



تأثیر مکمل دهی کافئین همراه با تمرين تناوبی با شدت بالا بر سطوح پروتئین های مرتبط با آپوپتوز بافت قلبی در موش های صحرایی دیابتی

افشار جعفری: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (* نویسنده مسئول) af_jafari@sbu.ac.ir
علی ضرغامی خامنه: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
سعید نیکو خصلت: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
بوران کریمی: استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

کلیدواژه ها

کافئین،
تمرينات تناوبی شدید،
آپوپتوز،
دیابت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴
تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

زمینه و هدف: برخی مطالعات گزارش کرده اند که فرآیند آپوپتوز متعاقب مداخله جداگانه هر یک از کافئین و تمرينات ورزشی تشديد می گردد. لذا، هدف از پژوهش حاضر تعیین آثار تجویز همزمان کافئین با تمرين تناوبی با شدت بالا (HIIT) بر سطوح برخی پروتئین های مرتبط با آپوپتوز (Bax, Bcl-2, Caspase-3) در بافت قلبی موش های دیابتی بود.

روش کار: بدین منظور، ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ سفید نژاد ویستار با دامنه سنی ۲ تا ۳ ماه به طور تصادفی در ۵ گروه همگن ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D)، دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب همراه با تزریق درون صفاقی 35 mg.kg^{-1} استرپتوزوسین، دیابتی تمرين کرده (D+T)؛ دوین با شدت $85\text{--}90\%$ سرعت بیشینه؛ ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته، دیابتی با مکمل دهی کافئین (D+CA)؛ تزریق درون صفاقی کافئین خالص به میزان 70 mg.kg^{-1} و دیابتی تمرين کرده با مکمل دهی کافئین (D+T+CA) تقسیم شدند.

یافته ها: القاء دیابت (D) موجب افزایش معنی دار پروتئین های Bax و کاسپاز-۳ و کاهش پروتئین Bcl-2 می گردد ($P \leq 0.05$) در حالیکه اعمال HIIT باعث کاهش قابل توجه 81% و 423% در میزان Bax و کاسپاز-۳ در مقایسه با گروه D می شود ($P = 0.001$). از سویی، تجویز کافئین به تنها ی (D+CA) و همراه با تمرينات (D+T+CA) منجر به تشديد پروتئین های Bax و کاسپاز-۳ و کاهش در میزان Bcl-2 در مقایسه با گروه تمرين (D+T) گردید ($P = 0.023$).

نتیجه گیری: بر اساس یافته های این مطالعه می توان اظهار داشت که، هشت هفته تمرينات تناوبی با شدت بالا یک راهکار پیشگیرانه در مقابل آپوپتوز افزایش یافته بوده، در حالی که تیمار با کافئین به تنها ی و در ترکیب با تمرينات تناوبی شدید ممکن است موجب وخامت در مرگ سلولی آپوپوتیک ناشی از دیابت گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه تبریز

شیوه استناد به این مقاله:

Jafari A, Zarghami Khameneh A, Nikookheslat S, Karimi P. The effect of caffeine supplementation combined with high-intensity interval training on the levels of the cardiac tissue apoptosis-related proteins in diabetic rats. Razi J Med Sci. 2021;28(4):1-12.

* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

The effect of caffeine supplementation combined with high-intensity interval training on the levels of the cardiac tissue apoptosis-related proteins in diabetic rats

Afshar Jafari: Associate Professor, Department of Biological Sciences in Sport and Health, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran And Department of Biological Sciences in Sport and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (*Corresponding author) af_jafari@sbu.ac.ir

Ali Zarghami Khameneh: PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Saeed Nikookheslat: Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Pouran Karimi: Assistant Professor, Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Background & Aims: The prevalence of type 2 diabetes (T2DM) is a major public health problem that is approaching epidemic proportions globally (1). T2DM is associated with severe arteriosclerosis, hypertension and etc. All of which further contribute to the development of cardiovascular disease that the development of diabetic cardiomyopathy (DCM) involves mitochondrial dysfunction (2). In this regard, Fang-Yuan et al (2018) showed that cardiac dysfunction along with anti-apoptotic proteins (Bcl-2) downregulation, while levels of pro-apoptotic proteins (Bax, Cas-3) were upregulated in rats with long-term diabetic cardiomyopathy (3). However, a number of evidence suggests that apoptotic processes may be affected by some pharmacological and oral interventions. In this regard, several epidemiological and experimental studies have reported that caffeine may have ability to suppress cell proliferation and induce apoptosis via regulation some oncogenic signalling pathways, including the phosphatase and tensin homolog (PTEN), PI3K/Akt, p53 and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways (5, 6). For example, Hanyang Liu et al (2017) have found that caffeine treatment significantly up-regulates mRNA expression levels of PTEN and p53 proteins, increased the activation of caspase-9 and -3, and increased the expression levels of Cyt-c in on human gastric cancer cells (6). On the other hand, Rahimi et al (2018) have reported that ingestion of caffeine reduced in the expression of Bax and increased Bcl-2 serum protein levels immediately after resistance training (8). Whereas, Moradi et al (2019) showed 8-weeks high-intensity interval training (HIIT) at the intensity of 80-85% of the maximum speed could significantly increase Bcl-2 and decrease Bax on diabetic rats (12).

In this regard, this study aimed to investigate the effects of 8-weeks of caffeine administration alone and in combination with HIIT intervention on the levels of some proteins in the mitochondrial pathway of apoptosis i.e. Bax, Bcl-2, Caspase-3 in the myocardium of diabetic rats as a sensitive somatic tissue to cell death.

