایمونولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه قم، قم، ایران
^۲گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه قم، قم، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶
پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶
انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱

کلید واژه‌ها:

- تمرین هوازی
- Mir-21
- Mir-132
- سمیت کادمیوم
- عصاره گیاهی گرده
- کلیه

چکیده

زمینه. هدف این مطالعه تعیین اثر فعالیت بدنی به همراه مصرف عصاره‌ی هیدروالکلی گرده نخل بر بیان mir-21 و mir-132 در سمیت القا شده کادمیوم در بافت کلیه موش‌های صحرایی نر است.

روش کار. در این مطالعه ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ و سالم با دامنه وزنی 250 ± 30 گرم و سن ۱۲ هفته به صورت تصادفی ساده در ۶ گروه (۱: گروه کنترل، ۲: گروه ورزش، ۳: گروه کادمیوم، ۴: گروه کادمیوم+ورزش، ۵: گروه کادمیوم+نخل+ورزش و ۶: گروه کادمیوم+ورزش+نخل) قرار گرفتند. موش‌ها روزانه ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کلرید کادمیوم به صورت گاواز دریافت نمودند و عصاره گرده نخل با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنها تزریق گردید. تمرین هوازی شامل دویدن موش‌ها بر روی تردمیل با سرعت ۲۷ متر در دقیقه با مدت زمان ۱۶ دقیقه آغاز و روزی یک دقیقه به تمرین اضافه شد.

یافته‌ها. نتایج نشان داد در بیان miR-21 بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/001$). کادمیوم باعث کاهش و تمرین هوازی و دریافت عصاره گرده نخل منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن miR-21 شده است ($P=0/005$). همچنین در بیان miR-132 بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/04$). کادمیوم نسبت به گروه کنترل باعث کاهش در این متغیر شده است اما ورزش به همراه تجویز گرده نخل از نظر آماری معنادار نبوده است ($P=0/98$).

نتیجه‌گیری. مطالعه ما نشان داد که انجام تمرینات ورزشی منظم با شدت متوسط به همراه گرده نخل در موش‌های بیمار شده توسط کادمیوم موجب تنظیم microRNAهای مرتبط با سمیت کلیه می‌شود.

پیامدهای عملی. مکمل گیاهی مورد استفاده در این پژوهش و همچنین فعالیت بدنی می‌تواند اثرات مخرب مواجهه با کادمیوم از جمله جوامع صنعتی و کارگران صنایع شیمیایی را تا حدودی کنترل کند.

مقدمه

هیپوولمی شود. همچنین قرار گرفتن در معرض برخی داروها و مواد نفروتوکسیک به‌عنوان عامل ابتلا به این عارضه شناخته شده است.^۱ یکی از عوامل خطر در پیشرفت CKD قرار گرفتن در معرض سموم یا بیماری‌هاست.^۲ در پژوهش‌های اخیر ثابت شده است که کادمیوم (Cd, Cadmium) که در دسته مواد سرطان‌زای نوع ۱ قرار دارد، دارای اثرات سمی و مستقیماً بر سطوح سلولی اثرگذار است و موجب آپوپتوز، نکروز و همچنین یکی از عوامل رشد سلول‌های بدخیم می‌شود.^۳ در مسمومیت ناشی از Cd، کلیه یکی از ارگان‌های آسیب‌پذیر بشمار می‌رود.^۴ عملکرد miRNAها به‌عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن، نقش مهمی در انواع فرآیندهای مولکولی در اندام‌های متعدد از جمله کلیه دارند.^۵ می‌توان اذعان

کلیه با تصفیه خون و کنترل تعادل مایعات بدن موجب تنظیم فشار و دفع مواد زائد می‌شود. علاوه بر حذف مواد زائد متابولیک، کلیه سیتوکین‌های در حال گردش و سموم باکتریایی مانند لیپو پلی ساکارید (LPS, Lipopolysaccharide) را کنترل و به هموستاز سیستم ایمنی کمک می‌نماید و همچنین با حذف سیتوکین‌های در گردش التهاب را محدود می‌سازد.^۱ کاهش ناگهانی عملکرد کلیه، آسیب حاد کلیه (AKI, Acute kidney injury) را به همراه داشته و به سرعت در طی چند ساعت تا چند روز ایجاد و به اختلال عملکرد در این بخش می‌انجامد. مطالعات نشان داده‌اند تداوم AKI بیش از سه ماه می‌تواند منجر به بیماری مزمن کلیه (CKD, Chronic kidney disease) از جمله سپسیس،

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Ah_delshad114@gmail.com; Ah_delshad@yahoo00.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

