Complementary Medicine Journal
Arak University of Medical Sciences

October 2020. Vol 10. Issue 3

Research Paper

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

Ali Zarghami Khameneh[1], *Afshar Jafari[1,2], Saeed Nikookheslat[1], Pouran Karimi[3]

1. Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Eduction and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Department of Sport Biological Sciences, Faculty of Sport Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
3. Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Khameneh AR, 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 (Persian)]. Complementary Medicine Journal. 2020; 10(3):206-217. https://doi.org/10.32598/cmja.10.3.460.6

https://doi.org/10.32598/cmja.10.3.460.6

CC BY NC

Article Info:
Received: 06 Apr 2020
Accepted: 12 Sep 2020
Available Online: 01 Oct 2020

Key words:
Caffeine, Apoptosis, Type 2 diabetes, Myocardium

ABSTRACT

Objective Some previous studies have shown the protective effect of caffeine on apoptosis through the regulation of pro- and anti-apoptotic proteins. The aim of this study was to investigate the effects of chronic caffeine administration on the expression ratio of B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) and Bcl-2-Associated X-protein (Bax) proteins in the cardiac tissue of rats with Type 2 Diabetes.

Methods In this experimental study, samples were 24 male white wistar rats (aged 2-3 months with a weight of 250-300 g) randomly divided into three groups: Healthy control (n=8), untreated diabetic (n=8), and diabetic with caffeine supplement (n=8; 70 mg/kg-1 for 8 weeks, 5 days a week). The expression of proteins associated with apoptotic signaling pathway (Bax and Bcl-2) in the cardiac muscle (left ventricular) was measured by Western blot method. One-Way Variance (ANOVA), t-test, and Tukey's post hoc test were used for data analysis.

Results Induction of type two diabetes significantly increased the expression of Bax protein (1.81±0.2) and decreased the expression of Bcl-2 protein (0.36±0.05) compared to control group (P=0.001). However, caffeine administration increased the expression of Bax protein (131%) compared to diabetic control group (P=0.001). Therefore, caffeine administration after diabetes induction elevated the Bax/Bcl-2 ratio (P=0.001).

Conclusion Eight weeks of caffeine administration have an exacerbating effect on the apoptotic cell death caused by type 2 diabetes by increasing pro-apoptotic proteins and reducing anti-apoptotic proteins.

Extended Abstract

1. Introduction

The prevalence of type 2 Diabetes (T2D) is a major public health problem that is becoming a global epidemic. T2D is mainly associated with atherosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, obesity and inactivity. All of these risk factors for diabetes lead to the development of cardiovascular disease and subsequently to diabetic cardiomyopathy, which is associated with impaired mitochondrial function. Meanwhile, cardiac dysfunction has been shown to cause apoptosis by increasing the activity of the cell death machine, which is measured by the negative regulation of anti-diabetic proteins (such as Bcl-2) and overexpression of pre-apoptotic proteins (such as Bax and Cas-3). However, some evidence suggests that apoptotic processes may be affected by some pharmacological interventions.

* ***Corresponding Author:***
Afshar Jafari, PhD.
Address: Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Eduction and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
Tel: +98 (914) 1168561
E-mail: af_jafari@sbu.ac.ir; afshar.jafari@gmail.com

Several epidemiological and experimental studies have reported that caffeine may have the ability to suppress cell proliferation and induce apoptotis by regulating multiple signaling pathways including PTEN, PI3k / Akt, p53, and mTOR. For example, Liu et al. (2017) found that treatment with caffeine increased the activity of caspase-3 and caspase-9 proteins and increased the expression of cytochrome-c levels in cancer cells. Rahimi et al. (2018) reported that caffeine consumption decreases the expression of serum Bax level and increases the expression of Bcl-2 protein level following resistance training. Therefore, due to limited and contradictory findings, the present study aims to examine the effect of two months of caffeine administration on the expression of two proteins of the mitochondrial apoptotic pathway, Bax and Bcl-2, and their ratio (Bax/Bcl-2) in myocardial tissue of male Wistar rats following diabetes induction.

2. Materials and Methods

This is an experimental clinical study conducted on Male Wistar rats aged 10-12 weeks purchased based on a convenience sampling method and placed in separate cages under standard laboratory conditions. After a two-week of adaptation, a high-fat diet (45% fat, 21% protein, and 34% carbohydrate) was given for two weeks to T2D and then 35 mg/kg-1 streptozotocin solution was administered intraperitoneally to ensure diabetic induction. Afterwards, rats were randomly assigned to three groups of 10 based on their blood glucose; Healthy control (C), diabetic control (D) and treated diabetic (D+CA). Caffeine was given to the experimental group in the form of pure dry powder for 5 days a week according to the body weight of rats (14 mg of caffeine per 200 g of body weight) and by intraperitoneal injection [4]. All rats were anesthetized and underwent operation painlessly by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine solution 48 hours after the last supplementation session and after 12 to 14 hours of fasting. Then, a part of the apex of left ventricular (tip of the cone) in rats was carefully removed and after washing with normal saline, it was frozen in liquid nitrogen (-196°C) and kept in the freezer at -70°C. Then, Western blot method was used to evaluate the expression of Bax and Bcl-2 proteins. The band densities were measured by ImageJ software and the density of the target protein bands were normalized against a beta-actin loading control. Finally, the results were presented as relative density (relative to the control group) [12]. Data were analyzed using Shapiro-Wilk test, one-way ANOVA, and Tukey's post hoc test in SPSS V. 22 software, considering a significance level of $P<0.05$.