Methods: The present study is a type of animal experiments clinical intervention that was conducted in the form of a two-factor post-test control group designs. Fifty white male Wistar rats (two-month-old with a mean body weight of 225-300 g) were acclimated in a specific laboratory setting and then, at the end of the period (acclimatization), the subjects were randomly divided into five groups (n=10 per group) including: Healthy control (C), Diabetic control (D), Diabetic with training (D+T), Diabetic with caffeine (D+CA), Diabetic with training and caffeine (D+T+CA). Type 2 diabetes was induced two weeks after the animals became acclimatization with the method used in a study by Sasidharan et al (2013), so that the studied animals became diabetic after two weeks of high-fat diet (45% fat) and intraperitoneal injections of single dosage of 35 mg.kg⁻¹ body weight of STZ. After one week of the diabetic procedure (14), blood glucose samples were collected and levels more than 300 mg.dL were used as type 2 diabetic animals (12). In addition, hydrated caffeine (saline solution) was intraperitoneal injection in D+CA and D+T+CA groups during a period of 8 weeks, 5 days a week, using insulin syringe (70 mg.kg⁻¹

Keywords

Career Advancement,
Knowledge
Management,
Knowledge Sharing,
Mazandaran Social
Security Organization

Received: 03/04/2021

Published: 26/06/2021

b.w per day, approximately equivalent to 14 mg of caffeine per 200 grams of rats b.w) (16). Caffeine was administered to rats during their waking hours and early in the activity period between 18-19 pm (60 min before training). The animals in D+T and D+T+Ca groups, for 8 weeks and 5 d wk-1 in the form of high-intensity interval training (6 to 13 bouts of 2-min-1 at a 0 degree slope with intensity of 85-90% of the maximum running speed followed by a 1-min-1 rest between bouts) run on animal treadmill during hours 19-20 pm (15). Finally, all rats were deeply anesthesia with ketamine HCl (90 mg.kg-1) and xylazine (10 mg.kg-1) intraperitoneal injection following the 48-hours after the last training session and after 12-14 hours fasting. We used an immunoblotting assay to measure the levels of the some proteins involved in apoptosis pathways (Bax, Cas-3, Bcl-2), following the Santa Cruz manufacturer's instructions (17). Data were analyzed by of one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test in significance level of $P \leq 0.05$.

Results: The results showed that levels of pro-apoptotic protein level (Bax and Cas-3), in diabetic control (D) was ($\Delta=94\%$ & $\Delta=618\%$), in diabetic with caffeine (D+CA) was ($\Delta=106\%$ & $\Delta=951\%$) and in diabetic with training and caffeine (D+T+CA) was ($\Delta=221\%$ & $\Delta=1071\%$) more than healthy control group (C) respectively ($F=60.37$; $P=0.001$ & $F=2102.37$; $P=0.001$). On the one hand, the level of this proteins in the D+T group was about (Bax= $\Delta=-81\%$ & Cas-3= $\Delta=-423\%$) lower than that in the D group ($P=0.038$). Moreover, the Cas-3 protein expression in D+CA group was about 333% significantly higher than the D group ($P=0.001$) (Fig.1&3). Furthermore, Bcl-2 protein level in D group was significantly lower than healthy C group ($\Delta=-37\%$) ($P=0.001$). However, the levels of this protein in D+CA and D+T+CA were about ($\Delta=-64\%$) and ($\Delta=-70\%$) lower than those of the C group, respectively ($P=0.001$). Also, Bcl-2 protein in the D+T group was insignificantly lower than ($\Delta=-20\%$) the D group ($P=0.32$) (Fig.2).

Conclusion: In line with the results of the present study, Fang-Yuan et al (2018) showed induction of diabetes caused significant decrease of Bcl-2 gene expression and an increase in Bax and p53 gene expression in heart tissue of diabetic rats (3). It has been well established that diabetic-mediated apoptotic cell death effect on mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) leading to the irreversible release of intermembrane space proteins (e.g. Bid, Bim, Bad and Bax), thereby activating the caspase cascade (18).

However, caffeine administration for two months leads to an significant increased in apoptotic markers by exacerbation of pro-apoptotic proteins expression of Bax and Caspase-3 and reduction in anti-apoptotic Bcl-2 protein. These findings were supported by Hanyang Liu et al (2017), indicated that caffeine treatment increased the activation of caspase-9 and -3 (cleaved caspase-9 and -3), and increased the expression levels of Cyt-c and Bax proteins (6). Researchers suggested the caffeine triggered intrinsic apoptotic pathways via; inactivation of PI3K-Akt-mTOR cell survival signaling pathways and activation of cell death such as p21-activated protein kinase 2 (PAK2) and N-terminal and C-Janus kinases (JNK), thereby increased levels of Bax and cleaved caspase 3 and phosphorylating of Bcl-2 protein tha cause initiation of apoptotic events (9-11). In contrast of this paper, Rahimi et al (2020) reported that the caffeine intake decreses Bax protein and significantly increaesd Bcl-2 levels after acute resistance exercise protocol (8). Though, the protective effects of exercise training on apoptosis have been well established. For example, Moradi et al (2019) showed that HIIT training (80-85% maximum speed) could significantly increase Bcl-2 and decrease Bax and p53 in muscle tissue of the diabetic rats (12). Nonetheless, contrary to the results of these studies, some studies also Shirpour Bonab et al (2017) conclusion that the Bax expression was higher in HIIT intervention after 8-weeks in aged female (27). While, the intervention of 8-weeks HIIT alone in the present study reduced the expression of Bax and Caspase-3 proteins and increased the Bcl-2 in myocardial tissue.

In other words, HIIT training ameliorates myocardial apoptosis. while, the combination of two independent variables in present study (e.g caffeine with HIIT) even induced deterioration the apoptotic cell death process in the myocardial tissue of diabetic rats. Perhaps the combination of caffeine with strenuous or prolonged exercise training can result increased tissue damage during contractile activity along with an increase in ROS levels, calcium release from sarcoplasmic reticulum and increases in concentrations of inflammatory cytokines production have been shown to modulation apoptotic processes.

Conflicts of interest: None

Funding: Tabriz University

Cite this article as:

Jafari A, Zarghami Khameneh A, Nikookheslat S, Karimi P. The effect of caffeine supplementation combined with high-intensity interval training on the levels of the cardiac tissue apoptosis-related proteins in diabetic rats. Razi J Med Sci. 2021;28(4):1-12.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

از طرفی، تحقیقات به اثرات حفاظتی تمرينات ورزشی بر عوارض کاردیومیوپاتی اشاره دارند (۱۱). در این ارتباط، مرادی و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی تأثیر ۸ هفته تمرينات تناوبی شدید (HIIT) با شدت ۸۰-۸۵٪ سرعت بیشینه بر بیان ژن‌های شاخص‌های آپوپتوزی در عضله قلبی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو به کاهش در سطوح پروتئین‌های Bax و p53 و افزایش در Bcl-2 اشاره داشتند (۱۲). این در حالی است که برخلاف نتایج مطالعات مذکور، برخی از پژوهش‌ها اشاره به تسريع فرآیند آپوپتوز و افزایش در بیان پروتئین‌های کاسپازی متعاقب تمرينات ورزشی دارند. جاوید تبریزی و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه ۱۲ هفته برنامه تمرينی با شدت ۷۵-۸۰٪ VO_{2max} (با سرعت ۲۴-۳۳ متر در دقیقه با شیب ۱۵٪) به افزایش در بیان ژن‌های سیتوکروم-۵ و کاسپاز-۹ در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر ویستار در مقایسه با گروه کنترل اظهار داشتند (۱۳).