در طول تمرین بدنی، مشخص شده است که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در ماهیچه اسکلتی و هم در سطح سیستمیک افزایش می‌یابد.^۶ فعالیت بدنی به لحاظ فیزیولوژیک باعث تغییرات گوناگون در بدن می‌شود و بسته به مؤلفه‌های تمرین از جمله نوع، زمان، دوره و شدت می‌تواند متفاوت باشد. از این رو، برای نشان دادن تأثیر تمرینات منظم ورزشی باید جنبه‌های مختلف آن مورد بررسی قرار گیرد.^۷ همچنین از نظر بالینی، بیماری کلیوی زمانی آشکار می‌شود که آسیب قابل توجهی قبلاً رخ داده باشد و تلاش بر این است که شیوه‌های تشخیصی و درمانی جدید برای جلوگیری از صدمه بیشتر شناسایی و ارائه شود. پژوهش‌هایی که در خصوص برقراری هموستاز ایمنی انجام می‌گیرد، مسیر درمان‌های جدیدی را میسر می‌کند؛ بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر یک دوره تمرین هوازی به همراه مصرف عصاره‌ی هیدروآلکی‌گرده نخل بر بیان ژن *mir-132*، *mir-21* بافت کلیه القا شده با کلرید کادمیوم در موش‌های صحرایی نر است.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی و کاربردی است و طبق دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعه درد انجام شده است. کلیه اصول اخلاقی لازم در این پژوهش رعایت شده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه قم مورد تأیید قرار گرفته است. در این تحقیق نمونه‌گیری‌ها به صورت تصادفی ساده انجام شده است. تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با دامنه وزنی 250 ± 30 گرم و سن ۱۲ هفته وارد مطالعه شدند که از انستیتو پاستور تهران خریداری و به حیوان خانه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی آزاد قم منتقل گردیدند. آزمودنی‌ها در محیطی با میانگین دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 4 درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲-۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌اتیلن نگهداری می‌شدند. غذای آزمودنی‌های از شرکت خوراک دام پارس ایران بود و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. حیوانات به مدت ۱ هفته جهت سازگاری با محیط جدید در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. حیوانات به ۶ گروه (۸ تایی: ۱) گروه کنترل، ۲) گروه ورزش، ۳) گروه کلرید کادمیوم، ۴) گروه سمیت کادمیوم+ ورزش، ۵) گروه سمیت کادمیوم+ گرده نخل 200 ، ۶) گروه سمیت کادمیوم+ ورزش+ گرده نخل 400 جایگذاری شدند. انجام آزمایش‌ها به مدت پنج هفته و هفته‌ای ۵ جلسه تیمار کردن و ورزش با فاصله زمانی نیم ساعت انجام گرفت. برای آسیب کلیوی ابتدا حیوانات کلرید کادمیوم را به صورت گاوژ دریافت

داشت که MicroRNAها در رشد، هموستاز و پاتوفیزیولوژی بیماری کلیه نقش دارند. گذشته از آن شواهدی وجود دارد که بیان بی‌نظم miRNA با آسیب کلیوی چه در مطالعات حیوانی و چه انسانی مرتبط است و به عنوان نشانگر آسیب کلیوی مورد بررسی قرار می‌گیرند.^۷ محققین اعلام نمودند miRNA-21 پرشمار و بسیار حفاظت‌شده‌ترین microRNAهای شناخته شده است که اکثراً در سلول‌ها بیان می‌شود و نقش‌های تنظیمی حیاتی در سلامت و بیماری ایفا می‌کند.^۸ miR-21 به صورت یک انکوژن عمل کرده و بیان بیش از حد آن منجر به لنفوم سلول B بدخیم می‌شود. همچنین در بررسی ۵۴۰ بیمار سرطانی نتایج نشان داد، miR-21 تنها miRNA ای است که به طور مداوم تنظیم شده و در سلول‌های خون‌ساز سیستم ایمنی، از جمله سلول‌های B/T، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود. بنابراین، سطوح بالای miR-21 به عنوان نشانگر فعال شدن سلول‌های ایمنی در نظر گرفته شده^۹ و به عنوان یک نشانگر زیستی برای آسیب‌های کلیه و فیروز شناسایی شده است.^{۱۰} از طرفی miR-132 در عملکرد و رشد نورون‌ها، کنترل ریتم شبانه‌روزی، رگ‌زایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی نقش دارد^{۱۱} و نیز نقش‌های متفاوت‌تری در انواع مختلف تومور را نشان می‌دهد. به عنوان مثال، miR-132 در سرطان‌هایی مانند کولورکتال و پانکراس به صورت پرموتر و همچنین انکوژن عمل نموده و در عین حال در کارسینوم کبدی، سرطان پروستات و سینه به عنوان سرکوب کننده عمل می‌کند.^{۱۲} عصاره گرده نخل به دلیل وجود فلاونوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد.^{۱۳} نتایج مطالعات گذشته بیانگر این موضوع است که افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش وضعیت آنتی‌اکسیدانی درون‌زا از علل بالقوه آسیب‌های کلیوی بشمار می‌آید.^۲ پژوهشگران اعلام کردند خرما حاوی بسیاری از ترکیبات مهم دارویی مانند پلی‌فنل، تریپنوئید، استروئیدها و ساپونین است و گذشته از ترکیبات شیمیایی غنی، بسیاری از گونه‌های نخل خرما به دلیل اثرات ارتقاء دهنده سلامتی همچون ضد دیابت، ضد التهاب، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، سیتوتوکسیک و تقویت‌کننده جنسی عمل می‌کنند.^{۱۴} اختلال عملکرد سیستم ایمنی مزمن و سطوح بالای واسطه‌های التهابی، پایه‌ای برای ایجاد CKD هستند. چندین تغییر ایمنولوژیک را می‌توان در طول پیشرفت CKD یافت که شامل یک حالت پیش‌التهابی و تغییرات فنوتیپی سلول‌های ایمنی است. از سویی، فعالیت بدنی با تأثیر بر سیستم ایمنی می‌تواند درمانی مؤثر در بیماری مزمن کلیه باشد.^{۱۵} از سوی دیگر، تأثیر فعالیت بدنی بر سلامتی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و

