

Response of cardiac apoptosis proteins to eight-week aerobic training and caffeine supplementation in male Wistar rats

Mohammadrahman Rahimi^{1*}, Shamseddin Ahmadi², Hasan Faraji³, Bahareh Amiri⁴

Receive 2023 February 24; Accepted 2023 April 30

Abstract

Aim: Endurance exercise and caffeine consumption modulate cardiac cell signaling pathways; however, the interactive effects of these interventions on the expression of apoptosis-regulating proteins in myocardial tissue have not yet been fully elucidated. The present study aimed to investigate the effects of eight weeks of endurance training and caffeine supplementation on cardiac apoptosis factors (BAX, BCL2, P53, Caspase3, and miR-499) in male Wistar rats. **Methods:** Thirty-two rats were divided into four groups: control (ND), caffeine (ND+CAF), endurance training (ND+ET), and combined training + caffeine (ET+CAF). The caffeine groups received 6 mg/kg/day of caffeine via oral gavage. Endurance training was performed on a treadmill for eight weeks (five sessions per week), with intensity increasing from 12 m/min (15 min) in the first week to 27 m/min (60 min) by the eighth week. The relevant factors were measured using Western blot and Real time PCR methods. One Way-ANOVA test was used and Tukey's post hoc test was used to compare the two groups. **Results:** The results showed that the level of proapoptotic protein BAX was higher in the caffeine group, while it was lower in the endurance training group and the combination of training and caffeine group ($P=0.001$). Also, the level of antiapoptotic protein BCL2 was higher in the combination of training and caffeine group ($P=0.001$). The expression level of miR-499 in the endurance training group and the combination of training and caffeine group was higher than that in the control group ($P=0.001$), and caspase 3 was lower in all groups than in the control group ($P=0.001$), but it had no significant effect on P53 ($P=0.873$). **Conclusion:** endurance training effectively mitigates cardiac apoptosis, and when combined with caffeine supplementation, it enhances anti-apoptotic signaling—indicating a synergistic cardioprotective effect mediated by BCL-2 upregulation, miR-499 activation, and suppression of caspase-dependent apoptotic pathways.

Keywords: Response of cardiac apoptosis proteins to eight-week aerobic training



Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Humanities and Social Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran. *(Corresponding author): r.rahimi@uok.ac.ir
2. Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran.
3. Department of Physical Education and Sport Sciences, Mari.C. Islamic Azad University, Marivan, Iran,
4. Ph.D student of Physical Education, Department of Exercise Physiology, Faculty of Humanities and Social Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran.

Cite as: Rahimi, Mohammadrahma. Ahmadi, Shamseddin. Faraji, Hasan. Amiri, Bahareh. Response of cardiac apoptosis proteins to eight-week aerobic training and caffeine supplementation in male Wistar rats. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. ????. ?(In press): ?-??.

Owner and Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

Journal ISSN (online): 2676-6507

Access Type: Open Access

DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28273.1543



Copyright ©The authors

Publisher: University of Tabriz

Extended abstract

Background

Apoptosis is a natural mechanism for the elimination of unwanted cells from the body and plays a fundamental role in organismal growth and tissue homeostasis. Resistance to apoptosis by dysregulation of the mitochondrial pathway controlled by BCL2 members is a hallmark of cancer (1). Studies have shown that exercise training is effective in reducing cardiac mitochondrial proapoptotic proteins (2). In another study, prolonged moderate-intensity aerobic exercise was shown to reduce apoptosis, and the extent to which supplementation reduced apoptosis was dose-dependent (3). Apoptotic processes may be affected by a number of pharmacological and dietary interventions (4-6). Caffeine is the most widely consumed drug worldwide (7). Caffeine is a multifunctional drug that has the ability to induce programmed apoptotic cell death (8). It appears that caffeine has dual effects on tissue function and modulates the cell death life cycle (9).

Materials and Methods

The research was an experimental and applied study. 32 male Wistar rats with an average age of eight weeks and a weight of 181±15 grams were obtained from the Pasteur Institute of Karaj. At the age of eight weeks and maintained for one week in the Animal Physiology Laboratory of the Islamic Azad University of Zanjan.

Experimental design

Rats were randomly divided into four groups of eight: control normal diet (ND), normal diet + caffeine supplement (ND + CAF), exercise (normal diet + endurance exercise) (ND + ET), and endurance exercise + caffeine supplement (ET + CAF), and they had free access to water and food. This study was conducted with a post-test design with a control group and in compliance with all ethical principles of working with laboratory animals according to the Helsinki Declaration, in the Research Ethics Committee of the University of Kurdistan with the ethics code IR.UOK.REC.1401.018.

Training protocol

Caffeine supplementation: Supplementation was given daily according to the weight of the rats and at a dose of 6 mg/kg of body weight, for eight weeks in the relevant groups by oral gavage (10-11).

Endurance training: Endurance training (eight weeks, five sessions per week) was performed on a treadmill for rodents. The running speed and duration in the first week of the study were 12 m/min and 15 min, respectively, and in the last week it reached 27 m/min and 60 min.

Extraction of laboratory animal tissue: To collect the samples, the animals were anesthetized with a combination of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) by intraperitoneal injection. Then the brain was removed with utmost care by cutting the skull of the animal. The brain was then washed in physiological serum. The other samples were immediately frozen using liquid nitrogen and transferred to the freezer at -80 for further measurements.

Assessment of studied factors: Western blot and RT-PCR methods were used to measure the levels of apoptotic proteins, and statistical analysis was performed using the ANOVA method and Grafpad prism software..

Statistical analysis

After collecting data and calculating the mean and standard deviation of data using descriptive statistics, Shapiro Wilk test was used to determine the normal distribution of data. In the related variables, one-way ANOVA test was used for comparison between groups and control group and then Tukey's post hoc test was used to compare the differences between groups.

Results

The results of the one-way analysis of variance test showed that there was a significant difference in the levels of BAX protein ($P=0.001$), BCL2 ($P=0.001$), Caspase 3 ($P=0.001$), and miR-499 ($P=0.001$) in the study groups. There was no significant difference in the levels of p53 ($P=0.8734$) in the study groups.

Discussion

The present study was conducted to investigate the response of cardiac apoptosis proteins to eight weeks of aerobic training and caffeine supplementation in male Wistar rats. The findings of this study showed that endurance training and the combination of endurance training with caffeine supplementation can affect the apoptotic proteins BAX, BCL2 and Caspase 3 and also significantly increase the expression of miR-499 in the heart tissue of male Wistar rats. In this study, the level of the apoptotic protein BAX was significantly increased by both endurance training and caffeine consumption, on the other hand, caffeine supplementation with endurance training increased BAX in the heart tissue of rats. The findings of this study showed a significant decrease in the level of the apoptotic protein Caspase 3 in the endurance training group.



with caffeine supplementation compared to the normal food group and the normal food group with caffeine supplementation alone, but in this study, no significant difference was observed in the levels of p53 in the groups under study. On the other hand, in this study, miR-499 in the cardiac tissue of male Wistar rats in the endurance exercise group with caffeine supplementation showed a significant increase compared to the normal diet, normal diet with caffeine supplementation, and normal diet with endurance training groups.

Article message

The findings of this study showed that eight weeks of endurance training, both alone and in combination with caffeine supplementation, can be effective on the apoptotic responses of cardiac tissue in male Wistar rats. Endurance training can regulate and modulate cardiac apoptosis by increasing the levels of BCL2 and miR-499 proteins and decreasing the apoptotic proteins BAX and Caspase 3 in cardiac tissue. In general, it seems that endurance training with caffeine consumption can have anti-apoptotic effects on the cardiac tissue of rats. However, in normal and normal conditions, it is recommended to use an appropriate dose of caffeine supplementation and to accompany it with exercise training.

Im press



مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال ؟، شماره ؟

؟ و ؟؟؟؟ صفحات ؟-؟؟

Open Access

مقاله پژوهشی

پاسخ پروتئین های آپوپتوز قلبی به تمرینات هوازی هشت هفته ای و مصرف مکمل کافئین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار

محمدرحمان رحیمی^{۱*}، شمس الدین احمدی^۲، حسن فرجی^۳، بهاره امیری^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