لذا، تحقیق پیش‌رو با توجه وجود مطالعات محدود و گاهًا متناقض، به بررسی تأثیر تجویز دو ماه مکمل کافئین به تنها یی و در ترکیب با اعمال تمرينات تناوبی شدید (HIIT) بر میزان برخی از پروتئین‌های کلیدی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز یعنی پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ در بافت سوماتیک حساس به مرگ سلولی قلبی متعاقب القای دیابت نوع دو در موش‌های نر ویستار می‌پردازد.

روش کار

تحقیق حاضر از نوع مطالعات تجربی بالینی است که پس از دریافت کد اخلاقی (IR.TBZMED.1397.389 VCR.REC) با طرح پس آزمون انجام شد. تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در دامنه سنی ۲ تا ۳ ماهه به روش در دسترس خردباری و در قفس‌های مجزا و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی قرار داده شدند. موش‌های صحرایی با غذاهای تولیدی از مرکز تولید خوراک سازان اصفهان تغذیه و آب مورد نیاز آن‌ها نیز به صورت دسترسی آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد.

پس از گذشت دو هفته دوره سازگاری، القای دیابت

دیابت یکی از بیماری‌های شایع در ایران و جهان بشمار می‌رود، بطوریکه در سال ۲۰۱۷ از هر ۱۱ نفر انسان بالغ یک نفر در جهان مبتلا به این بیماری بوده و در هر هشت ثانیه جان یک نفر را گرفته است (۱). در این چنین عنوان شده است که آپوپتوز ناشی از دیابت مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی در افراد دیابتی بویژه نقص در عملکرد بافت میوکارد بعلت کاهش در انعطاف‌پذیری عضله قلبی است که به اصطلاح کاردیومیوپاتی دیابتی (Diabetic cardiomyopathy (DCM)) نامیده می‌شود (۲). به عنوان نمونه، یووان و همکاران (۲۰۱۸) به دنبال تجزیه و تحلیل وسترن بلات شاخص‌های آپوپتویک در موش‌های مبتلا به کاردیومیوپاتی مزمن به کاهش در عملکرد عضله قلبی همراه با کاهش در بیان پروتئین لنفوامی سلول B (Bcl-2) و افزایش در بیان پروتئین X وابسته به Bcl-2 (Bax) و کاسپاز-۳ اظهار داشتند (۳). این در حالی است که، شواهد روبروی دیابتی آپوپتویک کننده این موضوع است که فرآیندهای آپوپتویک ممکن است توسط برخی از مداخلات دارویی و خوارکی مورد تأثیر قرار گیرد (۴). در این زمینه، نشان داده شده است که تیمار با کافئین منجر به سرکوب تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز از طریق تنظیم تعدادی از مسیرهای آنکوژنیک شامل هومولوگ تنسین و فسفاتاز (PTEN)، mTOR، PI3K-Akt و p53 می‌گردد (۵-۷). کافئین دارویی چندعملکردی است که توانایی القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده آپوپتوزی را دارد (۷). بطور نمونه، لیو و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه اثرات مقادیر متفاوت کافئین در سلول‌های سرطانی معدّه انسان به افزایش در بیان کاسپاز-۹ و ۳ و بیان پروتئین Bax و کاهش در پروتئین Bcl-2 مرتبط با ماشین آپوپتوز اشاره داشتند (۶). این در حالی است که، رحیمی و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که مصرف ۶ میلی‌گرم در وزن بدن کافئین در مردان سالم تمرين کرده باعث کاهش در بیان پروتئین پروآپوپتویک Bax و افزایش پروتئین ضدآپوپتویک Bcl-2 سرمی بلافاصله پس از انجام تمرينات مقاومتی می‌گردد (۸). چنین به نظر می‌رسد که کافئین دارای عملکرد دوگانه‌ای بر عملکرد بافتی بوده و تعديل کننده چرخه زندگی-مرگ سلولی باشد

سرعت ۱۰ متر در دقیقه شروع و هر ۳ دقیقه یکبار سرعت نوارگردان ۵ متر در دقیقه تا رسیدن حیوانات به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای نوارگردان) افزایش یافت. سرعتی که در آن موش‌های صحرایی به خستگی رسیدند، به عنوان سرعت بیشینه در نظر گرفته شد که در تحقیق حاضر بطور میانگین برابر با 28 ± 4 متر در دقیقه بود. برنامه تمرینی گروه تجربی نیز شامل تمرینات تناوبی شدید (HIIT) به مدت ۸ هفته و هر ۵ هفته ۵ جلسه شامل ۵ دقیقه گرم کردن (با سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر در دقیقه)، بندۀ اصلی تمرین برابر با شدت $\%85-90$ سرعت بیشینه (تقریباً برابر با $23-25$ متر بر دقیقه) با توجه به میانگین بدست آمده از سرعت بیشینه) که در ۵ تا ۱۲ وهله دو دقیقه‌ای (که هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه می‌گردید) بود (۱۰). به علاوه، تناوب‌های یک دقیقه‌ای استراحت فعال شامل دویین‌های ادامه‌دار با سرعت ۱۰ متر در دقیقه که میان وهله‌های فعالیتی اعمال و در آخر نیز ۵ دقیقه زمان سرد کردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر در دقیقه) اعمال گردید (۱۵) (جدول ۱).