به‌عنوان کنترل داخلی استفاده همچنین پرایمرها توسط شرکت سیناژن طراحی و توالی آن استخراج شد.

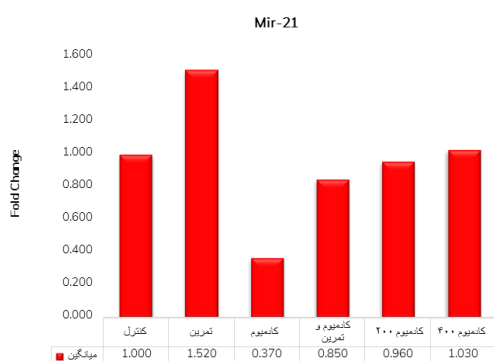
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence
miR-21	For: 5'-CCTTGTCGGGTAGCTTATCA-3' Rev: 5'-GAGGAAGAAGACGGAAGAAT-3'
mir-132	For: 5'-GTCTAGCCGGCCCAAGT-3' Rev: 5'-CGGAAGAGAAGACGGAGAAAT-3'
U6	For: 5'-CTTCCGAGTCAGAGGTTTC-3' Rev: 5'-GTATGTAGATGTGGGTGGC-3'

جهت تحلیل داده‌ها از میانگین و انحراف استاندارد استفاده شد. ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها و همسان بودن واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های شاپیرو-ویلک و لوین ارزیابی شد. از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه تغییرات بین گروهی و به دنبال آن برای مقایسه جهت و محل دقیق این تفاوت از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شده است ($P \leq 0.05$). کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داد، در بیان ژن miR-21 بین شش گروه مورد پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0.001$). مطابق با این یافته‌ها، کادمیوم منجر به کاهش بیان ژن miR-21 می‌شود اما ورزش و عصاره گرده نخل در دو دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ باعث افزایش بیان ژن miR-21 در بافت کلیه نسبت به گروه کادمیوم شده است. با این حال، نسبت به گروه کنترل فقط گروه ورزش افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود. همچنین بین گروه گرده نخل ۲۰۰ و گرده نخل ۴۰۰ در بیان ژن miR-21 تفاوتی دیده نمی‌شود.

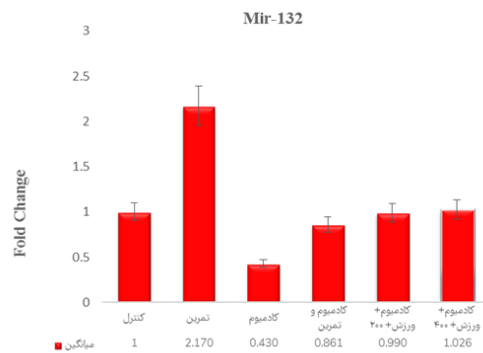


نمودار ۱. مقایسه میزان بیان ژن miR-21 در شش گروه تحقیقی*؛ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، θ : تفاوت معنی‌دار با دیگر گروه‌ها