3. Results

The results showed a significant increase in the expression of pre-apoptotic proteins (Bax) in group D by 94% and in group D+CA by 106% compared to group C ($P=0.001$). On the other hand, the expression of Bcl-2 protein was lower in group D+CA by about 64% than in group C ($P=0.001$). Thus, treatment by caffeine increased the Bax / Bcl-2 ratio.

4. Conclusion

Induction of T2D in rats caused a significant decrease in Bcl-2 expression (anti-apoptotic protein) and an increase in Bax expression (pre-apoptotic protein), resulting in a significant increase in apoptosis and an increase in Bax / Bcl-2 ratio. However, caffeine supplementation for two months increased the activity of the apoptotic cascade by increasing the Bax expression and decreasing the Bcl-2 expression. Consistent with these results, Hanyang Liu et al. (2017) and Gan Wang et al. (2015) also concluded that the presence of caffeine increases apoptosis by increasing pre-apoptotic proteins and decreasing anti-apoptotic proteins in pathological conditions [13, 14]. Researchers believe that the molecular mechanism by which caffeine stimulates the signaling of apoptotic pathways is the inactivation of the PI3K/Akt/mTOR cell survival signaling pathways and the activation of pathways involved in cell death such as p21-activated kinase (PAK2) and c-Jun N-terminal kinases (JNK) [15, 16].

Apparently, the effects of caffeine on target cells are at least partly due to the condition of the target tissue and therapeutic amounts. Jaffari et al. (2004) and Sinha et al. (2014) stated that caffeine induces apoptotic and autophagic cell death pathways in equal amounts and above 50 µmol/L, respectively, as reported in the present study [17, 18].

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences (Code: IR.TBZMED.VCR.REC.1397.389).

Funding

This study was extracted from the PhD. dissertation of first author approved by Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tabriz, Tabriz, and received financial support from the Deputy for Research and Postgraduate Studies of the University of Tabriz.

Authors' contributions

Conceptualization and investigation: Ali Zarghami Khameneh; Writing, editing & review: Afshar Jafari; Data analysis: Saeed Nikookheslat; Investigation: Pouran Karimi

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

The authors would like to thank and appreciate the efforts of all colleagues, the head of the Animal Laboratory of the Neuroscience Research Center of Tabriz University of Medical Sciences, and Sara Cellular Research Center in Tabriz, Iran.

تأثیر تجویز مزمن کافئین بر نسبت بیان پروتئین Bax/Bcl-2 در بافت میوکارد موش‌های نر ویستار مدل دیابتی نوع ۲

علی ضرغامی خامنه[۱]، *افشار جعفری[۱،۲]، سعید نیکوخصلت[۱]، پوران کریمی[۳]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه علوم زیستی در ورزش و تندرستی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۸ فروردین ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۲ شهریور ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

چکیده

مقدمه برخی مطالعات گذشته نشان‌دهنده اثرات محافظتی کافئین علیه آپوپتوز القاشده، از طریق تنظیم پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی هستند. لذا، هدف پژوهش حاضر، بررسی آثار تجویز مزمن کافئین بر تعامل بین پروتئین‌های Bax و Bcl-2 در بافت میوکارد موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش‌ها در طرحی نیمه‌تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ ویستار به طور تصادفی در سه گروه هشت سری کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D) و دیابتی دریافت‌کننده کافئین به میزان ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پنج روز هفته به مدت هشت هفته (D+CA) تقسیم شدند. بیان پروتئین‌های مرتبط با مسیر پیام‌رسانی آپوپتوتیک (Bax و Bcl-2) در میوکارد عضله قلبی (بطن چپ) با روش مبتنی بر روش وسترن‌بلات بررسی شد. آنالیز نتایج توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی صورت گرفت.

یافته‌ها ابتلا به دیابت نوع ۲ موجب افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان پروتئین Bcl-2 نسبت به گروه کنترل سالم شد (P=۰/۰۰۱)، در حالی که تجویز کافئین باعث افزایش بیان پروتئین آپوپتوزی Bax (۱۳۱ درصد) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد (P=۰/۰۰۱). بنابراین افزایش قابل توجهی در نسبت Bax/Bcl-2 مشاهده شد (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری هشت هفته تجویز کافئین دارای اثرات تشدیدکننده بر مرگ سلولی آپوپتوتیک ناشی از دیابت نوع ۲ به واسطه افزایش در پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و کاهش در پروتئین ضدآپوپتوزی است.

کلیدواژه‌ها:
کافئین، آپوپتوز، دیابت نوع ۲، میوکاردیوم

مقدمه

کافئین یا ۱،۳،۷-تری‌متیل‌گزانتین، آلکالوئیدی دارای دو حلقه اتصالی پیریمیدین دیون و ایمیدازول است و به عنوان یک سوبسترای زنوبیوتیکی به طور منظم در رژیم غذایی روزانه اقشار مختلف جامعه مورد استفاده‌های گوناگون قرار می‌گیرد [۱]. به‌خوبی نشان داده شده است که کافئین دارای دامنه گسترده‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیک و فارماکولوژیک است. با این حال، کافئین در مواجهه با شرایط پاتولوژیک می‌تواند همچون یک تیغ دولبه عمل کند؛ به این صورت که از طرفی، فعال‌کننده مسیرهای پیام‌رسانی بقا و محافظت‌کنندگی سلولی بوده و از سویی دیگر القاکننده مسیرهای مرگ سلولی است [۲، ۳]. این چنین پیشنهاد می‌شود که کافئین ممکن است بر عملکرد بافتی اثر گذاشته و تعدیل‌کننده چرخه زندگی ـ مرگ سلولی باشد [۴].