تیمار با کافئین در گروه تجربی به شکل پودر کافئین خالص انھیدروز (خشک) تهیه شده از شرکت آلمانی مرک (Merck KGaA) تأیید شده توسط سازمان غذا و دارو، ۵ روز در هفته و ۶۰ دقیقه قبل از پروتکل تمرینی با توجه به وزن بدن حیوانات ($70 \text{ میلی} \text{ g}$) در وزن $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ بدن در روز با توجه متوسط دوز کشندۀ $\text{LD}_{50}=190$ برای موش) به طور کافئین هیدراته (محلول در یک سی سی نرمال سالین) بصورت تزریق درون صفاقی (IP) توسط سرنگ انسولین بود (تقریباً

نوع دو بر طبق روش موجود در مطالعه ساسیدهاران و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد (۱۴). به طوری که حیوانات مورد مطالعه، پس از دو هفته مصرف رژیم غذای پُرچرب (پلت ساخت شرکت خوراک‌سازان اصفهان با محتوای $\%45$ چربی، $\%21$ پروتئین و $\%34$ کربوهیدرات)، با تزریق درون صفاقی $35 \text{ میلی} \text{ g}/\text{kg}$ از سم استرپتوزوسین (ساخت شرکت سیگما آلدريچ، آمریکا) پس از شش ساعت ناشتاپی تزریق گردید (۱۴). پس از گذشت پنج روز، درصورتیکه میزان گلوکز خون که از روش آنژیمی گلوکز اکسیداز استفاده می‌شد بیش از $300 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ می‌بود، بعنوان دیابتی تشخیص داده می‌شدند (۱۲). بعد از ابتلاء به دیابت، موش‌ها براساس گلوکز خونشان با انحراف استاندارد $15 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ به صورت تصادفی ساده در یکی از ۵ گروه 10 سری؛ گروه‌های کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D)، دیابتی تمرین کرده بدون دریافت مکمل (D+T)، دیابتی تمرین نکرده با دریافت مکمل (D+CA) و دیابتی تمرین کرده با دریافت مکمل (D+T+CA) تقسیم شدند.

سپس موش‌های صحرایی (به غیر از گروه‌های کنترل سالم و دیابتی و دیابتی با مکمل) به مدت ۷ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند مخصوص حیوانات قرار گرفتند. دوره آشنایی با دویین روى نوارگردان بر اساس مطالعه عسکری‌هزاو و همکاران (۲۰۱۸) انجام گردید (۱۵). چنانچه، طی دوره آشنایی، شبیب نوارگردان صفر درصد، سرعت $10-15$ متر در دقیقه و مدت تمرین نیز $5-10$ دقیقه در روز بود. آزمون اندازه‌گیری بیشینه سرعت با

جدول ۱ - زمانبندی تمرینات تناوبی شدید (HIIT)

تکرارهای دویین ۲ دقیقه‌ای	سرعت دویین (m.min ⁻¹)	شبیب نوارگردان (%)	سرعت برگشت به حالت اولیه فعال (m.min ⁻¹)
۵	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۶	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۷	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۸	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۹	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۱۰	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۱۱	%85-۹۰ max speed	.	۱۰
۱۲	%85-۹۰ max speed	.	۱۰

نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج بصورت دانسیتۀ نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند (۱۷).

داده‌ها در قالب میانگین و انحراف استاندارد به صورت توصیفی به شکل جدول و نمودار ارایه شد. سپس، توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-asmirnov بررسی گردید. پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها و با توجه به هدف تحقیق، نخست پیش فرض تحقیق مبنی بر تفاوت معنی‌دار گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از ANOVA یک طرفه بررسی و اثرات جداگانه و همزمان متغیرهای مستقل تمرین و تیمار با مکمل کافئین روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری عاملی دو طرفه و پس آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل گردید. سهم اثر هریک از متغیرها نیز با استفاده از درصد تغییرات مشخص شد. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از ۵ صدم و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS22 تحت ویندوز انجام شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های مورد مطالعه به صورت نمودار در ادامه ارائه شده است. چنانچه نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان دهنده وجود اثرات تقابلی قابل توجه در میزان بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوzی در مosh‌های دیابتی به دنبال اعمال تمرینات HIIT و تجویز کافئین می‌باشد (Bax: $P \leq 0.001$, $F = 60/37$, $P = 0.001$ -پاز-۳). چنانچه القاء دیابت منجر به افزایش معنی‌دار ۹۴ و ۶۱۸ درصدی به ترتیب در میزان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوzی Bax (P = 0.001) و کاسپاز-۳ (P = 0.001) در گروه کنترل دیابتی (D) در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) بود (شکل ۱ و ۳). در همین راستا، نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد اعمال تمرینات تنایوبی شدید (HIIT) در گروه دیابتی با تمرین (D+T) باعث کاهش معنی‌دار و قابل توجه ۸۱ و ۴۲۲ درصدی در سطوح پروتئین Bax و کاسپاز-۳ به ترتیب در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) (P = 0.001). همچنین، یافته‌ها نشان داد که تیمار با مکمل کافئین در گروه دیابتی (D+CA) موجب افزایش قابل توجه در میزان پروتئین Bax و کاسپاز-۳ به میزان ۹۵۱ و ۱۰۶ درصد در مقایسه

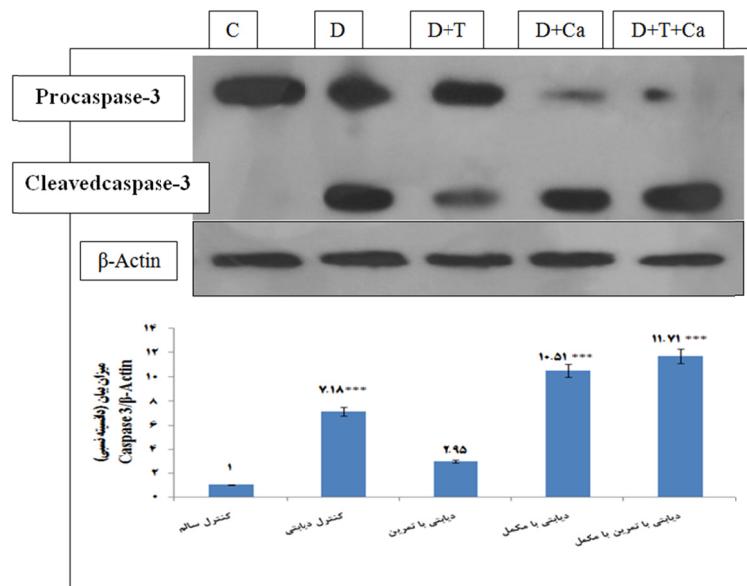
برابر با ۱۴ میلی‌گرم کافئین به ازای هر ۲۰۰ گرم از وزن بدن موش (۱۶).

تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتاپی، با تزریق داخل صفاقی کتمانی (mg.kg⁻¹ ۹۰) و زایلazin (mg.kg⁻¹ ۱۰) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت آپکس بطن چپ (نوک قلب) آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع (۱۹۶°C) منجمد و در دمای (۷۰°C) در فریزر (دو درب ساخت شرکت دانش پژوهش فجر، تهران، ایران) نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های در گیر در مسیر آپوپتوzیس یعنی Bax و Bcl-2 و کاسپاز-۳ از روش وسترن بلات استفاده شد. ابتدا، برای تهیه هموژنه ۱۰٪ وزنی حجم بافت قلب از بافر ریبا (شرکت سیگما) حاوی مهار کننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برآدفورد (Bradford) (سیگما) اندازه گیری شد. سپس پروتئین موردنظر در ۱۰٪ دناتوره کننده پلی‌اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) با دستگاه الکتروفورز (شرکت Bio Rad، آمریکا) تفکیک گردید. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی‌وینیلیدین دی فلورايد (PVDF) سیگما منتقل شد. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی بادی اولیه خرگوشی ضد Bax، ضد Bcl-2 و ضد کاسپاز-۳ ساخت شرکت سانتاکروز آمریکا به ترتیب با گذ sc-7480 و sc-492 و sc-56053 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده گردید. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰.۵٪ توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Hrp به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad.ECL) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیتۀ باندها توسط نرم‌افزار J Image اندازه گیری و دانسیتۀ باندهای پروتئین هدف در مقابل لو دینگ کنترل بتا-اکتین

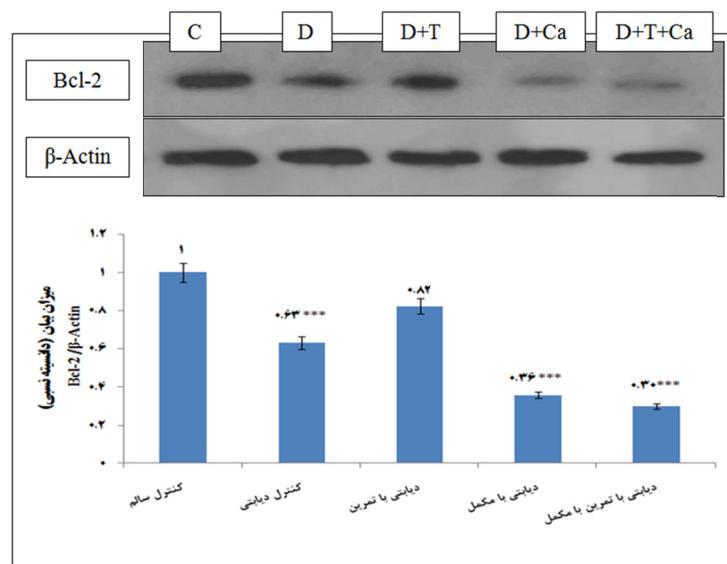
افزایش در کاسپاز-۳ به میزان ۱۱۹ درصد در مقایسه با گروه دیابتی با مکمل (D+CA) گردید ($P \leq 0.001$) (شکل ۳ و ۱).

همچنین، نتایج تحلیل واریانس یک راهه حاکی از وجود اثرات تقابلی معنی دار بین گروهی در میزان

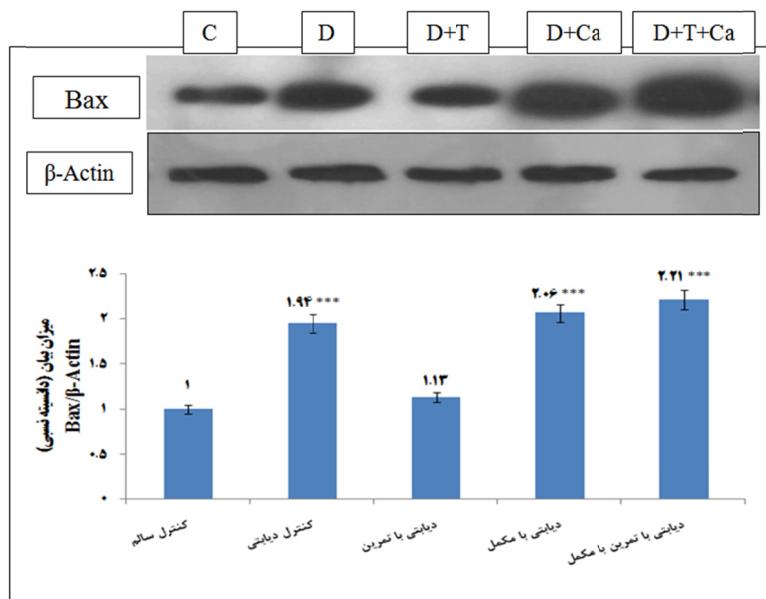
با گروههای کنترل سالم (C) می شود ($P=0.001$). از طرفی، میزان پروتئین های Bax و کاسپاز-۳ در گروه دیابتی تمرین کرده با کافئین (D+T+CA) بطور معنی داری ($P \leq 0.05$) منجر به افزایش ۹۸ و ۸۵۳ میزان بیان پروتئین کاسپاز-۳ در میزان درصدی در مقایسه با گروه دیابتی با تمرین (D+T) و



شکل ۱- میزان بیان پروتئین کاسپاز-۳ در میوکارد موش های صحرابی دیابتی تمرین کرده با و بدون تیمار کافئین در مقایسه با گروههای کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین کاسپاز-۳ نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئین در گروهها. *** نشان دهنده تفاوت معنی داری گروهها در سطح $P=0.001$.



شکل ۲- میزان بیان پروتئین Bcl-2 در میوکارد موش های صحرابی دیابتی تمرین کرده با و بدون تیمار کافئین در مقایسه با گروههای کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین 2 Bcl-2 نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئین در گروهها. *** نشان دهنده تفاوت معنی داری گروهها در سطح $P=0.001$.



شکل ۳- میزان بیان پروتئین Bax در میوکارد موش‌های صحرابی دیابتی تمرين کرده با و بدون تیمار کافئین در مقایسه با گروه‌های کنترل. (الف) تصویر ایمونولاینگ پروتئین Bax نسبت به گروه کنترل. (ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. *** نشان دهنده تفاوت معنی‌داری گروه‌ها در سطح $P=0.001$.