کردند و سپس روزانه یک دوز سه میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کلرید کادمیوم (رقیق‌شده با آب مقطر) به آن‌ها تزریق گردید.^{۱۸} موش‌ها پس از گرم کردن (با سرعت ۵ متر بر دقیقه) به اجرای تمرینات اصلی پرداختند و در انتها پس از ۵ دقیقه سردکردن، فعالیت به پایان رسید. تمرینات ۵ جلسه در هفته انجام شد که شامل دویدن روی نوارگردان با شدت ۲۷ متر در دقیقه بود که هفته اول مدت زمان تمرین از ۱۶ دقیقه شروع و روزی یک دقیقه به زمان تمرین اضافه شد. حجم تمرین توسط زمان فعالیت به تدریج افزایش یافت. بعد از اتمام هفته سوم، هفته‌های چهارم و پنجم (دوره حفظ و ثبات تمرین) زمان تمرین ۳۰ دقیقه ثابت ماند. جهت یکنواخت باقی ماندن سازگاری‌های به دست آمده، شدت و مدت تمرین در ۲ هفته آخر ثابت نگه داشته شد.^{۱۹} ۴۰ گرم از گرده نخل، داخل پارچه سفید متناسب با فضای سوکسله انتقال داده شد. سپس داخل بالکن سوکسله ۱۰۰ سی‌سی اتانول ۷۰ درصد ریخته و دستگاه در دمای ملایم ۸۰-۷۸ درجه سلیسیوس تنظیم گردید. در مدت ۱۲ ساعت به تدریج حلال بر اثر حرارت بخار شد و با تکرار این عمل به مرور کلیه مواد مؤثره گیاه جدا و وارد حلال گشت و محلول داخل دستگاه روتاری قرار گرفت. پس از تبخیر الکل، مواد به دست آمده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. گروه‌های تیمار شده عصاره هیدرو الکلی گرده نخل با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنشان تحت تجویز درون صفاقی به مدت ۲۵ روز دریافت کردند و سرم فیزیولوژیک به‌عنوان حلال دارو قرار گرفت.^{۲۰} پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین موش‌ها توسط دی‌اتیل اتر بی‌هوش و بافت کلیه خارج و در نیتروژن مایع منجمد قرار گرفت. بافت‌های منجمد در محلول انتقال بافت منجمد RNAlater@-ICE از قبل سرد شده (۸۰- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و تا زمان جداسازی RNA در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.^۶ برای آنالیز بیوشیمیایی بیان ژن miR-21، mir-132، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت Reagent SamzolTM انجام گرفت و غلظت و خلوص کمی RNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شد و بعد از انجام استخراج با استفاده از کیت cDNA synthesis SambioTM سنتز cDNA انجام گرفت. پردازش اطلاعات در Real-Time PCR بسیار حائز اهمیت است. پردازش بر اساس شکل استاندارد و ارزیابی با زده PCR انجام گرفت. پس از اتمام تست و به دست آوردن CT‌های ژن رفرنس و ارزیابی میزان بیان ژن توسط آزمون real time PCR از روش کمی نسبی $\Delta\Delta CT$ استفاده شد و از ژن u6

نسبت به کنترل، کاهش ۰/۴۵ بیان ژن miR-21 وجود دارد. اما تمرین هوایی منجر به افزایش ۳/۵ برابری و در گروه ورزش به همراه تجویز گرده نخل نسبت به گروهی که فقط کادمیوم دریافت می‌کردند، افزایش ۲/۳ برابری را نشان داد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعه تانگتاناتاکول و همکاران است که آگزوزوم‌های ادراری جدا شده از بیماران مبتلا به نفریت لوپوس فعال در مقایسه با غیرفعال را بررسی کردند و ارتباط بین بیان miRNA و عملکرد کلیه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که miR-21 در بیماری فعال در مقایسه با بیماری غیرفعال به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. در حالی که پس از دوره کامل درمان شاهد افزایش قابل توجهی در miR-21 در این بیماران بودند.^{۱۰} از طرفی فی و همکاران افزایش بیان miR-21 را در کلیه‌های موش‌های مبتلا به آسیب ایسکمیک-ریپرفیوژن مجدد یا آسیب کلیوی ناشی از جنتامایسین نشان دادند. سطح miR-21 در ادرار بیماران مبتلا به آسیب حاد کلیه نسبت به بیماران سالم افزایش یافته بود.^۶ اختلاف مشاهده شده در میان این یافته می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع عارضه و تفاوت در تیمار باشد. امیرسسان و همکاران به بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر بیان miR-21 ۲۲ پسر نوجوان غیرفعال پرداختند. نتایج حاکی از کاهش غلظت نسبت به دوره پیش از تمرین بود.^{۲۱} این اختلاف ایجاد شده ممکن است به تفاوت آزمودنی‌ها مرتبط باشد. آسیب کلیوی ناشی از Cd باعث اتساع گلوبومرول‌ها و خونریزی موضعی شدید لوله‌های کلیه موش صحرایی شده و کادمیوم می‌تواند از راه‌های مختلفی مانند اتوفازی و میتوفازی به انسان و حیوانات آسیب برساند و از این رو پیشگیری و درمان مسمومیت با کادمیوم از اهمیت بالایی برخوردار است.^{۲۲} علاوه بر این، miRNAها می‌توانند در تنظیم فرآیندهای متعدد مانند چرخه سلولی، متابولیسم و پاسخ‌های ایمنی متنوع نقش داشته باشند. در بسیاری از بیماری‌ها miRNAها به عوامل تنظیم‌کننده حیاتی بیان ژن تبدیل شده‌اند که شبکه‌های تنظیمی آن‌ها در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است.^{۲۳} رابطه مستقیمی بین آسیب لوله‌های کلیوی و پاسخ‌های ایمنی ذاتی ناشی از هیپوکسی که منجر به آسیب حاد کلیه شده وجود دارد. شواهد فراوانی نشان می‌دهد که بیان بیش از حد miR-21 از آسیب ایسکمیک کلیه محافظت می‌کند. علاوه بر این، miR-21 یک مهارکننده کلیدی در بلوغ سلول‌های دندریتیک است.^{۲۴} بررسی‌ها نشان می‌دهد miR-21 در سلول‌های خون‌ساز سیستم ایمنی، از جمله سلول‌های B/T، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود.^۹ از طرفی فعالیت بدنی می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر سیستم ایمنی

نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی حاکی از این است که بین گروه کنترل و کادمیوم ($P=0/001$) و تمرین ($P=0/031$) در بیان ژن Mir-21 در بافت کلیه تفاوت معنی‌داری دیده می‌شود. همچنین بین گروه کادمیوم با گروه تمرین ($P=0/03$)، تمرین کادمیوم ($P=0/013$)، عصاره گرده نخل ۲۰۰ ($P=0/002$) و عصاره گرده نخل ۴۰۰ ($P=0/005$) این تفاوت معنی‌دار وجود دارد. اما بین دو گروه عصاره گرده نخل ۲۰۰ و همچنین عصاره گرده نخل ۴۰۰ تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P=0/116$). سایر نتایج به دست آمده نشان می‌دهند در بیان ژن mir-132 بین شش گروه تحقیقی تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($P=0/043$). بنابراین، تیمارکردن موش‌هایی که در معرض مسمومیت کادمیوم بودند، کاهش بیان ژن mir-132 را به همراه داشته است. با این حال، تمرین هوایی منجر به جلوگیری از کاهش و حتی افزایش معنی‌دار mir-132 در بافت کلیه موش‌های صحرایی شده است. همچنین گرده نخل به همراه تمرین نسبت به گروه کادمیوم افزایش داشت که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.



شکل ۲. مقایسه میزان بیان ژن miR-132 در شش گروه تحقیقی * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، θ : تفاوت معنی‌دار با دیگر گروه‌ها

نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد بین گروه کنترل و تمرین ($P=0/010$) و گروه کادمیوم ($P=0/001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد؛ اما با دیگر گروه‌ها این تفاوت آماری دیده نشد. همچنین، بین عصاره گرده نخل ۲۰۰ و عصاره گرده نخل ۴۰۰ ($P=0/982$) این تفاوت معنی‌دار نبود.

بحث

در مطالعه حاضر اثر فعالیت بدنی به همراه مصرف عصاره هیدروالکلی گرده نخل بر تغییرات mir-132، mir-21 بافت کلیه القا شده با کلرید کادمیوم در موش‌های صحرایی نر بررسی شد. در میزان بیان ژن miR-21 بین شش گروه تحقیقی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/001$). نتایج حاکی از آن است که در گروه کادمیوم