در راستای این مفهوم، یافته‌های مطالعات ناکاسو و همکاران [۵] و وانگ و لو [۶] به ترتیب نشان‌دهنده اثرات حفاظتی کافئین بر جلوگیری از مرگ سلولی آپوپتوتیک در سلول‌های نورونی مُدل پارکینسونی و قرارگیری در معرض تابش اشعه UV در سلول‌های اپیتلیالی هستند. در حالی که نتایج پژوهش لیو و همکاران حاکی از پتانسیل ضدسرطانی کافئین به علت توانایی آن در سرکوب تکثیر سلولی و القاکننده آپوپتوز از طریق کاهش در بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش در بیان پروتئین Bax در سلول‌های معده انسانی است [۷]. همچنین لیو و همکاران اظهار داشتند که انکوباسیون سلول‌های سرطانی معده انسان در حضور کافئین باعث فعال‌سازی پروتئین‌های آپوپتوزی کاسپاز-۳ و ۹ از طریق چندین مسیر آنکوژنیک شامل هومولوگ فسفاتاز تنسین (PTEN)، PI3-k/Akt، p53 و mTOR می‌شود [۷].

آپوپتوز، فرایندی فیزیولوژیک و برگشت‌پذیر است که به کمک

* نویسنده مسئول:
دکتر افشار جعفری
نشانی: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.
تلفن: ۱۱۶۸۵۶۱ (۹۱۴) ۹۸+
پست الکترونیکی: af_jafari@sbu.ac.ir; afshar.jafari@gmail.com

آن میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن تنظیم شده و از ایجاد انواع بدخیمی‌ها جلوگیری به عمل می‌آید و سبب برقراری هوموستاز سلولی می‌شود. این در حالی است که اختلال در ماشین آپوپتوزی منجر به ایجاد بیماری‌های مختلفی از قبیل بیماری خودایمنی، سرطان، مقاومت تومور به دارو و دیابت می‌شود [۹، ۸]. دیابت یکی از بیماری‌های شایع در ایران و جهان به شمار می‌رود، به طوری که در سال ۲۰۱۷ از هر یازده نفر انسان بالغ یک نفر در جهان مبتلا به این بیماری بوده و در هر ۸ ثانیه جان یک نفر را گرفته است. در این بین چنین عنوان شده است که آپوپتوز ناشی از دیابت مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری‌های قلبی - عروقی در افراد دیابتی به‌ویژه نقص در عملکرد بافت میوکارد به علت کاهش در انعطاف‌پذیری عضله قلبی است که به اصطلاح کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM) نامیده می‌شود [۱۰]. به عنوان مثال، فانو ـ یوانگ و همکاران به دنبال تجزیه و تحلیل وسترن‌بلات شاخص‌های آپوپتوتیک در موش‌های مبتلا به کاردیومیوپاتی مزمن، کاهش در عملکرد عضله قلبی همراه با کاهش در بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش در بیان Bax و کاسپاز-۳ را نشان دادند [۱۱]. این در حالی است که شواهد روبه‌رشدی پیشنهادکننده این موضوع هستند که فرایندهای آپوپتوتیک چندین پروتئین محوری شامل Bax و Bcl-2 را تنظیم می‌کنند که هر دو دارای نقش اساسی در فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی داخلی آپوپتوز هستند [۱۲]. در واقع، پروتئین Bcl-2 (حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری) یک عامل ضدآپوپتوزی است که در مسیر داخلی آپوپتوز نقش داشته و مانع از فعالیت کاسپازها می‌شود. در این بین، پروتئین پیش‌آپوپتوتیکی Bax (کاهش در پایداری غشای خارجی میتوکندری) نیز عاملی است که با خنثی کردن فعالیت Bcl-2، مسیر آپوپتوزی را فعال کرده و سبب تغییرات بافت‌شناختی همچون کاهش یا عدم چسبندگی سلول آپوپتوزی به سلول دیگر، قطعه‌قطعه شدن DNA، آزادسازی ریبوزوم‌ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوزی می‌شود و سلول در حال مرگ را ایجاد می‌کند. بنابراین افزایش در میزان Bax باعث افزایش وقوع آپوپتوز و مرگ سولی و کاهش آن منجر به بقای سلولی و ترمیم می‌شود. بالعکس، افزایش در سطوح Bcl-2 در جهت بقا و ترمیم سلولی بوده و آپوپتوز را مهار می‌کند؛ بنابراین سنجش نسبت Bax/Bcl-2 در تعیین اینکه آیا سلول زنده می‌ماند یا می‌میرد حیاتی است [۱۲، ۱۳].