چکیده

هدف: ورزش هوازی و مصرف کافئین مسیرهای سیگنالینگ سلولی قلب را تعدیل می کنند؛ با این حال، اثرات تعاملی این مداخلات بر بیان پروتئین های تنظیم کننده آپوپتوز در بافت میوکارد هنوز به طور کامل روشن نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی و مکمل کافئین بر فاکتورهای آپوپتوز قلبی (BAX، BCL2، P53، Caspase3 و miR-499) در رت های نر ویستار انجام شد. **روش پژوهش:** ۳۲ رت به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل (ND)، کافئین (ND+CAF)، تمرین استقامتی (ND+ET)، و ترکیب تمرین و کافئین (ET+CAF). گروه های دریافت کننده کافئین، روزانه ۶ میلی گرم بر کیلوگرم کافئین به صورت گاواژ مصرف کردند. تمرین استقامتی به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته روی تردمیل انجام شد و شدت آن از ۱۲ متر/دقیقه (۱۵ دقیقه) در هفته اول به ۲۷ متر/دقیقه (۶۰ دقیقه) در هفته هشتم افزایش یافت. اندازه گیری فاکتورهای مربوطه با روش های وسترن بلات و Real time PCR انجام شد. از آزمون One Way-ANOVA و برای مقایسه دو گروه از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. **یافته ها:** نتایج نشان داد که سطح پروتئین پیش آپوپتوز BAX در گروه کافئین بالاتر بود، در حالی که در گروه تمرین استقامتی و گروه ترکیب تمرین و کافئین پایین تر بود ($P=0/001$). همچنین، سطح پروتئین ضد آپوپتوز BCL2 در گروه ترکیب تمرین و کافئین بالاتر بود ($P=0/001$). میزان بیان miR-499 در گروه تمرین استقامتی و گروه ترکیب تمرین و کافئین بالاتر بود و کاسپاز ۳ در همه گروه ها پایین تر از میزان آن در گروه کنترل بود ($P=0/001$)، اما تأثیر معناداری بر P53 نداشت ($P=0/873$). **نتیجه گیری:** تمرین استقامتی به طور مؤثر آپوپتوز قلبی را کاهش می دهد و هنگامی که با مکمل کافئین ترکیب شود، سیگنالینگ ضد آپوپتوز را افزایش می دهد - که نشان دهنده یک اثر محافظتی قلبی سینرژیک است که با تنظیم افزایشی BCL-2، فعال سازی miR-499 و سرکوب مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپاز ایجاد می شود.

واژه های کلیدی: تمرین استقامتی، مکمل کافئین، آپوپتوز

نحوه ارجاع: رحیمی، محمدرحمان، احمدی، شمس الدین، فرجی، حسن، امیری، بهاره " پاسخ پروتئین های آپوپتوز قلبی به تمرینات هوازی هشت هفته ای و مصرف مکمل کافئین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار ". مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش. ؟؟؟؟؟؟ (؟) -؟؟.؟؟.

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

شاپای الکترونیکی: ۶۵۰۷-۲۶۷۶

نوع دسترسی: آزاد

DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28273.1543



با اسکن QR فوق می توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/ مشاهده کنید

۱. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران. (نویسنده مسئول): r.rahimi@uok.ac.ir
۲. استاد فیزیولوژی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران.
۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد مریوان، دانشگاه آزاد اسلامی، مریوان، ایران.
۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران.



Copyright ©The authors

Publisher: University of Tabriz

مقدمه

در یک روش این کنترل به واسطه رونویسی از ژنهای خاص انجام می شود و در روش دیگر این کنترل از مسیرهای غیروابسته به رونویسی صورت می گیرد. در مسیر وابسته به رونویسی، ژن های متعددی وجود دارند که در مرگ سلولی نقش داشته و توسط P53 بیان می شوند مانند BAX، CD95/FAS/Apo1، که توانایی القاء مرگ سلولی را دارند، PIG که در تنظیم شوک های اکسایشی نقش دارند و خانواده ژنی TNF-Receptor که حاوی پیام مرگ هستند. بخش دوم مسیر درونی آپوپتوزیس سلولی، مربوط به استرس روی شبکه رتییکلوم اندوپلاسمیک/سارکوپلاسمیک است و افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی از این شبکه با فعال کردن کالپاین ها و فعال کردن کاسپاز ۱۲ و سپس کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می شود [۲۲]. بنابراین سازوکار آپوپتوزیس با واسطه رتییکلوم اندوپلاسمیک/سارکوپلاسمیک، مستقل از مسیر لیگاند-گیرنده و مسیر میتوکندریایی می باشد [۲۳]. کالپاین ها با افزایش Bid و ایجاد استرس روی میتوکندری موجب افزایش رهاسازی سیتوکروم c و در نهایت کاسپاز ۹ می شود [۲۴]. استرس روی شبکه رتییکلوم اندوپلاسمیک/سارکوپلاسمیک با سرکوب BCL2 موجب ایجاد استرس روی میتوکندری و در نهایت افزایش کاسپاز ۹ می گردد [۲۲]. علاوه بر این، کاسپاز ۱۲ موجب فعال شدن کاسپاز ۹ مستقل از عامل Apaf-1 شده [۲۲، ۲۴] و استرس وارد شده بر شبکه رتییکلوم اندوپلاسمیک/سارکوپلاسمیک موجب افزایش استرس اکسیداتیو و تغییرات میتوکندری می شود که این روند با افزایش بیان BCL2 سرکوب می شود [۲۴]. پروتئین های خانواده BCL2 تنظیم کننده اصلی آپوپتوزیس سلولی هستند [۲۵]. پروتئین های ضدآپوپتوتیک، آپوپتوزیس را با جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری، تنظیم می کنند، پروتئین های پیش آپوپتوتیک موجب تسریع رهاسازی آن می شوند [۱۹، ۲۶]. ۲. مسیر بیرونی یا مسیر گیرنده های مرگ که این مسیر بدنال لیگاند پوشی گیرنده های خانواده TNF آغاز شده و منجر به فعال سازی کاسپاز ۸- و در نهایت کاسپاز ۳- می گردد. نقش مسیرهای وابسته به کاسپاز در آپوپتوزیس بسیار اهمیت دارد و نقش اصلی در فرایند آپوپتوزیس است. در این مسیر، فرایند از رسپتورهای مرگ شروع می شود که با فعال شدن مستقیم کاسپازها ادامه می یابد و در برخی از موارد ممکن است از میتوکندری هم به عنوان واسط استفاده شود. در مسیر خارجی پیام های مرگ (نظیر TNF- α ، IL-1 β یا FasL) به گیرنده های مرگ غشای سلول (Fas (TNFR1, TNFR2, TRAIL Fas) متصل شده و موجب فعال سازی پروکاسپاز ۸، کاسپاز ۸ و متعاقبا کاسپاز ۳ و در نهایت آپوپتوزیس سلولی می گردند [۲۵]. لیگاند مهم در این مسیر عبارتند از لیگاند Fas (FasL) که به گیرنده Fas متصل می شود و گروه TNF ها که مهمترین آنها TNF- α که به گیرنده TNFR متصل می گردد [۲۷]. Fas یک رسپتور مرگ است. لیگاندهای Fas با اتصال به گیرنده Fas باعث اولیگومریزه شدن و القاء تغییرات کونفورماسیون در این رسپتور شده که در نهایت منجر به فعال شدن FADD می شود. FADD فعال شده به اولیگومرهای پروکاسپاز ۸ متصل شده و احتمالا از طریق افزایش غلظت موضعی و اتو پروتئولیز باعث فعال شدن

مرگ سلولی نقش مهم و اساسی در کنترل فیزیولوژی طبیعی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می کند. اگرچه به طور معمول مرگ سلولی برای سهولت به دو دسته مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) و مرگ تصادفی (نکروز) تقسیم بندی می شود، اما بر اساس یک طبقه بندی جدید، حدود ۱۱ نوع مرگ سلولی شناسایی شده است که از جمله می توان به آپوپتوزیس، نکروزیس، اتوفازی، انکوزیس^۲ و پیروپتوزیس^۳ اشاره کرد. [۱]. آپوپتوز یک مکانیسم طبیعی برای حذف سلول های ناخواسته از بدن است و نقش اساسی در رشد ارگانیسم و هموستاز بافت دارد. مقاومت در برابر آپوپتوز توسط بی نظمی مسیر میتوکندری کنترل شده توسط اعضای BCL2 یکی از مشخصه های سرطان است [۱۳]. چهار سیستم اصلی در راه اندازی آپوپتوزیس سلولی نقش دارند: ۱- مسیرهای انتقال سیگنالها که انتقال سیگنالهای فوق باعث آغاز فعال شدن آبشاری آنزیم هایی بنام کاسپاز می گردد. کاسپازها را به دو گروه کلی تقسیم می کنند (۱۳، ۱۴): کاسپازهای آغازگر/ سیگنال دهنده و کاسپازهای اجرا کننده/ اثرکننده [۱۴]. ۲- مسیر آسیب سلولی: رادیکالهای آزاد، آنوکسی سلولی، افزایش سطح کلسیم آزاد داخل سلولی باعث آپوپتوزیس می شوند [۱۵]. ۳- آسیب DNA/p53-p73. اگر این مسیر داخل هسته ای با موفقیت انجام نشود، در آن صورت پروتئین p53 باعث تغییر و آغاز رونوشت برداری فاکتورهای کمک کننده آپوپتوزیس خواهد شد [۱۶]. ۴- مسیر آسیبهای غشاء سلولی باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و در نهایت تولید عامل سرآمدی از ترکیبات لیپیدی غشاء سلول می شود. عامل سرآمدی سپس با ایجاد سیگنال موجب آپوپتوزیس می گردد [۱۷]. در تقسیم بندی های دیگر، بطور کلی، مسیرهای درگیر در تحریک فرایند آپوپتوز را به دو دسته تقسیم می کنند: مسیر درونی یا مسیر میتوکندریایی که توسط خانواده BCL2 کنترل می شود و با فعال سازی Bax/Bak منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندریایی می گردد. در این مسیر محوریت میتوکندری در ایجاد آپوپتوزیس بیشترین اهمیت را دارد [۴-۶]. شرایط استرس زا موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن شده و سیتوکروم c، که در غشای داخلی میتوکندری و فضای بین غشایی قرار دارد بداخل سیتوزول آزاد شده، به فاکتور ۱ پروتاز فعال کننده آپوپتوزیس Apaf-1 متصل شده و ترکیبی بنام dATP تشکیل می دهد. سپس به ترتیب، از طریق فعال سازی پروکاسپاز ۹، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می شود [۱۸]. مهمترین مرحله کنترل این مسیر، آزاد سازی سیتوکروم c است. پروتئین های مهارکننده مسیر مرگ سلولی مانند BCL2 و Bcl-XL مانع آزاد سازی سیتوکروم c شده و به این ترتیب نقش خود را ایفا می کنند [۱۹]. کاسپاز ۸ از طریق مسیر BID و سپس tBID با افزایش پروتئین پیش آپوپتوزیسی BAK موجب افزایش رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری می شود [۲۰، ۲۱]. میتوکندری همچنین از طریق مسیر غیرکاسپازی و با رها کردن عامل اندونکلوژاز G (EndoG) و فاکتور شروع آپوپتوزیس (AIF) موجب اثر بر هسته و گسستگی DNA می شود [۵]. در این مسیر P53 به دو طریق فرایند مرگ برنامه ریزی شده را کنترل می کند،