تأثیر گذاشته و به‌عنوان یک درمان مؤثر در درمان و مدیریت بیماری مزمن کلیه در نظر گرفته شود.^{۱۵} گرده نخل که به دلیل دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای چرب غیراشباع فرار بیواکتیو که نقش مهمی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، عوامل ضد سرطان و محرک در تغذیه انسان دارند، می‌تواند به‌عنوان یک غذای کارآمد و پرخاصیت در نظر گرفته شود.^{۲۰} گرده نخل غنی از کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها است و منبع خوبی برای ویتامین‌های A، B، C، D و E و مواد معدنی بشمار می‌رود.^{۲۱} فلاونوئیدها، بیشترین ترکیبات فنلی در گیاهان را تشکیل می‌دهند و اثرات محافظتی در برابر بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و اختلالات عصبی دارند. فلاونوئیدها بر اساس پتانسیل آنتی‌اکسیدانی که دارند، قادر هستند با تغییر فسفوریلاسیون مولکول‌های سیگنال دهنده و یا تعدیل بیان ژن بر عملکرد سلولی تأثیر گذارند. کشت سلولی و مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که فلاونوئیدها ممکن است با از بین بردن مستقیم رادیکال‌های آزاد بر وضعیت ویتامین E تأثیر بگذارند.^{۲۲} نتیجه دیگر بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بین شش گروه در متغیر miR-132 تفاوت معناداری وجود دارد. بدین ترتیب، کادمیوم نسبت به گروه کنترل باعث کاهش ۵۲ درصدی بیان ژن miR-132 شد. ورزش هوازی نیز باعث افزایش ۲۳ درصدی نسبت به گروه کنترل شده است. با این حال، در گروه گرده نخل هر دو دوز به همراه تمرین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در این زمینه، امانی و همکاران اثر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط را بر فیبروز عضله اسکلتی ۲۸ موش صحرایی دیابتی مورد پژوهش قرار دادند. یافته‌های آنان نشان داد تمرین استقامتی با شدت متوسط از فیبروز بافتی ناشی از دیابت جلوگیری می‌کند.^{۲۸} لی و همکاران به بررسی مکانیسم محافظتی گلوتامین (GLN) در برابر آسیب حاد کلیه ایسکمی- پرفیوژن مجدد (I/R) پرداختند و نشان دادند که در مدل I/R بیان miR-132-5p و miR-205 کاهش می‌یابد.^{۲۹} از طرفی دونات و همکاران با مطالعه بر روی بیماران آرتریت روماتوئید (RA)، بیان سطوح بالای miR-132 روی نسبت به افراد سالم گزارش دادند که این افزایش با کشیدن سیگار نیز بیشتر می‌شد.^{۳۰} دلیل تفاوت نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر ممکن است ناشی از نوع نمونه مورد مطالعه باشد. miR-132 از دو miRNA همسان، hsa-miR-132-5p و hsa-miR-132-3p تشکیل شده است و با توجه به حفظ فرگشتی، توالی و ساختار مشابهی در انسان، موش، میمون و سایر گونه‌ها دارد. همچنین، miR-132 در عملکرد، رشد نوروها، کنترل ریتم شبانه‌روزی، رگ‌زایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی نقش دارد.^{۱۱} miRNA به ۳

نتیجه‌گیری

با بررسی یافته‌های حاصل از مطالعه، در مجموع می‌توان عنوان کرد کادمیوم منجر به کاهش miR-21 و miR-132 می‌شود در حالی که فعالیت بدنی اثر محافظتی در برابر کاهش بیش از اندازه miR-21 و miR-132 دارد. همچنین فعالیت بدنی به همراه مصرف گرده نخل از کاهش miR-21 نسبت به گروه کنترل جلوگیری می‌کند که این امر می‌تواند بافت کلیه را در برابر بیماری‌های ناشی از کلرید کادمیوم محافظت نماید.

قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مسئولین مرکز تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه آزاد قم و آزمایشگاه تحقیقات جهاد دانشگاهی قم به‌ویژه جناب دکتر ناصر کلهر تشکر و قدردانی می‌شود.

مشارکت پدیدآوران

امیر دلشاد: ایده‌پردازی و طراحی اثر؛ فرشته سلیمی: تهیه پیش‌نویس اثر و نقد و بررسی؛ سعید ولی‌پور: جمع‌آوری و تفسیر داده‌های پژوهش را بر عهده داشتند.

منابع مالی

این مقاله هیچ کمک مالی از سازمان‌های تأمین‌کننده مالی در بخش‌های دولتی، دانشگاه یا مرکز تحقیقات دریافت نکرده است.

تأثیر گذاشته و به‌عنوان یک درمان مؤثر در درمان و مدیریت بیماری مزمن کلیه در نظر گرفته شود.^{۱۵} گرده نخل که به دلیل دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای چرب غیراشباع فرار بیواکتیو که نقش مهمی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، عوامل ضد سرطان و محرک در تغذیه انسان دارند، می‌تواند به‌عنوان یک غذای کارآمد و پرخاصیت در نظر گرفته شود.^{۲۰} گرده نخل غنی از کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها است و منبع خوبی برای ویتامین‌های A، B، C، D و E و مواد معدنی بشمار می‌رود.^{۲۱} فلاونوئیدها، بیشترین ترکیبات فنلی در گیاهان را تشکیل می‌دهند و اثرات محافظتی در برابر بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و اختلالات عصبی دارند. فلاونوئیدها بر اساس پتانسیل آنتی‌اکسیدانی که دارند، قادر هستند با تغییر فسفوریلاسیون مولکول‌های سیگنال دهنده و یا تعدیل بیان ژن بر عملکرد سلولی تأثیر گذارند. کشت سلولی و مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که فلاونوئیدها ممکن است با از بین بردن مستقیم رادیکال‌های آزاد بر وضعیت ویتامین E تأثیر بگذارند.^{۲۲} نتیجه دیگر بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بین شش گروه در متغیر miR-132 تفاوت معناداری وجود دارد. بدین ترتیب، کادمیوم نسبت به گروه کنترل باعث کاهش ۵۲ درصدی بیان ژن miR-132 شد. ورزش هوازی نیز باعث افزایش ۲۳ درصدی نسبت به گروه کنترل شده است. با این حال، در گروه گرده نخل هر دو دوز به همراه تمرین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در این زمینه، امانی و همکاران اثر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط را بر فیبروز عضله اسکلتی ۲۸ موش صحرایی دیابتی مورد پژوهش قرار دادند. یافته‌های آنان نشان داد تمرین استقامتی با شدت متوسط از فیبروز بافتی ناشی از دیابت جلوگیری می‌کند.^{۲۸} لی و همکاران به بررسی مکانیسم محافظتی گلوتامین (GLN) در برابر آسیب حاد کلیه ایسکمی- پرفیوژن مجدد (I/R) پرداختند و نشان دادند که در مدل I/R بیان miR-132-5p و miR-205 کاهش می‌یابد.^{۲۹} از طرفی دونات و همکاران با مطالعه بر روی بیماران آرتریت روماتوئید (RA)، بیان سطوح بالای miR-132 روی نسبت به افراد سالم گزارش دادند که این افزایش با کشیدن سیگار نیز بیشتر می‌شد.^{۳۰} دلیل تفاوت نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر ممکن است ناشی از نوع نمونه مورد مطالعه باشد. miR-132 از دو miRNA همسان، hsa-miR-132-5p و hsa-miR-132-3p تشکیل شده است و با توجه به حفظ فرگشتی، توالی و ساختار مشابهی در انسان، موش، میمون و سایر گونه‌ها دارد. همچنین، miR-132 در عملکرد، رشد نوروها، کنترل ریتم شبانه‌روزی، رگ‌زایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی نقش دارد.^{۱۱} miRNA به ۳