از این رو، تحقیق حاضر با توجه به وجود یافته‌های محدود و متناقض در ارتباط با تأثیر تجویز دو ماه مکمل کافئین (۷۰ میلی‌گرم در وزن بدن در روز) بر بیان پروتئین‌های کلیدی مسیر میتوکندری آپوپتوز یعنی Bax و Bcl-2 و نسبت آن‌ها بر یکدیگر در بافت سوماتیک حساس به مرگ سلولی میوکارد (بطن چپ) متعاقب القای دیابت در موش‌های نر ویستار صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

آزمودنی‌ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات تجربی با طرح پیش‌آزمون و پس‌آزمون با گروه کنترل است. در این تحقیق ۲۴ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار با سن ۱۰ هفته و در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم به روش در دسترس خریداری و در آزمایشگاه حیوانی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز (مرکز تحقیقات علوم اعصاب) در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات در اتاقی به ابعاد ۳ در ۴ متر با دارا بودن شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کمترین سروصدا و چرخه روشنایی ـ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح الی ۱۹:۰۰ عصر) نگهداری شدند. در سراسر دوره تحقیق (فصل بهار)، تمامی حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی به مدت سه ماه دسترسی داشتند. آزمودنی‌ها پس از مطابقت وزنی به صورت تصادفی ساده در یکی از سه گروه ۸ سری شامل گروه کنترل سالم (C)، گروه کنترل دیابتی (D) و گروه دیابتی دریافت‌کننده کافئین (D+CA) قرار گرفتند (جدول شماره ۱). مدت‌زمان مطالعه (هشت هفته) در تحقیق حاضر طبق مطالعات موجود، برای برقراری سازگاری بلندمدت در آزمودنی‌ها در مطالعات کارآزمایی به‌خوبی ثابت شده است.

القای دیابت

پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، برای القای دیابت نوع ۲ طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران و همکاران، به مدت دو هفته غذای پُرچرب (۴۵ درصد چربی، ۲۱ درصد پروتئین و ۳۴ درصد کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان اصفهان تهیه شده بود داده شد و سپس تزریق درون صفاقی (IP) سم استرپتوزوسین (ساخت شرکت Sigma-Aldrich، ایالات متحده) در یک دُز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن، حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) بعد از ۶ ساعت ناشتایی به‌صورت تک‌وعله‌ای اعمال شد [۱۴]. برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت‌کننده مکمل، به گروه کنترل سالم و دیابتی (بدون مکمل) نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک (سالین) تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از روش دیابتی کردن، سطوح پلاسمایی گلوکز از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و مقدار آن با روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل ۲۱۰۰، ساخت شرکت UNIKO، ایالات متحده) اندازه‌گیری شد و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ وارد تحقیق شدند.

نحوه تجویز مکمل کافئین

کافئین به شکل پودر کافئین خالص انهیدروز (خشک) تهیه‌شده از شرکت آلمانی Merck با شماره مجوز ۲۵۱۸۳۵۹۴۳۵۵۷۱۰۲۰ از سازمان غذا و دارو، پنج روز در هفته به مدت هشت هفته با توجه به وزن بدن حیوانات (۷۰ میلی‌گرم در وزن بدن در روز با توجه به متوسط دُز کشنده برابر با ۱۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای موش) به طور کافئین هیدراته (محلول در یک سی‌سی سرم فیزیولوژیک) به صورت تزریق درون صفاقی توسط سرنگ انسولین تجویز شد (تقریباً برابر با ۱۴ میلی‌گرم کافئین به ازای هر ۲۰۰ گرم از وزن بدن موش). تجویز کافئین در دوره بیدار شدن موش‌ها از خواب و اوایل زمان فعالیت آن‌ها در محدوده زمانی ساعت ۲۰-۱۹ عصر تجویز شد. در ضمن ذکر این نکته ضروری است که براساس نتایج مطالعات موجود، تجویز ۷۰ میلی‌گرم در وزن بدن موش‌ها (همچون تحقیق حاضر) بسیار شبیه به غلظت‌هایی است که پس از مصرف چهار تا پنج فنجان قهوه به صورت روزانه در آزمودنی‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۵، ۱۶].

روش نمونه‌برداری

تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله (جهت از بین بردن اثرات حاد) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ساخت شرکت Rotexmedica آلمان و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ساخت شرکت Alfasan هلند به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت آپکس (رآس) بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژیک در کرایوتراپ نیتروژن مایع (منهای ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد) منجمد و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در فریزر (دو درب ساخت شرکت دانش پژوهش فجر، تهران، ایران) نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین درگیر در مسیر آپوپتوز یعنی Bax و Bcl-2 از روش وسترن‌بلات استفاده شد [۱۷]. ابتدا برای تهیه هموژنه ۱۰ درصد وزنی حجم بافت قلب از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برادفورد (سیگما) مورد سنجش قرار گرفت. سپس پروتئین مورد نظر در ژل ۱۰ درصد دناتوره‌کننده پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) با دستگاه الکتروفورز (شرکت Bio Rad، ایالات متحده) تفکیک شد. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی روی غشای پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) (سیگما) انتقال یافت. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشا از آنتی‌بادی اولیه خرگوشی ضد Bax و Bcl-2 ساخت شرکت سانتاکروز ایالات متحده به ترتیب با کُد sc-۷۴۸۰ و sc-۴۹۲ به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهاربار شست‌وشو هربار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰، در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با Hrp به‌مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی، این‌بار به صورت سه تکرار از کیت ECL،BioRad که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده شد. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفتند و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار J Image نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲ اندازه‌گیری و دانسیته باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا- اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج به صورت دانسیته نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه شدند [۱۷].