شاخص‌های آپوپتوزی مشاهده شده و نتایج حاضر نیز دور از انتظار نبود. بطور نمونه، بیوان و همکاران (۲۰۱۸) گزارشی مبنی بر اینکه به دنبال تجویز رژیم غذایی با چربی بالا شامل؛ ۰.۲٪ کلسترول، ۱۰٪ چربی خوک و ۰.۸۸٪ غذاي معمولی بمدت ۸ هفته و سپس تزریق درون صفاقی ۲۵ میلی گرم در کیلوگرم سَم استرپتوزوسین در موش‌های نژاد اسپرادوگاولی کاهش در عملکرد عضله قلبی همراه با کاهش در بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش در بیان Bax و کاسپاز-۳ مشاهده می‌گردد (۳). در این ارتباط، به خوبی ثابت شده است که آپوپتوز ناشی از دیابت، یکی از راه‌های مهم ایجاد مرگ سلولی برنامه ریزی شده است. چنانکه، در پاسخ به واکنش فشار اکسایشی در میتوکندری، غشاء خارجی میتوکندری نفوذپذیر شده و منجر به انتقال پروتئین Bax از سیتوزول به میتوکندری می‌گردد (۱۸، ۱۹). انتقال خود این پروتئین پیش‌آپوپتوزی توسط خانواده پروتئین‌های ضدآپوپتوزی Bcl-2 کنترل می‌گردد. پروتئین Bcl-2 نیز در غشاء خارجی میتوکندری قرار گرفته و ضمن حفظ نفوذپذیری کم غشاء مانع از انتشار سیتوکروم c به داخل سیتوپلاسم و در نتیجه فعال‌سازی کاسپازها می‌گردد (۱۸). چنانکه فعال‌سازی

پروتئین Bcl-2 متعاقب اعمال تمرينات تنابوی شدید و مکمل‌دهی کافئین در موش‌های دیابتی است ($F=73/83$, $P \leq 0.001$). بطور یکه، سطوح پروتئین Bcl-2 در گروه کنترل دیابتی (D) بطور معنی‌داری در حدود ۳۷ درصد کمتر از گروه کنترل سالم (C) بود ($P=0.001$). هرچند، تغییرات این پروتئین در گروه دیابتی با مکمل کافئین (D+CA) و گروه دیابتی تمرين کرده با کافئین (D+T+CA) به ترتیب در حدود ۶۴ و ۷۰ درصد کمتر از گروه کنترل سالم (C) بود ($P=0.001$). در حالیکه، سطوح این پروتئین در گروه دیابتی تمرين کرده (D+T) بطور غیرمعنی‌داری ۲۰ درصد (P=0.032) کمتر از (۰ درصد) گروه کنترل دیابتی بود (شکل ۲).

بحث

با استناد به یافته‌های تحقیق حاضر، چنین می‌توان اذعان نمود که القاء دیابت نوع دو در موش‌ها سبب افزایش در جریان آپوپتوز از طریق کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 و افزایش در شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی Bax و کاسپاز-۳ می‌گردد. چنانچه در اکثر مطالعات قبلی نیز افزایش در

سازوکار مولکولی که کافئین از طریق آن موجب تحریک پیامرسانی مسیرهای آپوپتوزی می‌گردد را شامل غیرفعال‌سازی مسیرهای پیامرسانی بقاء سلولی PI3K-Akt-mTOR و فعال‌سازی مسیرهای دخیل در مرگ سلولی همچون پروتئین کیناز دو فعال شده بر اثر p21 (PAK2) و کینازهای N-ترمینال و C-جانوس (JNK) می‌دانند (۲۱،۶،۷). چنانچه، هی و همکاران (۲۰۰۳) متعاقب تیمار ۲۴ ساعته با مقداری ۴۵۰-۵۰۰ میکرومول کافئین به القاء آپوپتوزیس در سلول‌های JB6 از طریق افزایش در فسفوریلاسیون باقیمانده Ser15 پروتئین p53 و بیان پروتئین Bax و کاسپاز-۳ اشاره داشتند (۲۲). فسفوریلاسیون پروتئین p53 در باقیمانده Ser15 یک گام ضروری برای فعال‌سازی آپوپتوز وابسته به p53 است. p53 پروتئین بالادستی Bax بوده و خود Bax نیز از افکتورهای پائین‌دستی p53 می‌باشد. Bax خود توانایی آزادسازی سیتوزولی سیتوکروم c را دارد، درصورتیکه به نوبه خود باعث فعال‌سازی کاسپاز-۳ به عنوان یکی از اعضای کلیدی در شروع فرآیند آپوپتوزیس را داراست. کاسپاز-۳ فعال شده شکسته شده و شاخصی است که موجب کلیوژ آپوپتوزی می‌شود.

ظاهراً، اثرات کافئین بر روی سلول‌های هدف حداقل دربخشی ناشی از وضعیت سلولی و بروتکل درمانی باشد. بطوريکه، کافئین ممکن است تحریک کننده آپوپتوز در یک روش وابسته به دوز باشد؛ نشان داده شده است که مصرف مقادیر کم کافئین جلوگیری DNA می‌گردد (۲۱-۲۴). چنانچه به نظر می‌رسد یکی از بزرگترین محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم اندازه‌گیری پروتئین‌های مسیر بالادستی همچون PI3K-Akt-mTOR که منجر به آغاز فعال‌سازی ماشین آپوپتوزی می‌شود.

دریختن ناشی از وضعیت سلولی و بروتکل درمانی باشد. بطوريکه، کافئین ممکن است تحریک کننده آپوپتوز در یک روش وابسته به دوز باشد؛ نشان داده شده است که مصرف مقادیر کم کافئین جلوگیری کننده آپوپتوز بوده، در حالیکه مقادیر بالایی از کافئین تحریک کننده آن باشد (۲۶،۲۷). در این راستا، جعفری و همکاران (۲۰۰۴) و سینهها و همکاران (۲۰۱۴) اظهار داشتند که کافئین به ترتیب القاء کننده مسیرهای مرگ سلولی آپوپتوتیک و اتوفاژیک در مقادیری برابر و بالاتری از ۵۰ میکرومول در لیتر می‌گردد (۲۴،۱۶). چنانکه این مقادیر بسیار شبیه به دوزهایی است که پس از مصرف ۴ تا ۵ فنجان قهوه یا مصرف خالص کافئینی برابر با ۵ تا ۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از

کاسپازها یا سیستئین-پروتئازها بخصوص کاسپاز اجرایی سه (Caspase-3) به عنوان مرحله انتهایی آپوپتوز و نقطه برگشت‌ناپذیر ماشین مرگ سلولی تصویر نهایی از وضعیت یافت را نشان می‌دهد (۳). در حالیکه، در پژوهش پیش رو چنانکه مشاهده شد، تجویز دو ماه مکمل کافئین منجر به افزایش فعالیت آبشار آپوپتوزی از طریق تشديد در بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و کاسپاز-۳ و کاهش در میزان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 می‌شود. همسو با نتایج حاضر، لیو و همکاران (۲۰۱۷) چنین اشاره کردند که تیمار با کافئین سبب سرکوب تکثیر سلولی و القای آپوپتوز از طریق کاهش در بیان Bcl-2، افزایش در بیان و کاسپازهای ۹ و ۳ همراه با تنظیم مثبت بیان mRNA پروتئین‌های PTEN و p53 در سلول‌های سرطانی معده انسانی می‌شود (۶). به علاوه، وو و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی کافستول به عنوان یک مولکول دترپن یافت شده در دانه‌های قهوه کافتا عربیکا به افزایش در بیان پروتئین Bim و کاهش در بیان MCL-1 اظهار داشتند (۱۹). وانگ و همکاران (۲۰۱۵) نیز چنین نتیجه گیری نمودند که حضور کافئین موجب افزایش آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین (داروی ضدسرطان) در هر دوی سلول‌های سرطانی از طریق افزایش در پروتئین‌های پیش آپوپتوتیکی همچون PUMA می‌شود (۲۰). بطوريکه، نشان داده شده است که تجویز کافئین باعث سرکوب فعالیت مسیر پیامرسانی PI3-K/Akt شده در نتیجه موجب دیفسفوریلاسیون و رهاسازی پروتئین Bad در سیتوزول شده که به نوبه خود با اتصال به Bcl-2 موجب تشکیل کانال الیگومری و شروع وقایع آپوپتوزی می‌شود (۲۱). گروه مطالعاتی ژن لو و همکاران (۲۰۰۸) با انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌های اسٹئوبلاست انسانی تحت تیمار با کافئین (۲ میلی‌مول) به افزایش در بیان نسبت پروتئین Bax/Bcl-2 و کاهش در پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) و مدولاسیون نفوذپذیری میتوکندری متعاقب آزادسازی سیتوکروم-c در یک روش وابسته به مقادیر اشاره داشتند (۵). این در حالی است که در تحقیق حاضر نیز نسبت پروتئین Bax/Bcl-2 به میزان ۷ برابر در مقایسه با گروه کنترل سالم و ۱۳۲٪ نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری داشت. محققان

در بیان ژن‌های سیتوکروم-*c* و کاسپاز-۹ در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر ویستار در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل اظهار داشتند (۱۳). صفرزاده و همکاران (۲۰۱۸) نیز به عدم تأثیر ۸ هفته تمرینات تداومی در موش‌های مسموم شده با آب اکسیژنه بر تغییرات سطوح پروتئین‌های *Bax* و *Bcl-2* و نسبت این دو بر یکدیگر در مقایسه با گروه کنترل خبر دادند (۲۶). همچنین، شیری‌پور بناب و همکاران (۲۰۱۷) اظهار داشتند که اعمال تمرینات با شدت بالا در سلول‌های هپاتوسیتی موش‌های ماده کهنسال موجب افزایش در بیان *Bax* و کاسپاز-۳ و کاهش در بیان پروتئین *Bcl-2* گردید، در حالیکه تجویز کورکومین (عصاره زردچوبه) سبب معکوس نمودن این نتایج گردید. این در صورتی بود که اعمال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) به تنها یک در تحقیق حاضر موجب کاهش در بیان پروتئین *Bax* و کاسپاز-۳ و افزایش در پروتئین ضدآپوپتوزی *Bcl-2* گردید (۲۷).

نتیجه‌گیری

در کل به نظر می‌رسد، تمرینات HIIT موجب بهترشدن وضعیت آپوپتوزی در بافت قلبی گردد. در حالیکه، ترکیب دو متغیر مستقل حاضر یعنی کافئین با تمرین تناوبی حتی باعث بدتر شدن وضعیت آپوپوتیکی در بافت قلبی موش‌های دیابتی شود. بطوریکه، تجویز کافئین همراه با اعمال تمرین اثرات تعدیل کننده تمرین بر سطوح پروتئین‌های افزایش یافته آپوپتوزی ناشی از دیابت را خنثی می‌کند. شاید ترکیب احتمالی کافئین با انجام فعالیت‌های شدید باعث اعمال آسیب بیشتر بر بافت انقباضی از طریق افزایش در میزان ROS، رهاسازی کلسیم از ذخایر سارکوپلاسمیک و افزایش در غلظت‌های سایتوکین‌های التهابی شده و از این طریق تعدیل کننده فرآیندهای آپوپتوزی بوده باشد (۲۱-۲۵). با این حال، سازوکار دخیل در بوجود آمدن این نتایج مبهم بوده و نیاز به انجام تحقیقات بیشتر و حتی بررسی سایر پروتئین‌ها و مسیرهای درگیر در رویداد آپوپتوز دارد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از یافته‌های رساله دکتری

وزن بدن در مُدل انسانی و یا بیش از ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از وزن بدن در مُدل حیوانی همچون تحقیق حاضر می‌باشد (۱۶).

از طرفی چنانچه پیش‌تر نیز ذکر شد، اثرات آپوپتوزی کافئین احتمالاً به وضعیت سلولی نیز بستگی داشته باشد.