*B-cell lymphoma

۱- Autophagy

♂. Sphingomyelinase

۲- Oncosis

♂Apoptotic peptidase activating factor 1

۳- Pyroptosis



کلسینورین و کاهش فعال سازی Drp1 از تقسیم میتوکندری جلوگیری می کند و در نتیجه یکپارچگی میتوکندری را حفظ و آپوپتوز را محدود می کند [۳۴]. گزارش شده است که احتمالاً تمرین هوازی همراه با مکمل ها می تواند آثار مخرب روغن های حرارت دیده عمیق را بر بیان ژن وابسته به تخریب عضله قلب کاهش داده و موجب بهبود دگرگونی ساختار میوسیت شود [۳].

اکثر مطالعات صورت گرفته به بررسی تاثیر تمرینات کوتاه مدت بر فرایند آپوپتوز پرداخته اند. اما تاثیر تمرینات بلند مدت ۳ ماه فعالیت بر فرایند آپوپتوز مشخص نیست. از آنجایی که تغییرات آپوپتوز وابسته به زمان می باشد، ضرورت وجود تحقیقات طولانی تر ضروری به نظر می رسد. وقتی که سطوح کاسپازها کاهش پیدا می کند منجر به رشد تومور می شود و تمرین هوازی می تواند بیان کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ را افزایش دهد که منجر به کاهش سرطان می شود (۸). از طرفی پژوهش ها به اثرات حفاظتی تمرینات ورزشی بر عوارض کاردیومیوپاتی اشاره دارد (۱۶). با بررسی تأثیر ۸ هفته تمرینات تناوبی شدید (HIIT) با شدت ۸۰-۸۵ سرعت بیشینه بر بیان ژنهای شاخص های آپوپتوزی در عضله قلبی موشهای مبتلا به دیابت نوع دو به کاهش در سطوح پروتئین های Bax و p53 و افزایش در BCL2 گزارش شد (۱۷). این در حالی است که برخلاف نتایج پژوهش های مذکور، برخی از پژوهشها اشاره به تسریع فرایند آپوپتوز و افزایش در بیان پروتئینهای کاسپازی متعاقب تمرینات ورزشی دارند. در ۱۲ هفته برنامه تمرینی با شدت ۸۰-۷۵ VO2max (با سرعت ۳۳-۲۴ متر در دقیقه با شیب ۱۵٪) به افزایش در بیان ژنهای سیتوکروم و کاسپاز ۹- در عضله قلبی موشهای صحرایی نر ویستار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (۱۸).

فرایندهای آپوپتوتیک ممکن است توسط برخی از مداخلات دارویی و خوراکی مورد تأثیر قرار گیرد (۹). کافئین بیشترین مصرف دارویی را در سراسر جهان دارد [۸]. کافئین دارویی چند عملکردی است که توانایی القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده آپوپتوزی را دارد (۱۳). براساس پژوهش های پیشین شواهدی وجود دارد که مصرف کافئین باعث افزایش برون ده کار عضلانی می شود. تحقیقات دانشمندان آمریکایی نیز اثرات کافئین، کوکائین، الکل، استرکینین و نیتروگلیسرین را بر عملکرد شناگران بررسی کردند و یافته های آن ها نشان داد که کافئین تنها مداخله ای بود که سبب افزایش عملکردهای طولانی مدت شد [۳۸]. پژوهش ها نشان دادند که اثرات ارگوژنیک کافئین بر ورزش های کوتاه مدت و فعالیت های با شدت بالا سازگاری کمتری دارد. اگرچه یکی از پژوهش های مروری اخیر نشان داد که در حدود ۵۰٪ از پژوهش ها تأثیر مثبتی داشته اند [۳۹]. تمرینات تناوبی با شدت بالا به همراه مصرف کافئین، می تواند اثرات محافظتی بر قلب رت داشته باشد و از بروز آسیب های قلبی جلوگیری کند [۴۰]. اگرچه پژوهش های پیشین به خوبی به دامنه گسترده ویژگی های فیزیولوژیک کافئین اذعان داشته اند، با این حال کافئین در مواجهه با شرایط پاتولوژیک می تواند همانند یک شمشیر دولبه عمل کرده و نقش دوگانه ای داشته باشد، به این شکل که هم می تواند مسیرهای پیام رسانی بقا و محافظت سلولی را فعال کند و هم القاکننده مسیرهای مرگ سلولی باشد [۴۱، ۴۲]. کافئین ممکن است بر عملکرد بافتی اثر بگذارد و چرخه زندگی - مرگ سلولی را نیز تعدیل می کند [۴۳]. کافئین و سایر داروهای القاکننده اتوفازی ممکن است ابزارهای درمانی قلبی عروقی جدیدی را برای محافظت در برابر تنگی مجدد پس از آنژیوپلاستی و آسیب های عروقی در قلب نشان دهند [۴۴].

رحیمی و همکاران، مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش.؟؟؟؟؟ (؟)؟-؟

کاسپاز ۸ می شود [۲۸]. کاسپاز ۸ هم که خود جزء کاسپازهای اولیه است، توانایی شروع آبشار کاسپازی و شروع مرگ برنامه ریزی شده را دارد. مسیر مشابهی برای TNF نیز وجود دارد. حذف کارآمد سلول های آپوپتوزی نقش

مهمی در ایجاد ساختارهای سه بعدی، هموستاز و حذف سلول های غیر معمول، مضر و غیر عملکردی، ایفا می کند.

پژوهش های انجام شده در ارتباط بین فعالیت بدنی و انواع میکروRNAها اندک است. اما همین یافته ها نشان دهنده اثر فعالیت بدنی بر بیان و غلظت میکروRNAها بوده و به دنبال آن، تغییرات در میکروRNAها سبب ایجاد سازگاری های ناشی از فعالیت بدنی می شود [۲۹]. انواع مختلف ورزش و فعالیت بدنی القاکننده محرک های مکانیکی، هورمونی و متابولیکی هستند که منجر به سازگاری تقریباً در هر بافت و نوع سلولی می شود. پژوهش های اخیر نشان داده است که هم ورزش کوتاه مدت و هم ورزش بلندمدت اصلاح کننده های اپی ژنتیکی بالقوه از جمله متیلاسیون DNA، تغییرات هیستون پس از ترجمه و بیان میکروRNAها هستند که ژنوم عملکردی را در گامت ها، عضلات، خون و سلول های چربی در سلول های سیستم قلبی-عروقی و بافت مغز تغییر می دهند.

مطالعات مربوط به miR-208b و miR-499 به این نتیجه رسیدند که پیشینه قومیتی و ژنتیکی بر افزایش سطح miRNAها تأثیر نمی گذارد، سطح هر دو نشانگر زیستی به طور مثبت با شدت تنگی عروق کرونر مطابقت دارد، و miRNAها ممکن است داده هایی را در مورد پیش آگهی این بیماری ارائه دهند [۳۰]. برخی از miRNAs فقط در بافت عضلانی بیان می شوند و آن ها را myomiRs می نامند. از جمله این myomiRs می توان به miR-1، miR-133، miR-206 و miR-499 اشاره کرد که در شماری از فرایندهای عضلانی درگیرند [۳۱]. myomiRs می توانند عملکرد قلب (مانند هدایت سیگنال های الکتریکی قلب، رشد، ساختار و انقباض عضله قلب) را تنظیم کنند. این عناصر در بیماری های قلبی نیز تأثیر دارند و حتی ممکن است با دستکاری آنها بتوان به راه حل های درمانی دست یافت [۳۲]. یکی از این myomiRs موجود در اینترون ۱۹، ژن myh7b، miR-499 است [۳۳]. در شرایط پاتولوژی قلب و همچنین ایسکمی، میزان بیان miR-499 کاهش می یابد. اما ناک دان کردن بیان درونزای miR-499 بر ساختار و عملکرد قلب اثر گذار است. amiR-499 تقسیم میتوکندری ها در قلب را تسهیل می کند [۳۴] و می تواند در درمان نارسایی قلبی اثر مثبتی داشته باشد [۳۵]. تحقیقات اخیر نشان داده است که miR-499 با تعدیل محور سیگنالینگ BCL-2/BAX و سرکوب فعال سازی کاسپاز-۳ نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز ایفا می کند. نشان داده شده است که بیان بیش از حد miR-499 در کاردیومیوسیت های در معرض هیپوکسی/اکسیژن رسانی مجدد یا استرس اکسیداتیو، بیان پروتئین ضد آپوپتوز BCL-2 را به طور قابل توجهی افزایش می دهد، در حالی که سطح BAX پیش ساز آپوپتوز و کاسپاز-۳ شکسته شده را کاهش می دهد و در نتیجه مرگ سلولی را کاهش می دهد [۳۶]. این اثرات تا حدودی از طریق مهار ژن های هدف پیش ساز آپوپتوز مانند SOX6، PDCD4 و PACS2 توسط miR-499 رخ می دهد که واسطه اختلال عملکرد میتوکندری و سیگنالینگ آپوپتوز هستند [۳۷] (لی و همکاران، ۲۰۱۶). علاوه بر این، miR-499 با هدف قرار دادن