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های مطالعه حاضر در صورت درخواست از پدیدآور مرتبط با حوزه پژوهش آرایه خواهد شد.

ملاحظات اخلاقی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۱ با کد IR.QOM.REC.1401.006 می‌باشد.

References

- Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley S. The role of the immune system in kidney disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2018;192(2):142-50. doi: 10.1111/cei.13119
- Rostamkhani H, Faghfour AH, Veisi P, Rahmani A, Noshadi N, Ghoreishi Z. The protective antioxidant activity of ginger extracts (*Zingiber Officinale*) in acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Journal of Functional Foods*. 2022;94:105111. doi: 10.1016/j.jff.2022.105111
- Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3(1):1-24. doi: 10.1038/nrdp.2017.88
- Kar I, Patra AK. Tissue bioaccumulation and toxicopathological effects of cadmium and its dietary amelioration in poultry—a review. *Biological Trace Element Research*. 2021;199(10):3846-68. doi: 10.1007/s12011-020-02503-2
- Ijaz MU, Batool M, Batool A, Al-Ghanim K, Zafar S, Ashraf A, et al. Protective effects of vitexin on cadmium-induced renal toxicity in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(10):5860-4. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.040
- Pavkovic M, Vaidya VS. MicroRNAs and drug-induced kidney injury. *Pharmacology&therapeutics*. 2016;163:48-57. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.016
- Fay MJ, Alt LA, Ryba D, Salamah R, Peach R, Papaeliou A, et al. Cadmium nephrotoxicity is associated with altered microRNA expression in the rat renal cortex. *Toxics*. 2018;6(1):16. doi: 10.3390/toxics6010016
- Jenike AE, Halushka MK. miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker research*. 2021;9(1):1-7. doi: 10.1186/s40364-021-00272-1
- Feng Y-H, Tsao C-J. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical reports*. 2016;5(4):395-402. doi: 10.3892/br.2016.747
- Tangtanatakul P, Klinchanhom S, Sodsai P, Sutichet T, Promjeen C, Avihingsanon Y, et al. Down-regulation of let-7a and miR-21 in urine exosomes from lupus nephritis patients during disease flare. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2019;37(4):189-97. doi: 10.12932/ap-130318-0280
- Leonov G, Shah K, Yee D, Timmis J, Sharp TV, Lagos D. Suppression of AGO2 by miR-132 as a determinant of miRNA-mediated silencing in human primary endothelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015;69:75-84. doi: 10.1016/j.biocel.2015.10.006
- Qin J, Ke J, Xu J, Wang F, Zhou Y, Jiang Y, et al. Downregulation of microRNA-132 by DNA hypermethylation is associated with cell invasion in colorectal cancer. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:3639-48. doi: 10.2147/ott.s91560
- Homayouni-Tabrizi M, Soltani M, Karimi E, Namvar F, Pouresmaeil V, Es-haghi A. Putative mechanism for anticancer properties of Ag-PP (NPs) extract. *IET nanobiotechnology*. 2019;13(6):617-20. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5199
- Otify AM, Hammam A-MM, Farag MA. Phoenix dactylifera L. date tree pollen fertility effects on female rats in relation to its UPLC-MS profile via a biochemometric approach. *Steroids*. 2021;173:108888. doi: 10.1016/j.steroids.2021.108888
- Fuhro MI, Dorneles GP, Andrade FP, Romão PR, Peres A, Monteiro MB. Acute exercise during hemodialysis prevents the decrease in natural killer cells in patients with chronic kidney disease: a pilot study. *International urology and nephrology*. 2018;50:527-34. doi: 10.1007/s11255-017-1747-z
- Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and adaptative response mediated by Nrf2 during physical exercise. *Antioxidants*. 2019;8(6):196. doi: 10.3390/antiox8060196