چنانکه در مطالعات فوق‌الذکر، اکثر اثرات کافئین بر سلول‌های تحت سلطان یا گلیوما مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته که کافئین همچون یک عامل ضدسرطانی سبب تسريع در مرگ سلولی در این بدخیمی‌ها شده است (در پژوهش حاضر نیز بافت مورد بررسی در یک وضعیت میوباتی قرار داشت). با این همه، رحیمی و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثرات مصرف کافئین (۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) بر آپوپتوز ناشی از یک جلسه تمرین حاد در مردان تمرین کرده مقاومتی کار به کاهش در میزان *Bax* و افزایش در *Bcl-2* در وضعیت کافئینی در مقایسه با گروه دارونما پس از تمرین اشاره داشتند (۸). این در حالی است که، اثرات محافظتی تمرینات بدنی بر میزان آپوپتوز به خوبی به اثبات رسیده است. بطور نمونه، مرادی و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی تأثیر ۸ هفته تمرینات تناوبی شدید (HIIT) با شدت ۸۵-۸۰٪ سرعت بیشینه بر بیان ژن‌های شاخص‌های آپوپتوزی در عضله قلبی موش‌های مبتلاه به دیابت نوع دو به کاهش در سطوح پروتئین‌های *Bax* و *p53* و افزایش در *Bcl-2* اشاره داشتند (۱۲). به علاوه، تنورساز و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه اثرات چهار هفته تمرین هوایی میان‌مدت با سرعت ۱۵-۱۸ متر بر دقیقه و بمدت ۴۴-۲۵ دقیقه در ۵ جلسه در هفته در موش‌های دیابتی شده متعاقب تزریق درون صفاقی استرپتوکوکسین به کاهش معنی‌دار در سطوح لیگاند *Fasl* و افزایش ۳۱٪ در سطوح *Bcl-2* در گروه دیابت با تمرین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید (۲۵). این در حالی است که برخلاف نتایج مطالعات مذکور، برخی از پژوهش‌ها اشاره به تسريع فرآیند آپوپتوز و افزایش در بیان پروتئین‌های دخیل در مرگ آپوپتوزی یا عدم تأثیر تمرینات جسمانی دارند. در این راستا، جاوید تبریزی و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه ۱۲ هفته برنامه تمرینی با شدت $VO_{2\max}$ ۸۰-۷۵٪ به افزایش سرعت ۲۳-۲۴ متر در دقیقه با شبیه ۱۵٪ به افزایش

on CD4 Lymphocyte Apoptotic and Autophagic Responses to Hypoxic Stress in Sedentary Men. *PLoS One.* 2013;8(11):e80248.

12. Moradi A, Hosseini SA, Masoud Nikbakht M. Anti-apoptotic Effects of Interval and Continued Training and Crocin on the Muscle Tissue of the Rats with Type II Diabetes Induced by a High-fat Diet. *J Nutr Fast Health.* 2019; 7(3):130-137.

13. Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. Effect of 12 Weeks of Treadmill Aerobic Training on Cytochrome c and Caspase-9 gene Expression in Cardiac Muscle of Male Rats. *Qom Univ Med Sci J.* 2017;11(6):1-9.

14. Rani Sasidharan S, Allan Joseph J, Anandakumar S, Venkatesan V, Nair Ariyattu Madhavan Ch, Agarwal A. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *BioMed Res Int.* 2013;752870; 1-9.

15. Asgari Hazaveh D, Riyahi Malayeri S, Babaei S. Effect of Eight Weeks High Intensity Interval Training and Medium Intensity Interval Training and Aloe vera Intake on Serum Vaspin and Insulin Resistance in Diabetic Male Rats. *AMUJ.* 2018;20(11):67-75.

16. Sinha RA, Farah BL, Singh BK, Siddique MM, Li Y, Wu Y, et al. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology.* 2014;59(4):1366-80.

17. Parhadi H, Siahkohian M, Lotfali B, Pouran K. Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats. *J Sport Biomotor Sci.* 2016;2(16):70-79.

18. Pistrutto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies. *Aging (Albany NY).* 2016 Apr;8(4):603-19.

19. Woo SM, Min KJ, Seo BR, Nam JO, Choi KS, Yoo YH, Kwon TK. Cafestol overcomes ABT-737 resistance in Mcl-1-overexpressed renal carcinoma Caki cells through downregulation of Mcl-1 expression and upregulation of Bim expression. *Cell Death Dis.* 2014;6;5:e1514.

20. Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Exp Hematol Oncol.* 2015;11;4:5-15.

21. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/ Akt/ mTOR/ p70S6K inhibition. *Autophagy.* 2011;7(2):176-87.

22. He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res.* 2003;1;63(15):4396-401.

23. Zarghami-Khameneh A, Jafari A. The effect of different doses of caffeine and a single bout of

تخصصی آقای علی ضرغامی خامنه دانشجوی گرایش بیوشیمی و متابولیسم ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز می باشد. بخشی از هزینه طرح حاضر توسط معاونت پژوهشی و تحصیلات تكمیلی دانشگاه تبریز تأمین شده است. از اینرو، نویسندها از حامیان مالی و مدیریت آزمایشگاه حیوانی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز و همچنین شرکت سامانه یاخته پژوهان سارا کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

1. Li S, Wang J, Zhang B, Li X, Liu Y. Diabetes Mellitus and Cause-Specific Mortality: A Population-Based Study. *Diabetes Metab J.* 2019;43:319-341.
2. Harvey PA, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *JCB Home.* 2011;194(3):355.
3. Xiong FY, Tang ST, Su H, Zhu HQ. Melatonin ameliorates myocardial apoptosis by suppressing endoplasmic reticulum stress in rats with long-term diabetic cardiomyopathy. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):374-381.
4. Preedy VR. Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects. Royal Soc Chem UK. 2015.p:58-69.
5. Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine Induces Cell Death via Activation of Apoptotic Signal and Inactivation of Survival Signal in Human Osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2008;9(5):698–718.
6. Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):2445–2454.
7. Cui WQ, Wang ST, Pan D, Chang B, Sang LX. Caffeine and its main targets of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2020 Feb 15;12(2):149-172.
8. Rahimi MR, Khabiri P, Faraji H. Effects of caffeine ingestion on resistance exercise-induced apoptosis in athletes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Progr Nutr.* 2018;20(4):563-9.
9. Wang L, Lu L. Pathway-Specific Effect of Caffeine on Protection against UV Irradiation-Induced Apoptosis in Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(2):652–660.
10. Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 2008;432(2):146-50.
11. Weng TP, Huang SC, Chuang YF, Wang JS. Effects of Interval and Continuous Exercise Training

resistant-exhaustive exercise on muscle damage indices in male volleyball players. Feyz. 2014;18(3):220-228.

24. Jafari M, Rabbani A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. Metabolism. 2004;53(6):687-92.

25. Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of Mid-Term of Aerobic Exercise on Apoptosis Biomarkers in the Cardiomyocytes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Fasa Univ Med Sci. 2018;7(4):488-497.

26. Safarzadeh Gargari S Homai M, Mousavi Z. Effects of continues exercise on BAX and BCL-2 heart proteins following by different dos of H₂O₂ consumption in rat male. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2018;26(4):363-73.

27. Shirpour Bonab S, Azarbajani M.A, Peeri M, Farzanegi P. Effect of high intensity interval training with curcumin on gene expression of Bax, Bcl- 2, and Caspase- 3 in aged female rat hepatocytes. Rep Health Care. 2017;3(3):8- 14.