تجزیه و تحلیل آماری

توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف بررسی شد. پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها و با توجه به هدف تحقیق، نخست پیش‌فرض تحقیق مبنی بر تفاوت معنی‌دار گروه تجربی با گروه کنترل با استفاده از آزمون تی مستقل بررسی و سپس اثرات جداگانه و همزمان متغیر مستقل (مکمل کافئین) روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری توسط آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ تحت ویندوز انجام شد. نمودارها و جداول نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

یافته‌ها

نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی مصرف‌کننده مکمل کافئین بود (P=۰/۰۰۱، F=۶۳/۷۶). چنان‌که بیان پروتئین Bax نسبت به B-Actin در دو گروه تجربی یعنی کنترل دیابتی در حدود ۸۰ درصد (P=۰/۰۰۱) و در گروه دیابتی مصرف‌کننده مکمل در حدود ۱۱۲ درصد (P=۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش یافت. ضمن اینکه گروه مکمل کافئین توانست با اثرات تشدیدکنندگی خود بیان پروتئین Bax را ۳۲ درصد در مقایسه با گروه کنترل دیابتی افزایش دهد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۸۳) (تصویر شماره ۱). به علاوه، میزان بیان دیگر شاخص آپوپتوزی مورد مطالعه یعنی پروتئین Bcl-2 در هر دو گروه تجربی (دیابت و کافئین) نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۱، F=۴۲/۳۱). به طوری که ابتلا به دیابت باعث کاهش قابل توجه ۶۴- درصد در بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 شد (P=۰/۰۰۱). این در حالی بود که تجویز کافئین در گروه دیابتی موجب پاسخ کاهشی به مراتب بیشتری (۷۰- درصد) در مقایسه با گروه کنترل سالم شد (P=۰/۰۰۱) (تصویر شماره ۲).

همچنین با بررسی نسبت Bax/Bcl-2، افزایش معنی‌داری در

جدول ۱. گروه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر (هر گروه هشت سر موش)

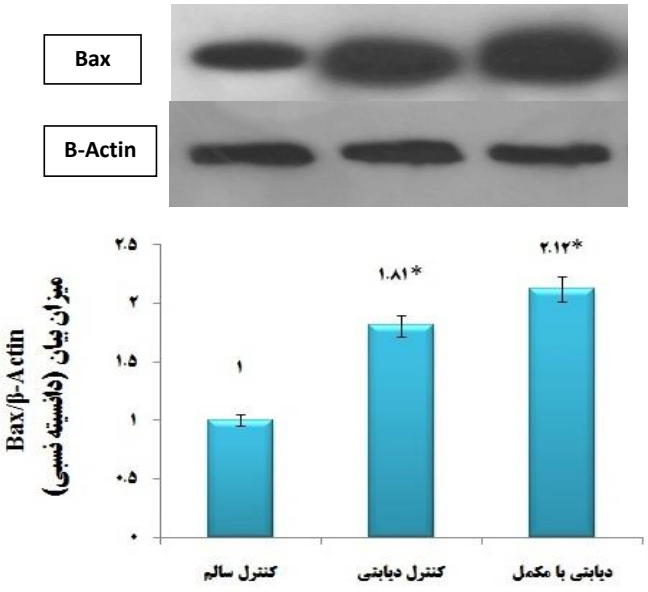
گروه	مشخصات	ID
کنترل سالم	بدون مکمل (همزمان تزریق سرم فیزیولوژیک برای ایجاد شرایط یکسان با گروه کنترل دیابت)	C
کنترل دیابتی	بدون مکمل (تزریق سرم فیزیولوژیک به عنوان دارونما)	D
دیابتی دریافت‌کننده کافئین	دریافت مکمل کافئین (تزریق کافئین هیدراته)	D+CA

مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

دو گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد (P=۰/۰۰۱، F=۴۸/۳۵). در این بررسی گروه دیابتی دریافت‌کننده کافئین توانست سبب افزایش هرچه بیشتر در نسبت فعالیت آپوپتوزی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به میزان ۷۳ درصد شود (P=۰/۰۰۳) (تصویر شماره ۳).

بحث

در مطالعه حاضر، القای دیابت نوع ۲ در موش‌ها سبب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین Bcl-2، افزایش بیان پروتئین Bax و درنتیجه افزایش قابل توجه در ایجاد آپوپتوز و نیز افزایش در نسبت Bax/Bcl-2 شد. به علاوه، نتایج نشان داد تجویز مکمل کافئین در موش‌های دیابتی‌شده سبب افزایش هرچه بیشتر بیان پروتئین آپوپتوزی (Bax) و کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی (Bcl-2) در مقایسه با گروه کنترل سالم و دیابتی می‌شود؛ چنانچه افزایش در فعالیت ماشین آپوپتوزی به دنبال القای دیابت در بیشتر تحقیقات قبلی نیز به خوبی ثابت شده است. به طور مثال، گروه تحقیقاتی فانو-یووانگ و همکاران گزارش کردند که به دنبال تجویز رژیم غذایی با چربی بالا شامل ۲ درصد کلسترول، ۱۰ درصد چربی خوک و ۸۸ درصد غذای معمولی به مدت ۸ هفته و سپس تزریق درون صفاقی ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم 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 می‌شود [۱۱]. همچنین گروه مطالعاتی لیو و همکاران نیز معتقد بودند که تزریق STZ (۵۵ میلی‌گرم در وزن بدن) در بافت میوکارد موش‌ها باعث کاهش معنی‌دار بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی Bcl-2 و Bcl-xl و افزایش بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی Bax و Bad می‌شود [۷]. خانواده پروتئین‌های Bcl-2 توسط حضور دُمین‌های هومولوگ (BH) به دو دسته تقسیم می‌شوند: خانواده پروتئین های Bcl-۲ براساس نواحی حفاظت شده و عملکردشان به سه گروه دسته بندی می شوند: ۱-ضدآپوپنوزی چند ناحیه ای، ۲-پیش آپوپتوزی چند ناحیه ای و تک ناحیه ای BH۳. به‌خوبی اثبات شده است که در سلول‌های سالم، پروتئین ضدآپوپتوزی