17. Fathi R, Feli F, Motamedi P, Rajabi H, Mahmoudi A. Effect of Aerobic Training with Two Different Intensities on Some Angiogenesis Factors in Renal Tissue of Diabetic Rats. *Journal of Applied Exercise Physiology*. 2019;15(29):57-72. doi: 10.22080/JAEP.2019.14244.1757
18. Fathi N, Mir Mohammadrezaei F. Protective Effects of Astaxanthin on the Levels of Urea and Creatinine as well as Changes in Kidney Tissue following Cadmium-Induced Toxicity in Syrian Male Mice. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2020;28(5):33-42. doi: 10.29252/sjimu.28.5.33
19. Nazif NN, Khosravi M, Ahmadi R, Bananej M, Ahmad M. Neuroprotection Effect of Quercetin on TNF- α Levels and Gene Expression of Caspase 3 in MPTP-Induced Male NMRI Mice. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2019;21(12):94883. doi: 10.5812/ircmj.94883
20. Mehrabani D. Effect of palm pollen extract on sexual hormone levels and follicle numbers in adult female BALB/c mice. *Internal Medicine Today*. 2014;20(3):139-43.
21. Amirsasan R, Armanfar M, Hesari J. The effect of eight weeks high intensity intermittent training (HIIT) on the expression of miRNA-1 and miRNA-21 in sedentary adolescent boys. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*. 2019;41(3):16-23. doi: 10.34172/mj.2019.028
22. Wang X, Bao R, Fu J. The antagonistic effect of selenium on cadmium-induced damage and mRNA levels of selenoprotein genes and inflammatory factors in chicken kidney tissue. *Biological trace element research*. 2018;181:331-9. doi: 10.1007/s12011-017-1041-z
23. Ma H, Dong Y, Sun K, Wang S, Zhang Z. Protective effect of MiR-146 on renal injury following cardiopulmonary bypass in rats through mediating NF- κ B signaling pathway. *Bioengineered*. 2022;13(1):593-602. doi: 10.1080/21655979.2021.2012405
24. 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. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:790. doi: 10.3389/fphys.2018.00790
25. Ramos SLF, Dequigiovanni G, Sebbenn AM, Lopes MTG, Kageyama PY, de Macêdo JLV, et al. Spatial genetic structure, genetic diversity and pollen dispersal in a harvested population of *Astrocaryum aculeatum* in the Brazilian Amazon. *BMC genetics*. 2016;17(1):1-10. doi: 10.1186/s12863-016-0371-8
26. Tatar T, Akdevelioğlu Y. Effect of pollen, pit powder, and gemmule extract of date palm on male infertility: A systematic review. *Journal of the American College of Nutrition*. 2018;37(2):154-60. doi: 10.1080/07315724.2017.1364183
27. Niesche R, Haase M. Emotions and ethics: A Foucauldian framework for becoming an ethical educator. *Educational philosophy and theory*. 2012;44(3):276-88. doi: 10.1111/j.1469-5812.2010.00655.x
28. Amani M, Rahmati M, Fathi M, Ahmadvand H. The effect of 6 weeks moderate intensity endurance training on skeletal muscle fibrosis in diabetic rats. *Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz*. 2020;42(2):126-34. doi: 10.34172/mj.2020.028
29. Li S, Huang X, Wang S, Chu X, Aierken M. Analysis of microRNA Expression after Glutamine Intervention in Acute Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Healthcare Engineering*. 2022;2022:7. doi: 10.1155/2022/2401152
30. Donate PB, Alves de Lima K, Peres RS, Almeida F, Fukada SY, Silva TA, et al. Cigarette smoke induces miR-132 in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(1):2017120118. doi: 10.1073/pnas.2017120118
31. Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Ghodrattollah N, et al. In vivo effects of olive oil and trans-fatty acids on miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 and mTORC1 gene expression in a DMBA-treated mouse model. *Plos one*. 2021;16(2):0246022. doi: 10.1371/journal.pone.0246022
32. Satarug S. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. *Toxics*. 2018;6(1):15. doi: 10.3390/toxics6010015
33. de Souza Teixeira AA, Lira FS, Rosa-Neto JC. Aging with rhythmicity. Is it possible? Physical exercise as a pacemaker. *Life Sciences*. 2020;261:118453. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118453