تشریح و نمونه برداری: پس از متغیر مستقل اعمال شد و همه گروه ها در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه مکمل یاری) و با شرایطی کاملاً مشابه، با داروی بیهوشی بیهوش شدند. در بیهوشی رت ها از ترکیب کتامین ساخت کشور بلژیک به میزان ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم استفاده شد. پس از اطمینان از بیهوشی حیوانات، قفسه‌ی سینه حیوان شکافته شده و بافت قلب جداسازی و در نیتروژن مایع هموژنیزه شد و با استفاده از بافر لیز کننده (حاوی: EDTA 0.003gr, Tris-HCL 500μL, PH=8, SDS 0.01gr, Sodium Deoxycholate 0.025gr, NaCL 0.08gr Triton(NP40((1%))10μl و Protease inhibitor cocktail 1tablet پروتئین های بافت جدا گردید. آن گاه نمونه ها در سانتریفیوژ مدل Eppendorph 5415 R با دمای چهار درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی شفاف حاوی پروتئین استخراج و در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

روش انجام آزمایش وسترن بلات: لیز شدن نمونه ها با ترکیبات مخصوص بافری و در سانتریفیوژ مدل Eppendorph 5415 R در دمای چهار درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع شفاف (Supernatant) حاوی پروتئین استخراج شده و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد که اساس آن تفاوت در جذب نور در طول موج ۶۳۰ در دستگاه است، استفاده شد. به کمک میانگین داده های بردفورد هر نمونه و همچنین داده های بالا و پایین منحنی استاندارد غلظت پروتئین و متعاقب آن آب و سمپل بافر برای ساخت نمونه تعیین شد. ایمونوبلاکینگ اجرا شد که طی آن باندهای پروتئینی جدا شده توسط ژل الکتروفور (SDS-page) به غشایی از جنس نیتروسلولوز یا PVDF انتقال یافته و سپس به وسیله آنتی بادی اختصاصی پروتئین های روی آن شناسایی می گردد. وقتی انتقال پروتئین ها بر سطح کاغذ PVDF پایان یافت، کاغذ به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ شیک شد. سپس کاغذ با آنتی بادی اولیه ای که با محلول بلاکینگ به مقدار معین آنتی بادی اولیه (sc-47778, 1: 300) مخلوط و رقیق شده و به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه و پس از آن کاغذ با آنتی بادی ثانویه Anti-Rabbit غلظت (۱:۱۰۰۰) برای تمام آنتی بادی های اولیه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شیک گردید. از β -actin برای برطرف کردن خطای لود کردن پروتئین ها به صورت مساوی در چاهک ها استفاده شد چون میزان بیان آن در سلول ثابت است.

روش اجرای Real Time PCR: طراحی پرایمر به وسیله نرم افزارهای runner Gene و BLAST انجام و به شرکت Copenhagen TAG سفارش داده شد تا بیان ژن انتخابی به روش PCR کمی، سنجش شود. به وسیله تراپزول GeneX استخراج RNA از نمونه های بافتی انجام و به وسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شدند تا از صحت استخراج اطمینان حاصل شود. آنگاه به کمک کیت سنتز cDNA، از روی تک رشته RNA تک رشته cDNA در دستگاه PCR سنتز شده و توالی های پرایمر سفارش داده شده با غلظت استوک ۱۰۰ μl/pmol رقیق شده و با سایر مواد همچون Mix Master، آب و نمونه (cDNA) ترکیب و در دمای Annealing مناسب (دمای به دست آمده از ران ستاپ) به طور Duplicate به وسیله دستگاه (Plus One Step) PCR Time-Real ABI آزمایش شدند. بعد از بررسی منحنی ذوب و

تحقیق پیش رو با توجه به وجود پژوهش های محدود و گاه متناقض، به بررسی پاسخ پروتئین های آپوپتوز قلبی به تمرینات هوازی هشت هفته ای و مصرف مکمل کافئین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار می پردازد.

روش پژوهش

تهیه و نگهداری حیوانات

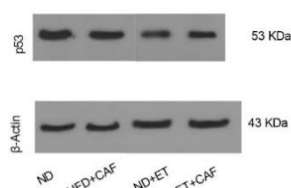
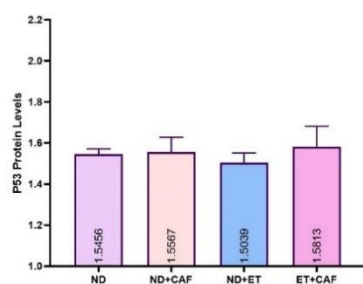
این پژوهش تجربی و از نوع کاربردی بود که با طرح پس آزمون همراه با گروه کنترل و با رعایت تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس معاهده هلسینکی، در کارگروه-کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه کردستان با شناسه اخلاق IR.UOK.REC.1401.018 انجام شد. ابتدا تعداد ۳۲ سر رت نر ویستار با میانگین سنی هشت هفته و وزن 181 ± 15 گرم از انستیتو پاستور کرج تهیه شد. شایان ذکر است که برای محاسبه حجم نمونه با توجه به پیشینه های موجود از مطالعات مشابه و حجم نمونه آن ها استفاده گردید [۴۵]. همچنین بر اساس پژوهش پاک کهر و مهرانیا (۲۰۲۴) برای محاسبه حجم نمونه در این تحقیق با توجه به روش آماری آنالیز واریانس یک راهه از فرمول $DFw = Nt - k = k.n - k = k(n - 1)$ استفاده شد؛ در این فرمول Nt نشان دهنده تعداد آزمودنی ها، k نشان دهنده تعداد گروه ها و n نشان دهنده تعداد نمونه در هر گروه بود [۴۷]. در تمام دوره پژوهش شرایط نگهداری به طور استاندارد یعنی نگهداری رت ها در گروه های چهارتایی در قفسه های پلی کربنات در محیط حیوان خانه استاندارد با میزان رطوبت 45 ± 5 ، دمای محیط 22 ± 2 درجه سانتی گراد، چرخه تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته، با کمترین سر و صدا و دسترسی آزاد به آب و غذای مربوطه انجام شد. نمونه ها در سن هشت هفتگی و نگهداری یک هفته ای در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، به طور تصادفی به چهار گروه هشت سری کنترل (ND)، مکمل کافئین (ND+CAF)، تمرین استقامتی (ND+ET) و تمرین استقامتی + مکمل کافئین (ET+CAF) تقسیم تقسیم شدند.

مکمل یاری کافئین: مکمل کافئین از شرکت سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا، خریداری شده و مکمل دهی به شکل روزانه با توجه به وزن رت ها و با دوز شش میلی گرم بر کیلوگرم از وزن بدن، به مدت هشت هفته در گروه های مربوطه به صورت گاوژ خوراکی مصرف شد [۱۰-۱۲].

تمرین استقامتی فرایند: برنامه تمرینی با توالی پنج جلسه دویدن روی نوارگردان در هشت هفته بود و تمام جلسات تمرینی در ساعات مشابهی از عصر در روزهای شنبه، یکشنبه، سه شنبه، چهارشنبه، جمعه اجرا شد. این پروتکل روی دستگاه نوارگردان از ۱۵ دقیقه در روز با سرعت ۱۲ متر در دقیقه با شیب صفر درجه شروع شده و به صورت هفتگی تا هفته چهارم پنج دقیقه بر مدت تمرین و سه متر بر دقیقه بر سرعت تمرین بر اساس اصل اضافه بار افزوده شد و از هفته چهارم به بعد ۱۰ دقیقه به زمان تمرین هر هفته اضافه شد و سرعت ثابت ۲۷ متر بر دقیقه حفظ گردید. سرعت دویدن در هر جلسه تمرین نیز ابتدا ۱۰ متر در دقیقه بود و هر دو دقیقه، سه متر در دقیقه بر سرعت آن اضافه شد. از هفته چهارم به بعد نیز در دقیقه ۱۰، سرعت دستگاه به ۲۷ متر در دقیقه رسید و در چهار هفته آخر، سرعت به ۲۷ متر در دقیقه افزایش یافت. در پایان هر جلسه تمرینی نیز ۳ دقیقه سرد کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه انجام شد و تا حد امکان در طول تمرین از شوک الکتریکی به لحاظ ملاحظات اخلاقی، کمتر استفاده شد و به جای آن از محرک صوتی استفاده گردید [۴۸].



▲ □

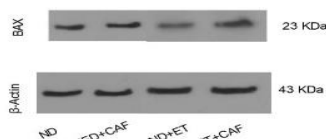
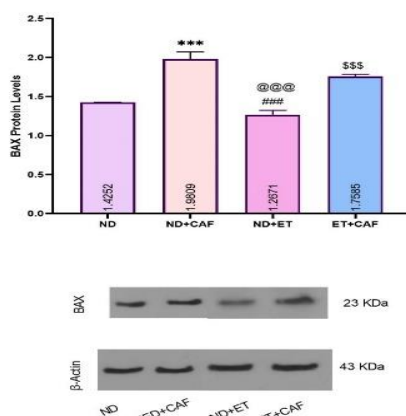


شکل ۱- میزان پروتئین P53 بافت قلب در گروه های آزمایشی

Figure 1- P53 protein levels in heart tissue in experimental groups

در این نمودار گروه کنترل با ND، گروه مصرف مکمل کافئین با ND+CAF، گروه تمرین استقامتی ND+ET و تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با ET+CAF نشان داده شده است.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان پروتئین آپوپتوزی BAX در بافت قلب گروه ND+CAF به طور معنی داری بیشتر از گروه ND بود ($P=0/001$)، همچنین گروه ND+ET نسبت به گروه ND این میزان به صورت معنی داری کمتر بود ($P=0/001$)، اما بین گروه های ND و ND+ET تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P=0/209$)، از طرفی میزان پروتئین آپوپتوزی BAX در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND+CAF به صورت معنی داری کمتر بود. ($P=0/040$) و در گروه ND+ET نسبت به گروه های ND+CAF و ET+CAF به صورت معنی داری کمتر بود ($P=0/001$). شکل ۲.



شکل ۲- میزان فاکتور آپوپتوزی BAX بافت قلب در گروه های آزمایشی

Figure 2- Levels of the apoptotic factor BAX in heart tissue in experimental groups

در این نمودار گروه کنترل با ND، گروه مصرف مکمل کافئین با ND+CAF، گروه تمرین استقامتی ND+ET و تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با

رحیمی و همکاران، مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش.؟؟؟؟؟،؟؟-؟.

تشکیل باند اختصاصی با اندازه صحیح صحت هر پرایمر بر روی ژل انجام شد. سپس با تعیین حد آستانه مناسب کمیت CT از دستگاه ریل تایم در قالب اکسل خارج شد. به وسیله CT حاصل از ژن U6 به عنوان ژن رفرنس، CT هر نمونه براساس رابطه $\Delta CT = CT (\text{Target}) - CT (\text{Reference})$ نرمال شد و برای سنتز cDNA از کیت / تکنیک Solis Bio Dyne و پروتکل Appendix C (cDNA-synthesis-kit) استفاده گردید و در آخر از دستگاه ABI step one plus و از کیت / تکنیک (Ampliqon SYBR green) (Appendix D) با حجم برای هر واکنش ۱۵ میکرولیتر استفاده شده و اجرا شد.

جدول ۱. توالی ژن Mir-499 و توالی ژن U6

Table 1. Mir-499 gene sequence and U6 gene sequence

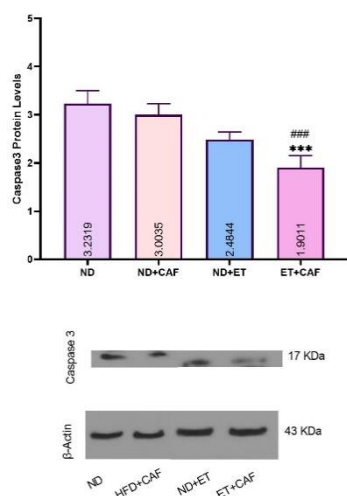
Mir-499-5p stem: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACTGGATACGACAA ACATC Mir-499-5p forward: AGCCACGCATTAAGACTTGC Reverse universal: GTGCAGGGTCCGAGGT	پرایمر توالی ژن :Mir-499
U6 F: GCAAGGATGACACGCAATTC U6 stem: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTTCGCACTGGATACGACAA AATATGG Reverse universal: GTGCAGGGTCCGAGGT	پرایمر توالی ژن :U6

روش های آماری: آمار توصیفی پژوهش شامل میانگین و انحراف استاندارد بود و توزیع طبیعی داده ها با آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. همچنین، تفاوت بین گروه ها با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی در نرم افزار GraphPad Prism بررسی شده و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه در جدول ۲ نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان پروتئین BAX ($P=0/001$)، BCL2 ($P=0/001$)، Caspase 3 ($P=0/001$) و miR-499 ($P=0/001$) در گروه های پژوهش مشاهده می شود. در گروه های مورد پژوهش در میزان p53 ($P=0/8734$) (شکل ۱) تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

نسبت به گروه ND+ET ($P=0/393$) و نیز گروه ET+CAF نسبت به گروه ND+ET ($P=0/294$) کمتر بود ولی تفاوت معنی دار نبود. شکل ۴.

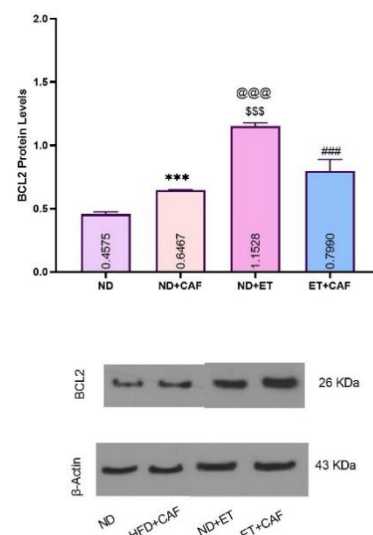


شکل ۴- میزان پروتئین Caspase 3 بافت قلب در گروه های آزمایشی
Figure 4- Caspase 3 protein levels in heart tissue in experimental groups

در این نمودار گروه کنترل با ND، گروه مصرف مکمل کافئین با ND+CAF، گروه تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با ND+ET و تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با ET+CAF نشان داده شده است. $***$ ($P=0/001$) کاهش معنی دار در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND: $####$ ($P=0/001$) کاهش معنی دار در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND+CAF.

نتایج آزمون تعقیبی توکی در شکل ۵ نشان داد میزان بیان miR-499 در بافت قلب در گروه ET+CAF نسبت به گروه های ND، ND+CAF و ND+ET به صورت معنی داری بالاتر بود. ($P=0/001$). همچنین در گروه ND+ET نسبت به گروه های ND و ND+CAF به صورت معنی داری بالاتر بود. ($P=0/001$). بین گروه های ND و ND+CAF تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P=0/969$).

اختصار ET+CAF نشان داده شده است. $***$ ($P=0/043$) افزایش معنی دار در گروه های ND+CAF نسبت به گروه ND: $####$ ($P=0/001$) کاهش معنی دار در گروه ND+ET نسبت به ND: $$$$$ ($P=0/001$) کاهش معنی دار در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND+CAF: $@@@$ کاهش معنی دار گروه ND+ET نسبت به گروه های ND+CAF و ET+CAF. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که مقدار پروتئین ضدآپوپتوزی BCL2 بافت قلب، در گروه ND+CAF نسبت به گروه ND به صورت معنی داری بالاتر بود. ($P=0/043$) و در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND به صورت معنی داری بالاتر ($P=0/001$) و در گروه ND+ET نسبت به گروه ND به صورت معنی داری بالاتر بود. ($P=0/001$). تفاوت معنی داری بین گروه های ND+CAF و ET+CAF مشاهده نشد و در گروه ND+ET نسبت به گروه های ET+CAF و ND+CAF به صورت معنی داری بالاتر بود. ($P=0/001$). شکل ۳.



شکل ۳- میزان پروتئین BCL2 بافت قلب در گروه های آزمایشی
Figure 3- BCL2 protein levels in heart tissue in experimental groups

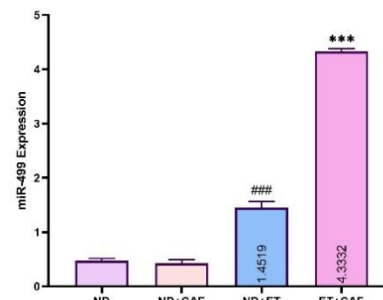
در این نمودار گروه کنترل با ND، گروه مصرف مکمل کافئین با ND+CAF، گروه تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با ND+ET و تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با ET+CAF نشان داده شده است. $***$ ($P=0/043$) افزایش معنی دار در گروه ND+CAF نسبت به گروه ND: $####$ ($P=0/001$) افزایش معنی دار در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND: $$$$$ ($P=0/001$) افزایش معنی دار در گروه ND+ET نسبت به گروه ND+CAF و ET+CAF: $@@@$ افزایش معنی دار در گروه ND+ET نسبت به گروه های ND+CAF و ET+CAF.

در نتایج آزمون تعقیبی توکی مقادیر پروتئین آپوپتوزی Caspase 3 در بافت قلب در گروه ET+CAF نسبت به ND به صورت معنی داری کمتر بود. ($P=0/001$). همچنین در گروه ET+CAF نسبت به گروه ND+CAF به صورت معنی داری پایین تر بود. ($P=0/010$). بین گروه های ND+CAF و ND+ET ($P=0/120$) نسبت به گروه ND و گروه ND+CAF ($P=0/894$)

شکل ۵- میزان بیان miR-499 بافت قلب در گروه‌های آزمایشی

Figure 5- Expression level of miR-499 in heart tissue in experimental groups

در این نمودار رژیم غذای عادی با ND، گروه مصرف مکمل کافئین با ND+CAF، گروه تمرین استقامتی ND+ET و تمرین استقامتی و مصرف مکمل کافئین با اختصار ET+CAF نشان داده شده است. *** (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی‌دار در گروه ET+CAF نسبت به گروه‌های ND، ND+CAF و ND+ET (P=۰/۰۰۱) ###. ND+ET نسبت به گروه‌های ND و ND+CAF.



جدول ۲- نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه برای بررسی اثر کافئین و فعالیت استقامتی بر نشانگرهای آپوپتوزی بافت قلب در رت‌ها در گروه‌های مربوطه

Table 2- Results of one-way analysis of variance test to investigate the effect of caffeine and endurance activity on cardiac tissue apoptotic markers in rats in the respective groups.

متغیر	گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار	F	سطح معنی‌داری
BAX (A.U.)	کنترل	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	۳۳/۴۳	* ۰/۰۰۱
	مکمل کافئین	۱/۹۸ ± ۰/۳۴		
	تمرین استقامتی	۱/۷۵ ± ۰/۱۰		
	تمرین استقامتی و مکمل کافئین	۱/۲۶ ± ۰/۲۰		
BCL2 (A.U.)	کنترل	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	۳۷/۹۵	* ۰/۰۰۱
	مکمل کافئین	۰/۶۴ ± ۰/۰۱		
	تمرین استقامتی	۰/۷۰ ± ۰/۰۰		
	تمرین استقامتی و مکمل کافئین	۱/۱۵ ± ۰/۰۹		

* ۰/۰۰۱	۱۰/۸۹	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	کنترل	Caspase ۳ (U/mg)
		۰/۶۷ ± ۰/۱۵	مکمل کافئین	
		۰/۷۴ ± ۰/۴۰	تمرین استقامتی	
		۱/۲۰ ± ۰/۱۳	تمرین استقامتی و مکمل کافئین	
۰/۸۷۳۴	۰/۲۳۱۸	۱/۰۰ ± ۰/۰۰	کنترل	p53 (A.U.)
		۱/۵۵ ± ۰/۲۵	مکمل کافئین	
		۱/۵۰ ± ۰/۱۸	تمرین استقامتی	
		۱/۵۸ ± ۰/۳۵	تمرین استقامتی و مکمل کافئین	
* ۰/۰۰۱	۱/۶۳۷	۰/۹۹ ± ۰/۰۸	کنترل	miR-499 (Fold Changes)
		۰/۳۷ ± ۰/۱۳	مکمل کافئین	
		۱/۴۵ ± ۰/۴۱	تمرین استقامتی	
		۴/۳۳ ± ۰/۱۷	تمرین استقامتی و مکمل کافئین	

پروتئین آپوپتوزی BAX چه با تمرین استقامتی و چه با مصرف کافئین به طور معنی دار افزایش یافت که این یافته با یافته های صدیقی و همکاران (۲۰۱۹) ناهمسو است، یافته های پژوهش آن ها نشان داد که تمرینات هوازی باعث کاهش معنی دار در سطوح BAX بافت قلبی می شود، از طرفی مصرف مکمل کافئین همراه با تمرین استقامتی سبب افزایش BAX در بافت قلبی رت ها شد [۴۹] و این یافته با یافته های ضرغامی خامنه و همکاران (۲۰۲۰) که به بررسی آثار تجویز مزمن کافئین بر تعامل بین پروتئین های BAX و BCL2 در بافت میوکارد

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی پاسخ پروتئین های آپوپتوز قلبی به هشت هفته تمرینات هوازی و مصرف مکمل کافئین در موش های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. یافته های این پژوهش نشان داد که تمرین استقامتی و همینطور ترکیب تمرین استقامتی با مصرف مکمل کافئین می تواند بر پروتئین های آپوپتوزی BAX، BCL2 و Caspase 3 اثرگذار باشد و همچنین سبب افزایش معنی دار میزان بیان miR-499 در بافت قلب رت های نر ویستار شود. در این پژوهش میزان سطح



می‌کند که عملکرد میتوکندری و انعطاف‌پذیری سلولی را افزایش می‌دهد. در طول فعالیت بدنی، افزایش انقباض عضلات، سطح کلسیم درون سلولی را بالا می‌برد و مسیرهای سیگنالینگ مانند AMPK (پروتئین کیناز فعال شده با AMP) و p38 MAPK را فعال می‌کند که برای تحریک بیان PGC-1 α و ارتقای بیوژنز میتوکندری و متابولیسم اکسیداتیو همگرا می‌شوند [۵۵، ۵۶]. ورزش با افزایش بیان ژن‌های وابسته به NRF2، دفاع آنتی‌اکسیدانی را بیشتر تقویت می‌کند و در نتیجه استرس اکسیداتیو را کاهش داده و از آسیب DNA محافظت می‌کند (پاور و جکسون؛ ۲۰۰۸) علاوه بر این، ورزش منظم بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز و پیش‌برنده بقا را تعدیل می‌کند، در حالی که عوامل پیش‌برنده آپوپتوز و کاسپازها را کاهش می‌دهد و در نهایت مرگ سلولی را کاهش می‌دهد [۵۷]. اثرات مولکولی کافئین و ورزش به صورت هم‌افزایی متابولیسم انرژی را بهبود می‌بخشند، کنترل کیفیت میتوکندری را افزایش می‌دهند و طول عمر سلولی را افزایش می‌دهند [۵۸].

یافته‌های این پژوهش کاهش معنی‌داری در میزان سطح پروتئین آپوپتوزی Caspase 3 در گروه تمرین استقامتی همراه با مکمل کافئین نسبت به گروه غذای عادی و نیز نسبت به گروه غذای عادی همراه با مکمل کافئین به تنهایی نشان داد که با یافته‌های جعفری و همکاران (۲۰۱۵) و کواک و همکاران (۲۰۰۶) ناهمسو است. در پژوهش جعفری و همکاران (۲۰۱۵) سه ماه تمرین هوازی تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن Caspase 3 میوکارد به عنوان پروتئین نهایی و اجرایی آپوپتوز موش‌های جوان نداشت [۵۹]. از طرفی کواک و همکاران نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین استقامتی تأثیر معنی‌داری بر بیان پروتئین Caspase 3 و قطعه قطعه شدن DNA در میوکارد موش‌های صحرایی جوان (سه ماهه) ندارد [۶۰]. همراستا با این پژوهش نو و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی نشان دادند که هشت هفته تمرین روی تردمیل باعث کاهش نشانگرهای سیگنالینگ آپوپتوز با کاهش BAX و کاسپاز-۳ و افزایش پروتئین BCL2 می‌شود. همچنین نسبت BCL2/BAX کاهش معنی‌داری داشت [۶۱].

هرچند در این پژوهش تفاوت معنی‌داری در مقادیر p53 در گروه‌های مورد پژوهش مشاهده نشد، اما گزارش شده است که p53 در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ وابسته به میتوکندری اضافی، از جمله اتوفاژی/میتوفاژی و آپوپتوز نقش دارد. نقش p53 در تنظیم آپوپتوز

موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ پرداختند همسو است. آنان در پژوهش خود دریافتند که هشت هفته تجویز کافئین با دوز ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای اثرات تشدیدکننده بر مرگ سلولی آپوپتوتیک ناشی از دیابت نوع ۲ به واسطه افزایش در پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و کاهش در پروتئین ضدآپوپتوزی است [۵۰] که این همسو و ناهمسو بودن می‌تواند بخاطر تفاوت در زمان و شکل تمرین و دوز مصرفی مکمل کافئین در این پژوهش‌ها باشد. البته در پژوهش حاضر ترکیب تمرین استقامتی با مصرف مکمل کافئین سبب کاهش معنی‌دار BAX شد که این مورد می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های آتی باشد. میزان سطح پروتئین ضدآپوپتوز BCL2 در این پژوهش، هم با مصرف مکمل کافئین و هم ترکیب مکمل کافئین با تمرین استقامتی نسبت به گروه غذای عادی افزایش یافت و تمرین استقامتی به تنهایی به شدت سبب افزایش معنی‌دار BCL2 در بافت قلب نسبت به گروه کنترل شد. این یافته با یافته‌های صدیقی و همکاران (۲۰۱۹) همسو است. آن‌ها در مقادیر BCL2 و کاسپاز-۳ در گروه تمرینی افزایش معنی‌داری را مشاهده کرده و گزارش کردند که تمرین هوازی با شدت متوسط می‌تواند باعث تعدیل برخی عوامل مؤثر بر آپوپتوز بافت قلبی موش‌های صحرایی نر شود [۵۱]. همچنین این یافته با یافته‌های قجری و همکاران (۲۰۱۹) همسو بوده و آنان گزارش کردند که هشت هفته تمرین استقامتی می‌تواند سبب بهبود بیان ژن‌های BCL2 و BAX در قلب موش‌های در معرض کادمیوم شود [۵۲]. همچنین چن و همکاران (۲۰۲۲) بیان داشتند که مصرف متوسط کافئین با کاهش خطر مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران سالمند پرفشاری خون می‌گردد [۵۳] که با یافته‌های این پژوهش در خصوص افزایش میزان پروتئین BCL2 بافت قلبی در اثر مصرف مکمل کافئین و به دنبال آن بهبود عملکرد قلب می‌تواند همسو باشد. اطلاعات نشان می‌دهند که کافئین با مکانیسم فعال سازی cAMP می‌تواند منجر به فعال سازی عامل هسته ای رونویسی متصل به اریترئوئید ۱ و ۲ (NRF1/2) شود و در ادامه از مسیر NRF1 مقادیر گیرنده پروکسی زوم گاما فعال شده با کو اکتیویاتور آلفا ۱ (PGC-1 α) را فعال کند. در نهایت این پروتئین به افزایش بیوژنز میتوکندریایی منجر شده و می‌تواند به بهبود متابولیسم، کاهش آسیب DNA و در نهایت کاهش آپوپتوز شود [۵۴]. علاوه بر فعال سازی NRF1/2 و PGC-1 α توسط cAMP توسط کافئین، ورزش طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های مولکولی مکمل را نیز القا

*Powers & Jackson

*Chen

*Kwak

*Nuclear respiratory factor 1

*No

*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha



مرگ سلولی، برنامه ریزی مجدد می کند. این اثرات محافظتی با افزایش بیان **miR-499** ناشی از ورزش تقویت می شوند، که اهداف پیش آپوپتوز را سرکوب می کند، در نتیجه سیگنالینگ کاسپاز **Bax** را کند کرده و **AMPK/PGC-1α** را فعال می کند تا انعطاف پذیری میتوکندری را افزایش دهد. اثرات کافئین وابسته به دوز و زمان است: کافئین کم تا متوسط و حاد می تواند **cAMP/PKA/CREB** درون سلولی (و **NRF2/PGC-1α** پایین دست) را افزایش دهد و در برخی از شرایط ورزشی گزارش شده است که افزایش مرتبط با ورزش در نسبت **Bax/Bax:Bcl-2** و فعال سازی کاسپاز را کاهش می دهد، در نتیجه مزایای ضد آپوپتوز و میتوکندریایی تمرین را تقویت می کند. با این حال، قرار گرفتن در معرض مقادیر بالاتر یا مزمن می تواند سیگنالینگ پیش آپوپتوز وابسته به **p53** را با افزایش **Bax** و کاسپاز-۳ شکسته شده در انواع خاصی از سلول ها تحریک کند - بنابراین اثر خالص بر **BAX**، **BCL2**، کاسپاز-۳، **p53** و **miR-499** به بافت، دوز، قرار گرفتن در معرض حاد در مقابل مزمن و وجود سیگنالینگ محافظتی ناشی از ورزش بستگی دارد [۵۰]. بررسی پیشینه مطالعات نشان داد که مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با تاثیر مکمل کافئین بر مکانیسم آپوپتوز بافت قلب در شرایط اختلال متابولیک انجام شده است؛ بنابراین مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر دارای محدودیت بود. از این رو پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد. اطلاعات نشان می دهند که دوز های مختلف کافئین اثرات متفاوتی بر عملکرد قلب دارند؛ هر چند هنوز محققین نتوانسته اند دوز مناسب که اثرات مطلوب داشته باشد را در کنار فعالیت ورزشی بیابند. بنابراین عدم در نظر گرفتن دوز های مختلف مصرف کافئین در این مطالعه از دیگر محدودیت های مطالعه حاضر می باشد. لذا پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی دوز های مختلف کافئین و ورزش همراه با مکانیسم های آپوپتوزی قلب مورد بررسی قرار گیرند. علاوه بر این به نظر می رسد با توجه به نتایج ضد و نقیض در ارتباط با تاثیر قهوه بر مکانیسم آپوپتوز، عدم مقایسه کافئین با مکمل های متابولیکی دیگر از جمله گیاهان دارویی که اثرات لیپولیزی و ضد آپوپتوزی دارند مانند دارچین، زردچوبه و ... دارند از دیگر محدودیت های مطالعه حاضر بود. بنابراین پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی مکمل های دیگر نیز با کافئین مقایسه و ارزیابی شوند.

نتیجه گیری

یافته های این پژوهش نشان داد که هشت هفته تمرین استقامتی هم به تنهایی و هم همراه مصرف مکمل کافئین می تواند بر پاسخ های

شناخته شده است، زیرا می تواند ژن های پروآپوپتوز متعددی از جمله **BAX** و **Bid** را به صورت رونویسی تنظیم کند تا آسیب **DNA** را القا کند [۶۲]. علاوه بر این، **p53** خود می تواند در سطح میتوکندری قرار گیرد، جایی که می تواند سینتیک منافذ انتقال نفوذپذیری را تنظیم کند قبلاً نشان داده شده بود که فعالیت ورزشی مزمن باعث کاهش نسبت **BCL2:BAX** همزمان با کاهش سیتوکروم **c** و آزادسازی پروتئین **AIF23** می شود که نشان دهنده سازگاری های ضد آپوپتوز در میتوکندری است [۶۳].

پژوهش ها نشان داده اند که قلب در حین ورزش تحت تأثیر قرار می گیرد و برخی از عوامل محافظتی مشتق از قلب می توانند با ورزش القا شده و توسط **EVs/EX** حمل شوند [۶۴، ۶۵]. **miRs** غنی شده قلبی، از جمله **miR-208** و **miR-499** عمدتاً در تعدیل، تمایز و توسعه فیبروبلاست های قلبی و کاردیومیوسیت ها نقش داشته و اهمیت زیادی در حفظ عملکرد طبیعی قلب دارند [۶۶]. در پژوهش گیوو و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش شده است که **EVs/EXs** از جمله **miRs** در تعداد زیادی از عوامل محافظت کننده قلب غنی شده و نقش ویژه ای دارند و ترشح آن ها توسط ورزش تنظیم می شود [۶۷]. در این پژوهش، **miR-499** بافت قلبی رت های نر و بیستار در گروه ورزش استقامتی همراه با مکمل کافئین افزایش معنی دار قابل توجهی نسبت به گروه های غذای عادی، غذای عادی همراه با مکمل کافئین و غذای عادی همراه با تمرین استقامتی نشان داد و در این راستا، باگیش و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهش خود گزارش کردند که **miR-499** به طور قابل توجهی پس از تمرین ورزشی تنظیم می گردد، که ممکن است تا حدی مزایای ورزش را توضیح دهد [68]. همچنین در گروه غذای عادی همراه با تمرین استقامتی نسبت به گروه های غذای عادی و غذای عادی همراه با مکمل کافئین افزایش معنی دار بود که به نظر می رسد **miR-499** و فعالیت بدنی در خصوص تأثیر گذاری بر افزایش میتوکندری های بافت، با هم در تعامل هستند؛ زیرا مشخص شده است که فعالیت های استقامتی موجب افزایش تقسیم میتوکندری ها و در نتیجه، ازدیاد تعداد آنها می شود (۳۲). **miR-499** می تواند اثر مثبتی در درمان نارسایی قلبی داشته باشد [۳۵]. بین گروه غذای عادی نسبت به غذای عادی همراه با مکمل کافئین تفاوت معنی داری مشاهده نشد. تمرین استقامتی و کافئین از طریق مسیرهای همگرا با تنظیم کننده های آپوپتوز تعامل دارند: ورزش هوازی مزمن، سیگنالینگ **AMPK/p38-MAPK/PGC-1α** و **NRF2** را فعال می کند که کیفیت میتوکندری را بهبود می بخشد و آپوپتوز ناشی از میتوکندری را با افزایش **BCL-2** ضد آپوپتوزی، کاهش **BAX** پیش آپوپتوتیک و کاهش فعال سازی کاسپاز-۳ کاهش می دهد، در حالی که **p53** را به سمت بیوژنز میتوکندریایی و نقش های متابولیکی به جای

پژوهش حاضر برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه می باشد. بدین وسیله از تمامی حمایت های مادی و معنوی این دانشگاه و معاونت پژوهشی آن نهایت تقدیر و قدردانی می گردد. نیز با توجه به انجام این پژوهش در دانشگاه علوم پزشکی ... از حمایت های کارشناسان آزمایشگاه حیوانی این دانشگاه نیز تقدیر و تشکر می شود.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ نفع متقابلی از انتشار آن ندارند.

آپوپتوزی بافت قلب در رت های نر ویستار موثر باشد. تمرین استقامتی می تواند با افزایش میزان پروتئین BCL2 و miR-499 و نیز کاهش پروتئین های آپوپتوزی BAX و Caspase 3 در بافت قلبی سبب تنظیم و تعدیل آپوپتوز قلبی گردد. به طور کلی به نظر می رسد تمرین استقامتی همراه با مصرف کافئین می تواند دارای اثرات ضد آپوپتوزی بر بافت قلب موش های صحرایی داشته باشد. با این حال در شرایط معمولی و نرمال در مصرف مکمل کافئین مصرف دوز مناسب توصیه شده و همراهی آن با تمرینات ورزشی نیز توصیه می گردد.

تشکر و قدردانی

Reference

1. Somasundaram K, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci.* 2000;5(5):D424-37.
2. Schenk A, Proschinger S, Zimmer P. Chapter 23 - Epigenetics in exercise science and sports medicine. In: Tollefsbol TO, editor. *Medical Epigenetics (Second Edition)*. 29: Academic Press; 2021. p. 491-509.
3. Kazemi M, Peeri M, Azarbayjani MA. The effect of 4 weeks of aerobic exercise training and Octapamine supplementation on TRK-β protein and NLRP-3 gene expression in the cardiac muscle of rats fed with deep-fried oil. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences.* 2021;8(2):674-82. [In Persian]
4. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *The Scientific World Journal.* 2010;10:340-9.
5. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *Journal of applied physiology.* 2008;105(6):1934-43.
6. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE, et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2009;61(14):1369-74.
7. Cheng S-M, Ho T-J, Yang A-L, Chen I-J, Kao C-L, Wu F-N, et al. Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of cardiology.* 2013;167(2):478-85.
8. Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *Journal of Neuroscience.* 1999;19(10):4011-22.
9. Manning AA, Zhao L, Zhu Z, Xiao H, Redington CG, Ding VA, et al. Correction to: IL-39 acts as a friend to pancreatic cancer. *Medical Oncology.* 2019;36(2):22.
10. Yang L, Zhu Y, Zhong S, Zheng G. Astilbin lowers the effective caffeine dose for decreasing lipid accumulation via activating AMPK in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2021;101(2):573-81.
11. Kobayashi-Hattori K, Mogi A, Matsumoto Y, Takita T. Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2005;69(11):2219-23.
12. Fernandez M, Lopez A, Santa-Maria A. Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells. *Journal of*



22. Zhang Q, Liu J, Chen S, Liu J, Liu L, Liu G, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2016;21(4):432-42.
23. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14(8):996-1007.
24. SZEGEZDI E, FITZGERALD U, SAMALI A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1010(1):186-94.
25. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87.
26. Tarantino G, Scopacasa F, Colao A, Capone D, Tarantino M, Grimaldi E, et al. Serum Bcl-2 concentrations in overweight-obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2011;17(48):5280-8.
27. Rastogi RP, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. 2010.
28. Gurung P, Anand PK, Malireddi RS, Walle LV, Van Opdenbosch N, Dillon CP, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *The Journal of Immunology*. 2014;192(4):1835-46.
29. Tonevitsky AG, Maltseva DV, Abbasi A, Samatov TR, Sakharov DA, Shkurnikov MU, et al. Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC physiology*. 2013;13(1):1-11.
30. Wulandari PH. Size Doesn't Matter, Performance Does: Assessing Micro-Ribonucleic Acids as Potent Cardio-Specific Biomarkers in Acute Coronary Syndrome. 2021.
31. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*. 2008;24(4):159-66.
32. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, et al. MicroRNAs in the *Applied Toxicology: An International Journal*. 2003;23(4):221-4.
13. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in cancer biology*. 2015;35 Suppl(0):S78-s103.
14. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(4).
15. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
16. Attardi LD. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;569(1-2):145-57.
17. Yu T, Li J, Sun H. C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010;66(5):999-1003.
18. Wang Z-B, Liu Y-Q, Cui Y-F. Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*. 2005;29(7):489-96.
19. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
20. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2011;1813(4):558-63.
21. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):49-63.



methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. Critical reviews in food science and nutrition. 2019;59(16):2597-625.

42. Lu P-Z, Lai C-Y, Chan W-H. 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.

43. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett*. 2007;247(1):26-39.

44. Tripathi M, Singh BK, Liehn EA, Lim SY, Tikno K, Castano-Mayan D, et al. Caffeine prevents restenosis and inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through the induction of autophagy. *Autophagy*. 2022:1-11.

45. Almugadam BS, Yang P, Tang L. Analysis of jejunum microbiota of HFD/STZ diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;138:111094.

46. Li C, Ni S, Sun H, Zhu S, Feng Y, Yang X, et al. Effects of PM2. 5 and high-fat diet interaction on blood glucose metabolism in adolescent male Wistar rats: A serum metabolomics analysis based on ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023;262:115200.

47. Pakgohar A, Mehrannia H. Sample Size Calculation in Clinical Trial and Animal Studies. *Iranian journal of diabetes and obesity*. 2024;16:42-50. [In Persian]

48. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2007;14(6):753-60.

49. Sadighi A, Abdi A, Azarbayjani MA, Barari A. Effect of aerobic exercise on some

human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116(3):258-67.

33. Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PloS one*. 2011;6(5):e19481.

34. Wang J-X, Jiao J-Q, Li Q, Long B, Wang K, Liu J-P, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature medicine*. 2011;17(1):71-8.

35. Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Am Heart Assoc*; 2011.

36. Shi Y, Han Y, Niu L, Li J, Chen Y. MiR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6. *Biotechnology letters*. 2019;41(6):837-47.

37. Li Y, Lu J, Bao X, Wang X, Wu J, Li X, et al. MiR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4. *Oncotarget*. 2016;7(24):35607.

38. Haldi J, Wynn W. Action of drugs on efficiency of swimmers. *Research Quarterly American Association for Health, Physical Education and Recreation*. 1946;17(2):96-101.

39. Astorino TA, Roberson DW. Efficacy of acute caffeine ingestion for short-term high-intensity exercise performance: a systematic review. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2010;24(1):257-65.

40. Safarzade Gargai S, Safarzadeh Gargari S, Tofighi A, Jafari A, Tolouei Azar J, Farajdokht F. The Effect of Caffeine Supplementation and High Intensity Interval Training on Myocardial Oxidation Stress in Male Wistar Rats. *Jundishapur Scientific Medical Journal (JSMJ)*. ۵۸-۴۴۸:(۳)۲۱;۲۰۲۲. [In Persian]

41. Monteiro J, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Pharmacological potential of



biogenesis after brain ischemia in rats. *Neuroscience*. 2012;205:10-7.

58. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(5):426-34.

59. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and bax gene expression in the rat heart. *Gene, Cell and Tissue*. 2015;2(4):e32833. [In Persian]

60. Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal*. 2006;20(6):791-3.

61. No M-H, Heo J-W, Yoo S-Z, Kim C-J, Park D-H, Kang J-H, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2020;472:179-93.

62. Dashtiyani AA, Afzalpour ME, Tanideh N, Sepehrimanesh M. The comparison of the effect of vitamin E on the expression of p53/PTEN of prostate gland of male rats in two groups of intensive continuous and intermittent exercise training. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2017;7(3):406-15.

63. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.

64. Sanchis-Gomar F, Perez-Quijis C, Lucia A. Overexpressing FSTL1 for Heart Repair. *Trends Mol Med*. 2016;22(5):353-4.

65. Ogawa T, de Bold AJ. The heart as an endocrine organ. *Endocrine connections*. 2014;3(2):R31-R44.

66. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). *J Mol Cell Cardiol*. 2016;94:107-21.

factors of cardiac apoptosis in male rats. *Feyz Medical Sciences Journal*. 2019;23(5):495-502. [In Persian]

50. Zarghami Khameneh A, Jafari A, Nikookheslat S, Karimi P. Effect of Chronic Caffeine Administration on Expression Ratio of Bax and Bcl-2 Proteins in Myocardial Tissue of Male Wistar Rats With Type 2 Diabetes. *complementary Medicine Journal*. 2020;10(3):206-17.

51. Sadighi A, Abdi A, Azarbayjani MA, Barari A. Effect of aerobic exercise on some factors of cardiac apoptosis in male rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2019;23(5):495-502. [In Persian]

52. Ghajari H, Hosseini SA, Farsi S. The Effect of Endurance Training Along with Cadmium Consumption on Bcl-2 and Bax Gene Expressions in Heart Tissue of Rats. *Ann Mil Health Sci Res*. 2019;17(1):e86795. [In Persian]

53. Chen S, Li J, Gao M, Li D, Shen R, Lyu L, et al. Association of caffeine intake with all-cause and cardiovascular mortality in elderly patients with hypertension. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:1023345.

54. Marcinek K, Luzak B, Rozalski M. The Effects of Caffeine on Blood Platelets and the Cardiovascular System through Adenosine Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(16):8905.

55. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*. 2011;1813(7):1269-78.

56. Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010;299(2):E145-E61.

57. Zhang Q, Wu Y, Zhang P, Sha H, Jia J, Hu Y, et al. Exercise induces mitochondrial



67. Guo Y, Chen J, Qiu H. Novel mechanisms of exercise-induced cardioprotective factors in myocardial infarction. *Frontiers in physiology*. 2020;11:199.

68. Baggish AL, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *Journal of applied physiology*. 2014;116(5):522-31.