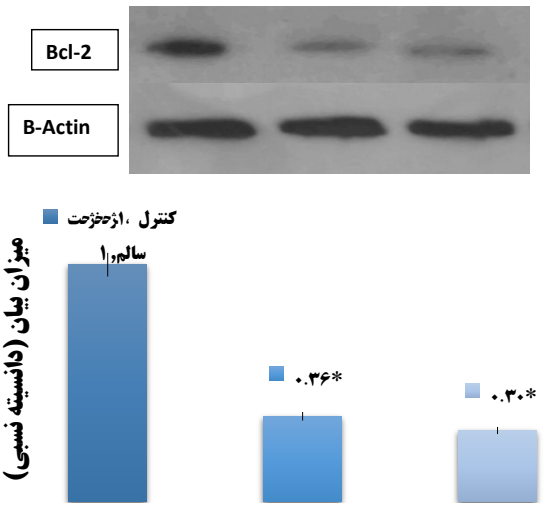


مجله طب مکمل
دانشگاه علوم پزشکی اراک

تصویر ۱. میزان بیان پروتئین Bax در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین Bax نسبت به گروه کنترل؛ ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها.

*P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم.

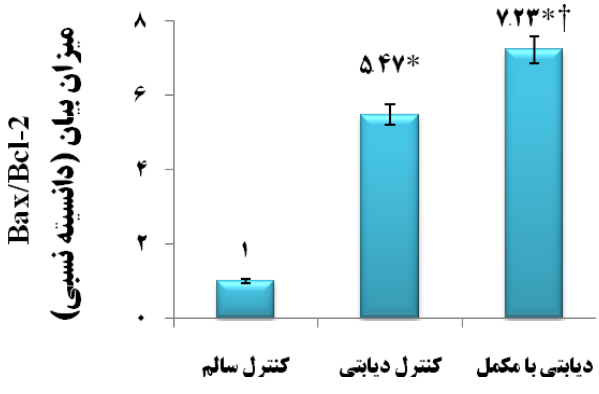


تصویر ۲. میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین Bcl-2 نسبت به گروه کنترل؛ ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها.

*P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم

Bcl-2 یا Bcl-xl به پروتئین‌های BH3 و Bax در غشای خارجی میتوکندری متصل شده و مانع از اُلیگومریزاسیون Bax و Bak برای تشکیل کانال الیگومری می‌شود. اتصال مستقیم پروتئین‌های BH خاص نظیر Bim و PUMA به Bax باعث می‌شود آن‌ها در غشای خارجی میتوکندری کانال الیگومری تشکیل بدهند. این عمل موجب ورود سیتوکروم-C به سیتوزول می‌شود تا در آنجا به پروتئین سازش‌دهنده (Apaf-1) متصل شده و سبب فعال‌سازی کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳ و آغاز آبشار آپوپتوزی و مرگ سلولی شود. از طرفی، پروتئین‌هایی نظیر Bad به Bcl-2 متصل شده و با مهار توانایی آن برای اتصال به Bax سبب تشکیل کانال در غشای خارجی میتوکندری می‌شوند. این در حالی است که محرک‌های متعددی مسیر آپوپتوزی را شروع یا مهار می‌کنند [۸، ۹، ۱۲]، به طوری که در پژوهش پیش رو چنین مشاهده شد که تجویز دو ماه مکمل کافئین منجر به افزایش وقایع آپوپتوزی از طریق تشدید بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 می‌شود. همسو با نتایج مطالعه حاضر، لیو و همکاران چنین اشاره کردند که کافئین سبب سرکوب تکثیر سلولی و القای آپوپتوز از طریق کاهش در بیان Bcl-2 و افزایش در بیان Bax در سلول‌های معده انسانی می‌شود [۷]. به علاوه، وو و همکاران با بررسی کافِستول به عنوان یک مولکول دِترپن یافت‌شده در دانه‌های قهوه کافیا عربیکا، به افزایش در بیان پروتئین Bim و کاهش در بیان MCL-1 اذعان کردند [۱۳]. وانگ و همکاران نیز چنین نتیجه‌گیری کردند که حضور کافئین موجب افزایش آپوپتوز ناشی از سیس‌پلاتین (داروی ضدسرطان) در هر دو سلول سرطانی از طریق افزایش در پروتئین‌های پیش‌آپوپتوتیکی همچون



تصویر ۳. نسبت Bax/Bcl-2 در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل سالم، †P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی.

PUMA می‌شود [۱۸، ۱۹]. به طوری که نشان داده شده است تجویز کافئین باعث سرکوب فعالیت مسیر پیام‌رسانی PI3-K/Akt و درنتیجه موجب دِفسفوریلاسیون و رهاسازی پروتئین Bad در سیتوزول شده که به نوبه خود با اتصال به Bcl-2 موجب تشکیل کانال و شروع وقایع آپوپتوزی می‌شود [۱۹]. پین ـ ژن و همکاران با انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌های اُستئوبلاست انسانی تحت تیمار با کافئین (۲ میلی‌مول) به افزایش 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 [۳]. 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 درصد نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌دار داشت. محققان سازوکار مولکولی که کافئین از طریق آن موجب تحریک پیام‌رسانی مسیرهای آپوپتوزی می‌شود را شامل غیرفعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی بقای سلولی PI3K-Akt-mTOR و فعال‌سازی مسیرهای دخیل در مرگ سلولی همچون پروتئین‌کیناز ۲ فعال‌شده بر اثر P21 یا PAK2 و کینازهای N-ترمینال و C-جانوس (JNK) می‌دانند [۵، ۶] .

ژیوی هی و همکاران متعاقب تیمار ۲۴ ساعته با مقادیر پائین کافئین (۴۵۰-۵۰ میکرومول) به القای آپوپتوزیس در سلول‌های JB6 از طریق افزایش فسفوریلاسیون باقیمانده Ser15 پروتئین p53 و بیان پروتئین Bax و کاسپاز-۳ اشاره داشتند [۲۰]. فسفوریلاسیون پروتئین P53 در باقیمانده Ser15 یک گام ضروری برای فعال‌سازی وابسته به P53 است. P53 پروتئین بالادستی Bax بوده و خود Bax نیز از افکتورهای پائین‌دستی P53 است. Bax توانایی آزادسازی سیتوزولی سیتوکروم-C را دارد، در صورتی که به نوبه خود باعث فعال‌سازی کاسپاز-۳ به عنوان یکی از اعضای کلیدی در شروع فرایند آپوپتوزیس می‌شود. کاسپاز-۳ فعال‌شده شکسته شده و شاخصی است که موجب کلیواژ DNA می‌شود [۱۸، ۲۰].

اخیراً رحیمی و همکاران در مخالفت با نتایج پژوهش حاضر، اظهار داشتند که مصرف حاد ۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن قبل از انجام تمرینات مقاومتی (با شدت ۸۵ درصد یک تکرار بیشینه) در ورزشکاران مرد تمرین‌کرده موجب کاهش معنی‌دار سطوح خونی Bax و نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه داروئما شد، در حالی که میزان Bcl-2 به طور قابل توجهی در هر دو گروه کافئین و داروئما افزایش پیدا کرده بود [۲۱]. تعدادی از مطالعات فیزیولوژیکی چنین اظهار می‌کنند که تجویز کافئین در یک روش وابسته به دُز باعث بروز آپوپتوز از طریق بیش‌بیانی پروتئین Bax در سلول‌ها می‌شود [۱۵]. چنانچه کافئین در یک دُز پایین باعث ممانعت از آپوپتوز شده، در حالی که در مقادیر متوسط به بالا باعث تحریک فرایند مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود [۱۵]. به طوری که یکی از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم اندازه‌گیری پاسخ دُزهای متفاوتی از کافئین در بافت دیابتی‌شده بود [۲۲].

یافته‌های ما نیز در تحقیق حاضر نشان داد تجویز یک دُز متوسط به بالا در حیوانات دیابتی‌شده نه‌تنها سبب سرکوب آپوپتوز ناشی از دیابت نشد، بلکه باعث تشدید بیان شاخص‌های آپوپتوزی نیز شد. در این راستا، جعفری و همکاران [۱۵] و سینها و همکاران [۲۳] اظهار داشتند که کافئین در مقادیر برابر و بالاتر از ۵۰ میکرومول در لیتر به ترتیب باعث القای مسیرهای مرگ سلولی آپوپتوتیک و اتوفاژیک می‌شود. این مقادیر بسیار شبیه به دُزهایی 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 وزن بدن در مدل انسانی یا بیش از ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از وزن بدن در مدل حیوانی همچون تحقیق حاضر وارد بدن می‌شود [۱۶، ۲۳].

از طرفی چنانچه پیش‌تر نیز ذکر شد، اثرات آپوپتوزی کافئین احتمالاً به وضعیت سلولی نیز بستگی دارد. چنانکه در مطالعات فوق‌الذکر، اکثراً اثرات کافئین بر سلول‌های تحت سرطان یا گلیوما مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته که کافئین به طور مثبتی همچون یک عامل ضدسرطانی سبب تسریع در مرگ سلولی در این بدخیمی‌ها شده است (در پژوهش حاضر نیز بافت مورد بررسی در یک وضعیت میوپاتی قرار داشت) [۳، ۲۰، ۲۳].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد القای دیابت موجب افزایش میزان فعالیت ماشین آپوپتوتیک از طریق افزایش بیان پروتئین Bax به عنوان یکی از شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی و کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 شد. در حالی که تجویز کافئین نتوانست موجب برقراری تعادل در فرایند افزایش‌یافته مرگ سلولی آپوپتوزی شد. با وجود این، نشان داده شد تجویز بلندمدت کافئین در تعامل با بیماری دیابت نوع ۲ باعث تشدید پیام‌رسانی و وقوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده می‌شود. هرچند اصلی‌ترین محدودیت مطالعه حاضر عدم تیمار آزمودنی‌ها با دُزهای متفاوت کافئینی و همچنین بررسی گروه‌های مطالعاتی متنوع‌تر با سایر مکمل‌های دخیل در درمان بیماری دیابت و مقایسه آن‌ها با کافئین است که نیاز به بررسی‌های بیشتری در این زمینه است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تحقیق حاضر تحت نظارت کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.389 انجام شد.

حامی مالی

مقاله حاضر قسمتی از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول مقاله در گرایش بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز است و بخشی از هزینه طرح حاضر توسط معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز تأمین شده است.

مشارکت نویسندگان

مجری طرح: علی ضرغامی خامنه؛ نگارش و ویرایش مقاله: افشار جعفری؛ تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: سعید نیکوخصلت؛ کارهای مربوط به آزمایشگاه: پوران کریمی.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات کلیه همکاران و همچنین مدیریت آزمایشگاه حیوانی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز و همچنین شرکت سامانه یاخته‌پژوهان سارا کمال تشکر و امتنان را دارند.

References

[1] Preedy VR. Caffeine: Chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015. https://books.google.com/books/about/Caffeine.html?id=1GsoDwAAQBAJ

[2] Monteiro J, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019; 59(16):2597-2625. [DOI:10.1080/10408398.2018.1461607] [PMID]

[3] Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2008; 9(5):698-718. [DOI:10.3390/ijms9050698] [PMID] [PMCID]

[4] Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. Cancer Letters. 2007; 247(1):26-39. [DOI:10.1016/j.canlet.2006.03.032] [PMID] [PMCID]

[5] 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. Neuroscience Letters. 2008; 432(2):146-50. [DOI:10.1016/j.neulet.2007.12.034] [PMID]

[6] Wang L, Lu L. Pathway-specific effect of caffeine on protection against UV irradiation-induced apoptosis in corneal epithelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2007; 48(2):652-60. [DOI:10.1167/iovs.06-1007] [PMID] [PMCID]

[7] Liu H, Zhou Y, Tang. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. Molecular Medicine Reports. 2017; 16(3):2445-54. [DOI:10.3892/mmr.2017.6894] [PMID] [PMCID]

[8] Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: From ancient to modern times. Onkologie. 2008; 31(12):702-6. [DOI:10.1159/000165071] [PMID]

[9] Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY). 2012; 4(5):330-49. [DOI:10.18632/aging.100459] [PMID] [PMCID]

[10] Harvey PA, Leinwand LA. The cell biology of disease: Cellular mechanisms of cardiomyopathy. Journal of Cell Biology. 2011; 194(3):355-65. [DOI:10.1083/jcb.201101100] [PMID] [PMCID]

[11] Xiong FY, Tang ST, Su H, Tang HQ, Jiang P, Zhou Q, et al. Melatonin ameliorates myocardial apoptosis by suppressing endoplasmic reticulum stress in rats with long term diabetic cardiomyopathy. Molecular Medicine Reports. 2018; 17(1):374-81. [DOI:10.3892/mmr.2017.7841] [PMID]

[12] Corsetti G, Pasini E, Assanelli D, Bianchi R. Effects of acute caffeine administration on NOS and Bax/Bcl2 expression in the myocardium of rat. Pharmacological Research. 2008; 57(1):19-25. [DOI:10.1016/j.phrs.2007.07.007] [PMID]

[13] Woo SM, Min KJ, Seo BR, Nam JO, Choi KS, Yoo YH, et al. 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 & Disease. 2014; 5(11):e1514. [DOI:10.1038/cddis.2014.472] [PMID] [PMCID]

[14] Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Ariyattu Madhavan CN, Agarwal A. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. BioMed Research International. 2013; 2013:752870. [DOI:10.1155/2013/752870] [PMID] [PMCID]

[15] 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. [DOI:10.1016/j.metabol.2003.08.004] [PMID]

[16] Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, et al. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. Autophagy. 2011; 7(2):176-87. [DOI:10.4161/auto.7.2.14074] [PMID] [PMCID]

[17] Farhadi H, Siahkohian M, Lotfali B, Pouran K. [Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats (Persian)]. Journal of Sport in Biomotor Sciences. 2016; 2(16):70-9. http://journals.hsu.ac.ir/sbs/article-1-708-en.html

[18] Huang PC, Wang GJ, Fan MJ, Asokan Shibu M, Liu YT, Padma Viswanadha V, et al. Cellular apoptosis and cardiac dysfunction in STZ-induced diabetic rats attenuated by anthocyanins via activation of IGFI-R/PI3K/Akt survival signaling. Environmental Toxicology. 2017; 32(12):2471-80. [DOI:10.1002/tox.22460] [PMID]

[19] Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. Experimental Hematology & Oncology. 2015; 4:5. [DOI:10.1186/2162-3619-4-5] [PMID] [PMCID]

[20] He Z, Ma W-Y, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. Cancer Research. 2003; 63(15):4396-401. [PMID]

[21] 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. Progress in Nutrition. 2018; 20(4):563-9. [Doi:10.23751/pn.v20i4.6442]

[22] Zarghami-Khameneh A, Jafari A. [The effect of different doses of caffeine and a single bout of resistant-exhaustive exercise on muscle damage indices in male volleyball players (Persian)]. Feyz. 2014; 18(3):220-8. http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-2304-en.html

[23] 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. [DOI:10.1002/hep.26667] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank