

تأثیر تمرین تناوبی شدید (HIIT) با و بدون تجویز کافئین بر بیان پروتئین‌های مرتبط با

اتوفازی میوکاردی در موش‌های دیابتی

افشار جعفری^{۱،۲*}، علی ضرغامی خامنه^۱، سعید نیکوخصلت^۱، پوران کریمی^۳

چکیده

مقدمه: اتوفازی راهبرد درمانی جدیدی با هدف کاهش ناهنجاری‌های دیابتی است. در حالی که، فعالیت اتوفازی تشدید شده یا ناکافی در طی دیابت منجر به تغییر در هومئوستاز سلولی می‌گردد. لذا، پژوهش حاضر به منظور تعیین اثرات هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) همراه با تزریق مکمل کافئین بر بیان برخی پروتئین‌های مرتبط با اتوفازی در میوکارد موش‌های صحرایی دیابتی شده انجام شد.

روش‌ها: در طرح نیمه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ و بیستار ۲-۳ ماهه (با میانگین وزنی 250 ± 25 گرم) به طور تصادفی در ۵ گروه همگن ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C: تزریق درون صفاقی سرم سالین)، کنترل دیابتی (D: دیابتی شده با رژیم غذایی پُرچرب همراه با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین)، دیابتی تمرین کرده (D+T: دویدن با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در ۵ الی ۱۲ و هله ۲ دقیقه‌ای؛ ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته)، دیابتی با مکمل دهی کافئین (D+CA: تزریق درون صفاقی کافئین خالص به میزان ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در ۵ روز هفته به مدت ۸ هفته) و دیابتی تمرین کرده با مکمل دهی کافئین (D+T+CA) تقسیم شدند. برای بررسی تغییرات در نیمرخ بیان پروتئین‌های مرتبط با مسیر پیام‌رسانی اتوفازی (LC3-II, ULK-1, Beclin1) در میوکارد (بطن چپ) از روش مبتنی بر روش وسترن بلات استفاده شد. از تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی برای تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: بیان تمامی پروتئین‌های اتوفازی در گروه‌های دیابتی تمرین نکرده و تمرین کرده بیشتر از گروه سالم بود ($P < 0/05$). از سوی، بیان پروتئین‌های مرتبط اتوفازی در گروه تمرین کرده همراه با مکمل دهی کافئین به طوری معنی‌داری بیشتر از گروه تمرین کرده بدون دریافت کافئین بود ($P = 0/001$).

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این مطالعه می‌توان اظهار داشت که تجویز مکمل کافئین باعث تشدید بیان پروتئین‌های اتوفازی ناشی از بروز دیابت می‌شود؛ از طرفی، تمرین تناوبی شدید می‌تواند به‌عنوان یک راهکار پیشگیرانه، باعث تعدیل اتوفازی میوکاردی ناشی از دیابت شود.

واژگان کلیدی: تمرینات تناوبی شدید، کافئین، اتوفازی، دیابت نوع دو

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 علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

***نشانی:** تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، میدان شهید شهریار، بلوار دانشجو، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، تلفن:

۰۲۱۲۹۹۰۵۸۴۹، نامبر: ۰۲۱۲۹۹۰۵۸۲۲، پست الکترونیک: af_jafari@sbu.ac.ir

مقدمه

اصطلاح "دیابت" برای اولین بار ۲۵۰ سال پیش از میلاد مسیح توسط پزشک یونانی آپولونیوس ممفیس^۱ مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. با گذشت چندین قرن از کشف بیماری دیابت، امروزه آمارها نشان می‌دهند که ۹/۳٪ از کل جمعیت بالغ جهان (۶۳ میلیون نفر) در سال ۲۰۱۹ با دیابت دست و پنجه نرم می‌کنند و چنین پیش‌بینی می‌شود این ارقام تا سال ۲۰۴۵ به میزان ۱۰/۹٪ از کل جمعیت جهان که بالغ بر ۷۰۰ میلیون نفر خواهد بود، افزایش یابد [۲]. مهم‌تر اینکه، طبق تخمین‌های فدراسیون بین‌المللی دیابت (IDF)^۲ در ایران تا سال ۲۰۱۷، ۴/۹۸۵/۵۰۰ نفر (۸/۹٪) مبتلا به دیابت گزارش شده است که حدس زده می‌شود تا سال ۲۰۴۵ به ۹/۷۲۰/۹۰۰ نفر (۹/۶٪) افزایش پیدا کند [۲]. از طرفی، مشاهده شده است که خطر مرگ ناشی از بیماری کرونری قلب در افراد دیابتی تقریباً سه برابر بیشتر از سایر افراد است [۱]. بنابراین، اتخاذ رویکردی مناسب برای حمایت از این بافت سوماتیک حساس در مقابل بیماری دیابت و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن ضروری به نظر می‌رسد. این در حالی است که ابتداء سلول‌ها خود دارای فرآیندی حفاظت شده و طبیعی بنام اتوفاژی یا اتوفاگوسیتوزیس^۳ (خودخواری) هستند که موجب عدم تجمع غیرضروری پروتئین‌ها و یا اجزای ناکارآمد سلولی ناشی از انواع بیماری‌ها از جمله دیابت می‌گردند [۳-۵]. با این حال، برخی تحقیقات موجود بر این ادعا هستند که جریان اتوفاژی که درگیر در روند پاتوفیزیولوژی مقاومت به انسولینی است، خود ممکن است در طی بیماری دیابت دچار اختلال گردد. به‌عنوان نمونه، Buch Møller و همکاران (۲۰۱۷) چنین گزارش کردند که ژن‌های مرتبط با اتوفاژی (p62/SQSTM1 و Atg14) و بیان پروتئین‌های LC3-II و Atg5 در عضلات اسکلتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش قابل توجهی می‌یابند [۶]. بنابراین، پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهایی مناسب برای تعدیل در مرگ سلولی مختل شده و یا افزایش یافته و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن‌ها هستند [۴]. به طوری که در سالیان اخیر تأثیرات مدل‌های تغذیه‌ای مانند کافئین (با فرمول مولکولی

$C_8H_{10}N_4O_2$) به‌عنوان دارویی چندعملکردی بر فرآیندهای اتوفاژی این رویداد مهم سلولی توجه بسیاری از محققان را به سوی خود جلب کرده است [۷، ۸]. چنانچه محققان اشاره کرده‌اند کافئین ممکن است از طریق فعالیت‌های فارماکولوژیکی و فیزیولوژیکی همچون: مهار نوکلئوتیدهای حلقوی فسفودی‌استراز (PDEs)^۴، افزایش در سطوح cAMP و کلسیم درون سلولی و نیز مهار فعالیت پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی PI3K-Akt-mTOR ممکن است بر رویدادهای مرگ سلولی اتوفاژیک اثرگذار باشد [۸-۱۰]. در این راستا، Saiki و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که کافئین موجب القاء آپوپتوز توسط تقویت اتوفاژی از طریق مهار مسیر PI3K-Akt-mTOR-p70S6K می‌شود [۸]. همچنین، Sinha و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی سلول‌های کشت داده شده^۵ HepG2 در معرض کافئین به مدت ۴۸ ساعت به افزایش در لیپوفاژی (لیپولیز ناشی از اتوفاژی) از طریق افزایش در پروتئین‌های پیش اتوفاژیک مانند: Atg5، Atg7، بکلین-۱ در هیاتوسیت‌های اولیه در موش‌های نر صحرایی اشاره داشتند [۹]. از سوی دیگر، برخی از مطالعات به اثرات مهاری کافئین بر شاخص‌های اتوفاژی اشاره دارند. در این زمینه، Pitaksalee و همکاران (۲۰۱۵) اظهار داشتند که اتوفاژی در خط سلولی نوروبلاستوما SH-SY5Y به دنبال مواجهه با ۱ میلی‌مول کافئین مهار شده که این کاهش از طریق سرکوب بیان LC3-II و تعداد اتوفاگوزوم‌ها همزمان با افزایش در فعالیت کاسپاز-۳ مشاهده شد [۱۰].

همچنین، چنین نشان داده شده است که تحرکات فیزیولوژیکی ناشی از اعمال فعالیت‌های بدنی حاد نیز باعث فعال کردن جریان اتوفاژی می‌گردد. به طوری که سازگاری عضلات اسکلتی ناشی از تمرینات ورزشی احتمالاً نیازمند هر دوی افزودن و پاک‌سازی اجزاء سلولی است [۱۱، ۱۲]. در راستای این مفهوم، Lira و همکاران (۲۰۱۳) اظهار داشتند که چهار هفته دویدن روی نوارگردان با شدت ۲۶/۸ متر در دقیقه به میزان ۱۰ دقیقه باعث افزایش در سطوح پایه‌ی اتوفاژی از طریق افزایش در نسبت LC3-II به LC3-I و کاهش در میزان پروتئین p62 در عضلات تونیک و اکسایشی در مقایسه با عضلات فازیک و گلیکولیتیک غالب موش‌ها می‌گردد [۱۱].

⁴ Phosphodiesterase

⁵ رده‌ی سلولی سرطانی کبد انسان

¹ Apollonius Of Memphis

² International Diabetes Federation

³ Autophagocytosis

سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار به روش در دسترس از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با سن حدود ۳ ماه و در میانگین وزنی 250 ± 25 گرم تهیه و در آزمایشگاه حیوانی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز نگهداری شد. به منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیایی، شرایط تمامی مداخلات پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و آغاز چرخه‌ی شبانه (ساعت ۱۹:۰۰) در آزمایشگاه حیوانات انجام گردید. به طوری که آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل؛ دما 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد، با کمترین سروصدا و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح الی ۱۹:۰۰ عصر) به صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به صورت آزادانه^۱ به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان اصفهان) به مدت سه ماه دسترسی (فصل بهار) داشتند که این میزان غذای مصرفی به صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. پس از دوره‌ی آشناسازی، موش‌های گروه تجربی-دیابتی تحت روش‌های القاء دیابتی شدن قرار گرفتند. پس از گذشت پنج روز، میزان گلوکز خون موش‌ها بررسی و در صورتی که میزان آن بیشتر از 300 mg.dl می‌بود، به عنوان دیابتی تشخیص داده می‌شدند. پس از ابتلاء به دیابت، آزمودنی‌ها به طور تصادفی در ۵ گروه همگن ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D)، دیابتی تمرین کرده (D+T)، دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA) و دیابتی تمرین کرده با مکمل دهی کافئین (D+T+CA) تقسیم شدند. سپس، گروه‌های تمرینی، به مدت ۷ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی دوره‌ی آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و مدت تمرین نیز ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. به علاوه، در این تحقیق از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده گردید که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آن‌ها پایین‌تر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. فرآیند کلی کار در

به‌علاوه، Weng و همکاران (۲۰۱۳) عنوان نمودند که قرارگیری در معرض فعالیت هیپوکسیک موجب سرکوب مراحل آغاز، طول‌شدن، بالیدگی و همجوشی جریان اتوفاژی و به طور هم‌زمان افزایش در آغاز و اجرای آپتوز در لنفوسیت‌های CD4 می‌گردد [۱۲]. در حالی که، ۵ هفته رژیم‌های تمرینی HIIT (۳ دقیقه تناوبی با شدت ۴۰ تا ۸۰ درصد VO_{2max}) و MCT (با شدت ۶۰٪ VO_{2max}) باعث بهبود در سطوح کاهش یافته‌ی اتوفاژی و آپتوز تقویت شده می‌گردد [۱۲]. با این حال، چنین به نظر می‌رسد که تمرینات HIIT (تمرینات نسبتاً کوتاه و متناوب با شدتی بالا که با حداکثر توان بدنی اجرا می‌گردد) در راستای بهبود سوخت و ساز گلوکز و تعدیل مرگ‌سلولی در مدل‌های دیابتی، دارای اثرات به مراتب بهتری در مقایسه با دیگر مداخلات غیردارویی هستند [۱۲]. با وجود این، تأثیر فیزیولوژیکی اینگونه تمرینات بر سلسله مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی به درستی درک نشده و نیز نتایج قطعی در این زمینه وجود ندارد؛ به طوری که یافته‌های Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ متعاقب تجزیه و تحلیل وسترن بلات حاکی است که شاخص‌های اتوفاژی (LC3-II، Atg7 و LAMP2a) بلافاصله، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت پس از یک وهله فعالیت حاد هوازی (دویدن روی نوارگردان به مدت ۵۰ دقیقه در یک سرعت ۱۲/۳ متر در دقیقه با شیب ۵ درجه) کاهش معنی‌داری می‌یابد [۱۳]. لذا، تحقیق پیش‌رو با توجه به وجود یافته‌های متناقض و دو پهلو در ارتباط با تأثیر دو ماه تمرین تناوبی شدید به تنهایی و در ترکیب با تجویز مکمل کافئین (۷۰ میلی‌گرم در وزن بدن در روز) بر بیان پروتئین‌های دخیل در مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی یعنی اتوفاژی از طریق بررسی برخی پروتئین‌های اصلی در بافت سوماتیک حساس به مرگ سلولی میوکارد (بطن چپ) متعاقب القای دیابت در موش‌های نر ویستار صورت پذیرفت.

روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات حیوانی بالینی مداخله‌ای تجربی (دو متغیر مستقل) در قالب یک طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بوده که با استفاده از پنج گروه ۱۰ سری از موش‌ها براساس مقررات نحوه‌ی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. برای این منظور، تعداد ۵۰

¹ Ad libitum

کمیته‌ی اخلاق در پژوهش معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسید (IR.TBZMED.VCR.REC.1397.389).

روش القاء دیابت

پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی Sasidharan و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (۴۵٪ چربی، ۲۱٪ پروتئین و ۳۴٪ کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان اصفهان تهیه شد و سپس تزریق درون صفاقی (IP)^۱ سم استرپتوزوتوسین^۲ (شرکت سیگما آلدریچ^۳، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) بعد از شش ساعت ناشتایی به صورت تک وهله‌ای اعمال گردید [۱۴]. برای گروه کنترل سالم (بدون مکمل و بدون تمرین) نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک (سالین)^۴ برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دیابتی تزریق شد. پنج روز پس از روش دیابتی کردن، میزان گلوکز نمونه‌ی خونی از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو (در این نوع دیابت بدن آزمودنی به میزان کافی انسولین تولید می‌کند؛ ولی کاهش در پاسخ بافت‌های محیطی به انسولین مشاهده می‌شود) وارد تحقیق شدند. به‌منظور کنترل وزن، وزن موش‌های صحرایی در ابتدا، وسط و انتهای تحقیق توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

تیمار با مکمل کافئین

تیمار با کافئین به شکل پودر کافئین خالص انهدروز (خشک) تهیه شده از شرکت آلمانی مرک^۵ با شماره مجوز (۲۵۱۸۳۵۹۴۳۵۵۷۱۰۲۰) از سازمان غذا و دارو، ۵ روز در هفته قبل از پروتکل تمرینی با توجه به وزن بدن حیوانات (۷۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن در روز با توجه متوسط دوز کشنده‌ی

^۱ LD₅₀=۱۹۰ mg.kg⁻¹ برای موش) به‌طور کافئین هیدراته (محلول در یک سی‌سی نرمال سالین) به صورت تزریق درون صفاقی (IP)^۶ توسط سرنگ انسولین بود (۱۴ میلی‌گرم کافئین به ازای هر ۲۰۰ گرم از وزن بدن موش). به‌طوری‌که، این مقدار کافئین تجویزی در تحقیق حاضر، براساس نتایج مطالعات قبلی کمترین مقداری است که باعث القای اتوفاژی در مطالعات آزمایشگاهی می‌شود و برابر با غلظت پلاسمایی در حدود ۴۰ الی ۵۰ میکرومول می‌باشد که شبیه به غلظت‌هایی است که پس از مصرف ۴ تا ۵ فنجان قهوه یا کافئین برابر با ۵ الی ۶ میلی‌گرم در وزن بدن در مدل انسانی گزارش شده است. به‌طوری‌که مقدار کافئین مورد استفاده در موش‌ها (۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) تقریباً تبدیل به حدود ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم در انسان گزارش شده است [۹، ۷]. به‌علاوه، در مطالعات قبلی به خوبی نشان داده شده است که منحنی‌های جذب و فراهمی زیستی کافئین بر اساس غلظت-زمان (AUC)^۷ در میان انسان و موش مشابه است. به گونه‌ای که در مدت زمان تقریباً یک ساعت پس از مصرف مقادیر بالای ۱۰ میلی‌گرم در وزن بدن، معمولاً ۹۹٪ از مقادیر مصرفی در طی ۴۵ دقیقه جذب شده و این مقادیر نیز در یک اثر وابسته به دوز^۸ است [۸]. بنابراین، برای ارتقاء سطوح کافئین پلاسمایی در طی فعالیت در تحقیق حاضر نیز، کافئین ۶۰ دقیقه قبل از انجام قرارداد تمرینی تجویز گردید.

روش تمرینی

روش تمرینی دو گروه تمرینی تحقیق حاضر (D+T و D+T+CA) برگرفته از مطالعه‌ی Asgari Hazaveh و همکاران (۲۰۱۸) بود که در آن آزمودنی‌ها برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنجشنبه) برای مدت ۸ هفته در یک برنامه‌ی تمرین تناوبی شدید (HIIT) در پایان دوره استراحتی و شروع فعالیت حیوانات در محدوده‌ی ساعت ۲۰-۱۸ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (ساخت شرکت تکنیک آزما تبریز، ایران) با شیب صفر درجه شرکت نمودند [۱۵]. قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبه‌ی بیشینه سرعت (Maximum speed) موش‌ها انجام گرفت. به‌طوری‌که، سرعت

^۱ Intraperitoneal injection

^۲ Streptozotocin

^۳ Sigma-Aldrich

^۴ Saline

^۵ Merck KGaA

^۶ Intra Protaneal

^۷ Area Under the Curve

^۸ Dose-dependent effect

تهیه‌ی هموژنه ۱۰٪ وزنی حجم بافت قلب از بافر رپا (شرکت سیگما) حاوی مهار کننده‌ی پروتئاز کوکئیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برآدفورد^۱ (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین مورد نظر در ژل ۱۰٪ دناتوره کننده‌ی پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS)^۲ با دستگاه الکتروفورز (شرکت Bio Rad، آمریکا) تفکیک گردید. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF)^۳ سیگما منتقل شد. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی بادی اولیه‌ی خرگوشی ضد LC3-II، ضد ULK-1 و ضد BECN1 ساخت شرکت سانتاکروز^۴ آمریکا به ترتیب با کُد sc-398822، sc-390904 و sc-48341 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده گردید. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Hrp^۵ به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad, ECL) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و دانسیته‌ی باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-آکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج به صورت دانسیته‌ی نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند [۱۶].

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها و با توجه به هدف تحقیق، نخست پیش فرض تحقیق مبنی بر تفاوت معنی‌دار گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از ANOVA یک طرفه بررسی و سپس اثرات جداگانه و هم‌زمان متغیرهای مستقل تمرین و تیمار با مکمل کافئین روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری دو در دو به ANOVA عاملی دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و

دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر دو دقیقه یکبار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی نیز با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوارگردان با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. به طوری که میانگین بیشینه سرعت به دست آمده به هنگام واماندگی معادل 28 ± 3 متر بر دقیقه بود. روش تمرین HIIT شامل سه مرحله‌ی گرم کردن، بدنه‌ی اصلی تمرین و سرد کردن بود. به طوری که، تمرینات در مرحله‌ی گرم و سرد کردن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (برابر با شدت ۴۰-۳۰٪ VO_{2max}) برای موش‌ها در نظر گرفته شد. بدنه‌ی اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در آزمون وامانده ساز (تقریباً برابر با ۲۵-۲۳ متر بر دقیقه) در ۵ تا ۱۲ وهله‌ی دو دقیقه‌ای (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه می‌گردید) بود. به علاوه، تناوب‌های یک دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود که میان وهله‌های فعالیتی اعمال شد [۱۵]. همچنین، گروه کنترل سالم که در هیچ‌گونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نمی‌کرد، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شد. در ضمن، به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با ولتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده شد.

روش نمونه برداری

تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ $mg \cdot kg^{-1}$) و زایلازین (۱۰ $mg \cdot kg^{-1}$) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت آپکس بطن چپ (نوک قلب) آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع ($C^{\circ} -196$) منجمد و در دمای $C^{\circ} -70$ نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های درگیر در مسیر اتوفازای یعنی LC3-II، ULK-1 و کلکین-۱ از روش وسترن بلات استفاده شد. ابتدا، برای

¹ Bradford

² Sodium dodecyl sulfate

³ Polyvinylidene fluoride

⁴ Santa Cruz Biotechnology

⁵ Horseradish peroxidase

یافته‌ها

تغییرات وزن بدن و وزن قلب آزمودنی‌ها در جدول ۱ به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده است. چنانچه در پایان دوره‌ی مطالعه، متوسط وزن بدن و قلب آزمودنی‌ها در تمامی گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری را نشان داد.

تحلیل قرار گرفت. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از ۰/۰۵ صدم و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS22 تحت ویندوز انجام شد. نمودارها و جداول نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

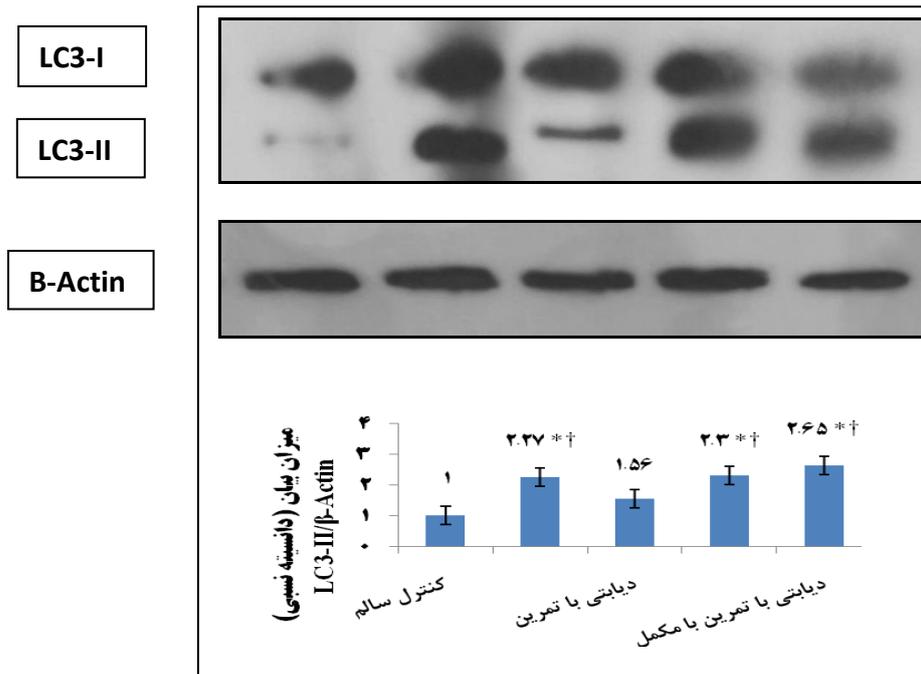
جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد وزن بدن و قلب در گروه‌های مورد مطالعه (هر گروه شامل ۱۰ سر موش)

گروه‌ها	کنترل سالم	کنترل دیابتی	دیابتی با تمرین	دیابتی با مکمل	دیابتی با تمرین با مکمل
متغیر	(C)	(D)	(D+T)	(D+CA)	(D+T+CA)
وزن اولیه (g)	۲۶۵/۱۲ \pm ۱۵/۸۸	۲۶۰/۳۱ \pm ۲۷/۶۱	۲۵۹/۱۲ \pm ۵۸/۴۲	۲۶۴/۳۲ \pm ۶۸/۰۱	۲۵۷/۷۱ \pm ۳۸/۱۴
وزن ثانویه (g)	۲۸۲/۴۵ \pm ۲۴/۰۵	۳۵۱/۵۹ \pm ۳۱/۹۰*	۳۲۸/۸۹ \pm ۴۰/۷۰*	۳۵۰/۰۲ \pm ۲۵/۷۸*	۳۳۴/۷۶ \pm ۵۶/۹۰*
وزن ثانویه قلب (mg)	۸۸۹ \pm ۲۱	۱۲۵۰ \pm ۳۲**	۱۰۵۲ \pm ۱۸**	۱۱۰۰ \pm ۵۴**	۹۹۴ \pm ۶۲**

* معنی‌داری در مقایسه با قبل از مطالعه در سطح $P < 0/05$ ** معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل سالم در سطح $P < 0/05$

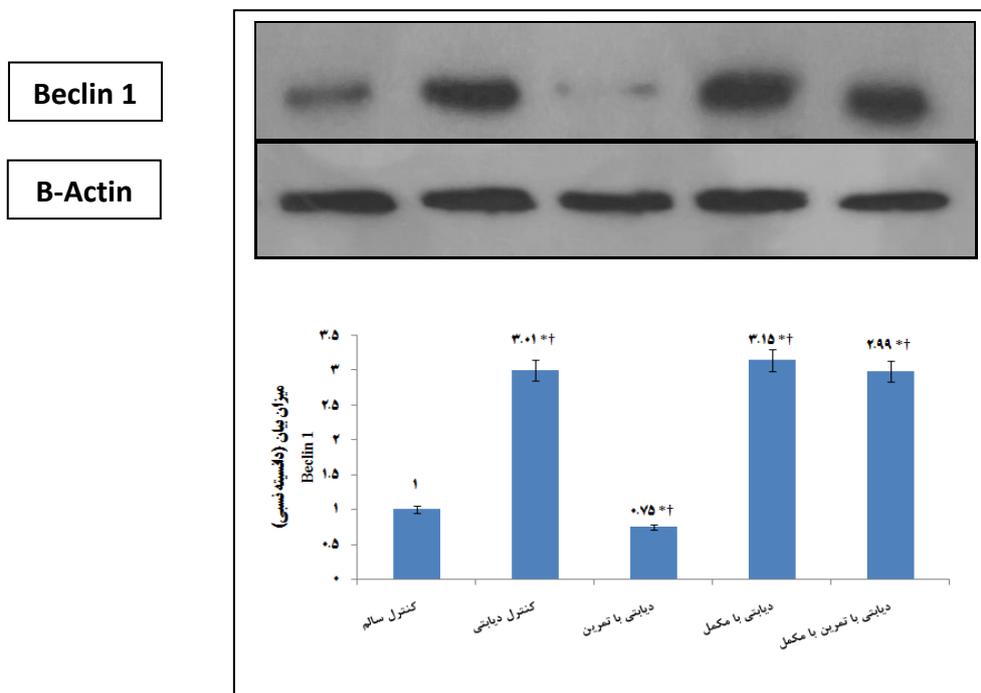
شدید نیز نتوانست از روند افزایشی به‌طور معنی‌داری ممانعت به‌عمل آورد (کاهش ۱۶٪، $p=0/26$). به‌طوری‌که، تجویز تمرینات تناوبی شدید به‌تنهایی توانست از فعالیت بکلین-۱ به‌طور معنی‌داری جلوگیری کرده و سبب کاهش ۲۵٪- این شاخص اتوفازیک در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردد ($P=0/001$). به‌علاوه، بیان دیگر پروتئین اتوفازیک در مطالعه حاضر، یعنی ULK-1/Atg1 در تمامی گروه‌های تجربی بیشتر از مقادیر گروه کنترل سالم بود ($F=36/10, P < 0/05$). درحالی‌که، مقادیر این شاخص در گروه دیابتی تمرین کرده به‌طور قابل توجهی از افزایش هرچه بیشتر این شاخص در مقایسه با سایر گروه‌های دیابتی؛ کنترل دیابتی، دیابت با کافئین و دیابت با کافئین با تمرین به‌ترتیب در حدود ۸۳، ۷۵ و ۶۴٪ جلوگیری به‌عمل آورد ($P=0/001$).

به‌علاوه، نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌داری قابل توجهی بین گروه‌های مورد مطالعه در میزان بیان تمامی پروتئین‌های اتوفازیک است. چنانکه، بیان پروتئین Atg8/LC3-II نسبت به لودینگ B-Actin در هر چهار گروه تجربی یعنی: کنترل دیابتی (D) در حدود ۱۲۷٪ ($P=0/001$)، دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA) در حدود ۱۳۰٪ ($P=0/001$)، دیابتی تمرین کرده با مکمل دهی کافئین (D+T+CA) در حدود ۱۱۹٪ ($P=0/001$) و دیابتی تمرین کرده (D+T) در حدود ۵۶٪ ($P=0/053$) در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($F=17/27, P < 0/05$). درحالی‌که، نتایج آزمون توکی مشخص کرد که بیان پروتئین LC3-II در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در مقایسه با گروه‌های کنترل دیابتی (D)، دیابتی دریافت کننده کافئین (D+T) و دیابتی تمرین کرده با مکمل دهی کافئین (D+T+CA) به‌ترتیب در حدود ۷۰، ۷۳ و ۱۰۹٪ به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$). همچنین، بیان پروتئین Beclin-1/Atg6 متعاقب القاء دیابت (گروه کنترل دیابتی: D)، در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) در حدود ۲۰۱٪ بیشتر بود ($P=0/001$). چنانکه مصرف کافئین منجر به تشدید ۱۵٪ در فعالیت این شاخص در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید. به‌علاوه، اعمال هم‌زمان تمرین تناوبی



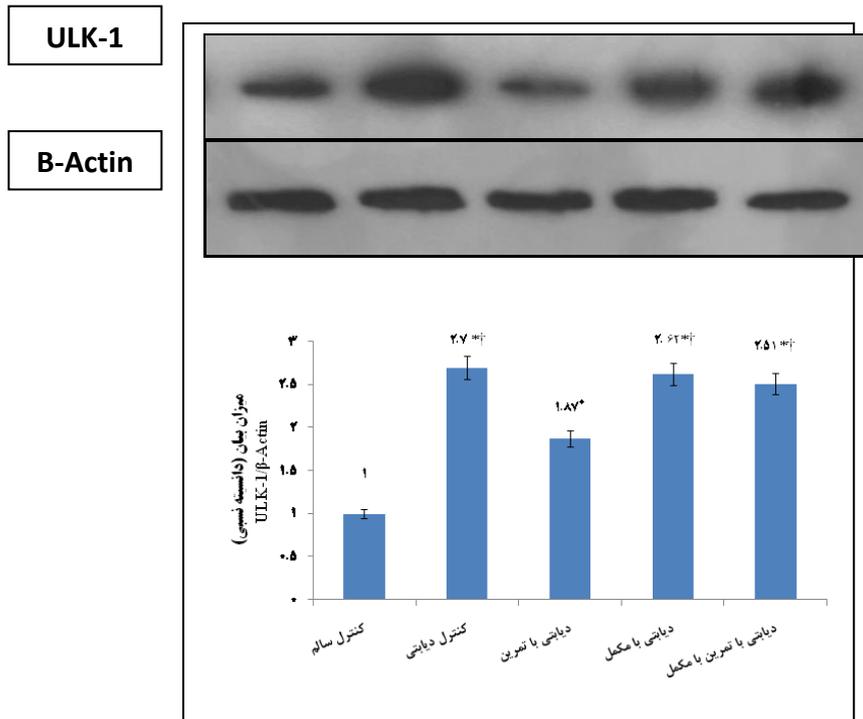
شکل ۱- نشان دهنده‌ی میزان بیان پروتئین زنجیره سبک پروتئین ۳ مرتبط با میکروتوبول (LC3) در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین LC3 نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. * نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. † نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) بین گروه دیابتی با تمرین در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی.



شکل ۲- نشان دهنده‌ی میزان بیان پروتئین بکلین-۱ (Beclin 1) در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین Beclin 1 نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. * نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. † نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) بین گروه دیابتی با تمرین در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی.



شکل ۳- نشان دهنده‌ی میزان بیان پروتئین کیناز فعال کننده‌ی اتوفاژی شبه Unc-51 (ULK-1) در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین ULK-1 نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. * نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. † نشان دهنده‌ی معنی‌داری ($P < 0/05$) بین گروه دیابتی با تمرین در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو با یافته‌های کار تحقیقاتی Munasinghe و همکاران (۲۰۱۵) [۵] و Huikuan Gao (۲۰۱۶) [۱۷] اشاره به افزایش معنی‌دار سطوح شاخص‌های درگیر در فرآیند اتوفاژی متعاقب القاء دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌باشد. چنانچه، Munasinghe و همکاران (۲۰۱۵) چنین اظهار داشتند که ابتلاء به دیابت نوع دو منجر به افزایش اتوفاژی در قلب انسان از طریق افزایش در بیان نشانگر LC3-II و بهبود در مسیر وابسته به بکلین-۱ و کاهش در بیان پروتئین p62 می‌گردد [۵]. همچنین، Huikuan Gao (۲۰۱۶) در پژوهشی با بررسی ۳۶ موش نر اسپرادوگاولی در دو گروه کنترل و دیابتی شده ناشی از رژیم غذایی با چربی بالا (۶۲٪ رژیم استاندارد شده؛ ۱۵٪ چربی؛ ۳٪ پودر زرده تخم‌مرغ؛ ۲۰٪ شکر) به مدت ۶ هفته و تزریق درون صفاقی STZ (۳ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن بدن) اظهار داشتند که ابتلاء به دیابت با

افزایش در شاخص‌های اتوفاژی مانند: نسبت LC3-II به LC3-I، بکلین-۱ و کاهش در پروتئین p62 و افزایش در فیروز (تنظیم مثبت کلاژن نوع I و III) همراه است [۱۷]. در تحقیقی دیگر، Kanamori و همکاران (۲۰۱۵) چنین اظهار نمودند که دیابت ناشی از تزریق STZ باعث کاهش عملکرد دیاستولی می‌گردد، هرچند فعالیت مسیر اتوفاژیک قلب موش‌ها از طریق افزایش در نسبت LC3-II به LC3-I، نسبت SQSTM1 به p62 و کاتپسین D و همچنین افزایش در واکوئل‌های اتوفاژیک و لیزوزوم‌ها قابل اندازه‌گیری بود [۱۸]. در حمایت از این مفهوم نشان داده شده است که ابتلاء به بیماری دیابت از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی PI3k-Akt (بعنوان مسیر بقاء سلولی) باعث افزایش در میزان اتوفاژی می‌گردد. این در حالی است که محققان اشاره کرده‌اند مسیر PI3k-Akt خود می‌تواند به‌عنوان هدف درمانی برای دیابت باشد [۱۹]. در تناقض با یافته‌های مطالعه پیش‌رو، Møller و همکاران (۲۰۱۷) چنین گزارش

فعالیت برای سازگاری عضلات و بهبود در عملکرد جسمانی ضروری است [۲۳]. در راستای این مفهوم، Kim و همکاران (۲۰۱۳) متعاقب بررسی اتوفاژی در عضلات بازکننده دراز انگشتان و عضله دوقلوی موش‌های پیر به کاهش در نشانگرهای اتوفاژیک اذعان داشتند که پس از اعمال مداخله‌ی دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۶/۴ متر در دقیقه برای ۴۰ دقیقه در ۵ روز در هفته برای ۸ هفته، تنظیم افزایشی در این شاخص‌ها ثبت گردید [۲۴]. Weng و همکاران (۲۰۱۳) نیز اشاره نمودند که قرارگیری در شرایط هیپوکسیک (اکسیژن ۱۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه) موجب تنظیم منفی جریان اتوفاژی توسط کاهش در سطوح بکلین-۱، Atg1/ULK-1، LC3II و به طور همزمان افزایش در آپوپتوز می‌گردد. درحالی که اعمال تمرینات تناوبی شدید (وهله‌های ۳ دقیقه‌ای با شدت ۴۰ و ۸۰٪ VO_{2max}) موجب متوقف کردن فرآیند اتوفاژی کاهش یافته و آپوپتوز تقویت شده گردید [۱۲]. از سویی، همسو با مطالعه‌ی حاضر، Lee و همکاران (۲۰۱۲) به اثرات پیشگیرانه چهار هفته تمرینات شنا بر آتروفی عضلات بازکننده دراز انگشتان و نعلی موش‌های مبتلا به دیابت توسط سرکوب اتوفاژی که ممکن است معکوس کننده‌ی تخریب عضلات اسکلتی از طریق کاهش در میزان LC3 شود [۲۵]. چنانچه در تحقیق ما نیز مشاهده شد، اعمال تمرینات تناوبی شدید در شکلی دیگر، به‌عنوان یک مداخله‌ی پیشگیرانه سبب کاهش در شاخص‌های اتوفاژی افزایش یافته ناشی از القاء دیابت برای نرمال‌سازی ماشین اتوفاژی می‌گردد. مشاهده‌ی تفاوت در اثرات ناشی از تمرینات جسمانی در پژوهش حاضر (نقش سرکوب‌کنندگی) در مقایسه با برخی تحقیقات فوق‌الذکر (نقش تقویت‌کنندگی) ممکن است ناشی از وضعیت پایه‌ی بافت مورد بررسی در مواجهه با انواع استرس‌ها (مانند: پیری، آتروفی و هیپوکسی) باشد که اعمال تمرینات جسمانی به‌عنوان یک عامل محافظتی در تلاش برای برقراری هومئوستاز سلولی در سطحی نرمال و پایه جهت تنظیم آرکستراسیون سلولی کارآمد در شرایط اضطراری باشد.

این در حالی است که، به‌کارگیری تمرینات تناوبی شدید در ترکیب با دیگر متغیر مستقل در تحقیق حاضر یعنی کافئین

کردند که ژن‌های مرتبط با اتوفاژی (Atg14 و p62/SQSTM1) و بیان پروتئین‌های LC3-II و Atg5 در عضلات اسکلتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش قابل توجهی می‌یابند [۶]. به تازگی، Jeff Ji و همکاران (۲۰۱۹) نیز با مطالعه اتوفاژی در سلول‌های بتای پانکراسی افراد دیابتی به افزایش در تجمع قطرات چربی در سلول‌های بتا همراه با مهار تنظیم‌کننده‌های اتوفاژی و تنظیم منفی بیومارکر لیزوزومال LAMP2 اشاره نمودند. چنانچه پیش‌تر نیز اشاره گردید نبود یا نقص در فرآیند اتوفاژی نیز به خودی خود مشکل‌ساز خواهد بود [۲۰]. چنانچه، در پژوهشی Jung و همکاران (۲۰۰۸) اظهار داشتند که فقدان اتوفاژی توسط ناک‌اوت نمودن پروتئین Atg7 در سلول‌های بتا منجر به تخریب جزایر لانگرهانس، تجمع پروتئین‌های آسیب دیده و کاهش در تولید انسولین و نیز بیش‌فعالی پروتئین mTORC1 که با افزایش در اکسایش میتوکندریایی و استرس ER و نقص در سلول‌های بتا در حیوانات همراه است [۲۱]. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که یک سطح نرمال و بهینه از جریان اتوفاژی برای هومئوستاز سلول مورد نیاز باشد.

به‌علاوه، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مداخله‌ی تمرینات تناوبی شدید (HIIT) در آزمودنی‌های دیابتی توانست دارای اثرات محافظتی و تقابلی در مواجهه با اتوفاژی بیش فعال در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشته باشد. به‌طوری‌که، Fritzen و همکاران (۲۰۱۶) متعاقب بررسی پاسخ اتوفاژیکی به انجام فعالیت حاد بازکردن زانو بر روی پای تمرین کرده به مدت ۶۰ دقیقه با ۸۰٪ بار کاری اوج به کاهش در میزان لیپیداسیون LC3 به میزان ۵۰٪ و کاهش در نسبت LC3-II به LC3-I به میزان ۶۰٪ که با کاهش در مقادیر اتوفاگوزوم‌ها در عضله‌ی پهن جانبی مردان سالم اشاره داشتند [۲۲]. همچنین، Kim و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه‌ی یک وهله فعالیت متوسط دویدن روی نوارگردان به مدت ۵۰ دقیقه در سرعت ۱۲/۳ متر بر دقیقه با شیب ۵ درجه به کاهش در سطوح بکلین-۱، LC3II، Atg7 و LAMP2a طی بازیافت (۳، ۶ و ۱۲ ساعت پس از فعالیت) در عضلات دوقلوی موش‌ها اظهار داشتند. این درحالی است که تعدادی از مطالعات اشاره دارند که تقویت اتوفاژی ناشی از

تجویز کافئین در گروه دیابتی که مداخله‌ی تمرینی را دریافت کرده بود سبب مُلغی کردن اثرات تعدیل‌کنندگی تمامی شاخص‌های اتوفازای ناشی از تمرین می‌گردد.

از سوی دیگر، برخی از مطالعات به اثرات مهار کافئین بر شاخص‌های افزایش یافته‌ی اتوفازای اشاره دارند. در این زمینه، Pitaksalee و همکاران (۲۰۱۵) اظهار داشتند که اتوفازای در خط سلولی نوروبلاستوما SH-SY5Y به‌دنبال مواجهه با ۱ میلی‌مول کافئین مهار شده که این کاهش از طریق سرکوب بیان LC3-II و تعداد اتوفاگوزوم‌ها می‌گردد [۱۰]. این درحالی است که محققان به‌دنبال کشف سازوکارهای سلولی-مولکولی پیچیده کافئین چنین اظهار داشته‌اند که کافئین در شرایط گوناگون مانند یک تیغ دو لبه عمل می‌کند. چنین به‌نظر می‌رسد که در مطالعه‌ی حاضر تجویز دوز ۷۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن کافئین با اثرات مهار خود بر روی پیام‌رسانی مسیر PI3K-Akt و اِفتکوره‌های پائین دستی آن باعث کاهش در حساسیت به انسولینی و فشار هرچه بیشتر بر افزایش میزان اتوفازای در بافت دیابتی شده گردد. برای نمونه، Saiki و همکاران (۲۰۱۱) عنوان داشتند کافئین با القاء آپوپتوز و تقویت در اتوفازای از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K-Akt-mTOR-p70S6K (مسیر بقاء سلولی) باعث افزایش فعالیت مسیر پیام‌رسانی ERK1/2-MAPK (مسیر سرکوب بقاء سلولی) شود [۲۸]. بنابراین، به‌نظر می‌رسد یکی از بزرگترین محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری میزان زنده ماندن سلولی توسط روش MTT^3 باشد. چرا که وضعیت بافت مورد اندازه‌گیری به کدام سمت بقاء یا مرگ مشخص می‌شد. در این ارتباط، Safa و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای تجربی به‌منظور بررسی اثرات کافئین در لوسمی سلول‌های NB4 کشت داده شده در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار به مهار تکثیر و القای مرگ سلولی آپوپتوتیک در این سلول‌ها به‌دنبال بررسی MTT اشاره داشتند [۲۹].

به‌طور قابل توجهی نتوانست کاهش دهنده‌ی میزان اتوفازای افزایش یافته گردد. حتی تجویز کافئین به تنهایی منجر به افزایش بیشتر ولی غیرمعنی‌دار در سطوح برخی از شاخص‌های اتوفازای گردید. برای نمونه، کافئین در تعامل با دیابت باعث افزایش ۲۱۵٪ در شاخص بکلین-۱ در مقایسه با افزایش ۲۰۰٪ در گروه کنترل دیابتی شد. در این ارتباط Sinha و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی سلول‌های کشت داده شده^۱ HepG2 در معرض کافئین به‌مدت ۴۸ ساعت به افزایش در لیپوفازای (لیپولیز ناشی از اتوفازای) از طریق افزایش در پروتئین‌های پیش اتوفازیک مانند: Atg5، Atg7، بکلین-۱ و تنظیم منفی mTOR و یک افزایش یکسان در سطوح LC3-II و کاهش در فسفوریلاسیون اجزاء پائین‌دستی مسیر PI3K-Akt یعنی p70S6k و 4EBP1^۲ در هپاتوسیت‌های اولیه در موش‌های نر صحرائی اشاره داشتند [۹]. Bloemberg و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی تجویز ۲/۵ میلی‌مول کافئین به افزایش در نسبت LC3-II به LC3-I در میوتیوب‌های C2C12 موش‌ها اظهار داشتند [۲۶]. به‌خوبی ثابت شده است که کافئین دارای دامنه‌ی گسترده‌ای از فعالیت‌های فیزیولوژیایی شامل مهار چرخه‌ی نوکلئوتیدی PDEs، مهار گیرنده‌های آدنوزینی، مهار فعالیت پروتئین‌های آبشار پیام‌رسانی PI3K-Akt و فعال کردن ره‌ایش کلسیم از ذخایر درون سلولی است [۹-۷]. این اثرات القایی کافئین موجب افزایش در سطوح درون سلولی cAMP و در نتیجه فعال‌سازی پروتئین‌کیناز A (PKA) وابسته به cAMP می‌شود. به‌طوری که جایگاه‌های قابل فسفوریله شدن توسط PKA بر روی LC3 مشاهده شده‌اند که می‌تواند موجب فراخوانی هرچه بیشتر LC3 به غشاء اتوفاگوزوم‌ها گردد [۲۶]. همچنین، Chung و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که کافئین به‌عنوان آگونیست گیرنده‌های ریانودین نوع ۳ (RyR3) از طریق آزادسازی کلسیم درون سلولی سبب افزایش مرگ سلولی اتوفازیک در سلول‌های عصبی هیپوکمپ افراد بالغ می‌شود [۲۷]. نکته جالب توجه در مطالعه‌ی حاضر این که،

^۱ رده‌ی سلولی سرطانی کبد انسان

^۲ عامل آغازگر ترجمه‌ی سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی

³ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

نتیجه گیری

ترکیب کافئین با تمرینات تناوبی تأثیر قابل توجهی در این افزایش نداشت. چنانچه به نظر می رسد اعمال تمرینات تناوبی شدید به تنهایی بتواند مداخله‌ی مناسبی برای نرمال نمودن اتوفاژی افزایش یافته در مقایسه با تجویز کافئین باشد.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر برگرفته از یافته‌های رساله‌ی دکتری تخصصی آقای علی ضرغامی خامنه دانشجوی گرایش بیوشیمی و متابولیسم ورزشی دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز است. بخشی از هزینه‌های طرح حاضر توسط معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز تأمین شده است. از این‌رو، نویسندگان از حامیان مالی و مدیریت آزمایشگاه حیوانی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز و همچنین شرکت سامانه یاخته پژوهان سارا کمال تشکر و امتنان را دارند.

به ذهن چنین متبادر می شود که سطوح بالای از اتوفاژی می تواند موجب کاهش در کیفیت بافت هدف گردد؛ به طور مشابه، اتوفاژی در سطوح خیلی پائین نیز نتیجه اش تخریب افزایش یافته‌ی سلول است. وجود جریان اتوفاژی نابجا و یا نقص عملکردی در انواع پروتئین‌های درگیر در فرآیند اتوفاژیک در بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت ملیتوس، سرطان، استحالته عصبی (نورودژنراتیو)، بیماری‌های عفونی و پیری منجر به بدتنظیمی در متابولیسم و عملکرد میتوکندری در بافت موردنظر خواهد شد. به طوری که در مطالعه‌ی حاضر القاء دیابت موجب افزایش در میزان اتوفاژی از طریق افزایش در بیان پروتئین‌های دخیل در شکل‌گیری ماشین اتوفاژی گردید. درحالی‌که، به کارگیری مداخله‌ی تمرینات تناوبی شدید موجب تعدیل در میزان پروتئین‌های افزایش یافته گردید. با این حال، تجویز کافئین به تنهایی نه تنها موجب تعدیل نگردید، بلکه سبب تشدید اتوفاژی افزایش یافته نیز شد. به طوری که

مآخذ

1. Yang D, Yang Y, Li Y, Han R. Physical Exercise as Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus: From Mechanism to Orientation. *Ann Nutr Metab* 2019;74:313-321.
2. Matthew C. Riddle, George Bakris, Lawrence Blonde. Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes. *American Diabetes Association* 2018; 41(1): S3-S3.
3. Andrew Thorburn. Autophagy and Its Effects: Making Sense of Double-Edged Swords. *PLoS Biol* 2014;12(10): e1001967.
4. Jai-Sing Yang, Chi-Cheng Lu, Sheng-Chu Kuo, Yuan-Man Hsu, Shih-Chang Tsai, Shih-Yin Chen. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus. *Biomedicine* 2017; 7(2): 8-15.
5. Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, Edamatsu M, Saxena P, Hamer NS, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway. *Int J Cardiol* 2016; 1:202:13-20.
6. Møller AB, Kampmann U, Hedegaard J, Thorsen K, Nordentoft I, Vendelbo MH, et al. Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2017; 7: 43775.
7. 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. *Feyz* 2014; 18(3):220-228.
8. Mathew TS, Ferris RK, Downs RM, Kinsey ST, Baumgarner BL. Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 24:453(3):411-8.
9. 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.
10. Pitaksalee R, Sanvarinda Y, Sinchai T, Sanvarinda P, Thampithak A, Jantarantotai N, et al. Autophagy inhibition by caffeine increases toxicity of methamphetamine in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Neurotox Res* 2015;27(4):421-9.
11. Vitor A, Lira, Mitsuharu Okutsu, Mei Zhang, Nicholas P. Greene, Rhianna C. Laker, David S. Breen, Kyle L. Hoehn, Zhen Yan. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of

- physical performance. *FASEB J* 2013; 27(10): 4184–4193.
12. Weng TP, Huang SC, Chuang YF, Wang JS. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One* 2013;13;8(11):e80248.
 13. Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem* 2012;68(2):229-35.
 14. Suja Rani Sasidharan, Joshua Allan Joseph, Senthilkumar Anandakumar, Vijayabalaji Venkatesan, Chandrasekharan Nair Ariyattu Madhavan, Amit Agarwal. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *BioMed Research International* 2013; ID 752870; 1-9.
 15. Asgari Hazaveh D, Riyahi Malayeri S, Babaei S. Effect of Eight Weeks High Intensity Interval Training and Medium Intensity Interval Training and Aloe vera Intake on Serum Vaspin and Insulin Resistance in Diabetic Male Rats. *AMUJ* 2018;20(11) :67-75.
 16. Parhadi H, Siahkohian M, Lotfali B, Pouran.K. Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats. *Journal of Sport in Biomotor Sciences* 2016;2(16):70-79.
 17. Gao H, Yang Q, Dong R, Hou F, Wu Y. Sequential changes in autophagy in diabetic cardiac fibrosis. *Mol Med Rep* 2016;13(1):327-32.
 18. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Mikami A, Ogino A, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy* 2015;11(7):1146-60.
 19. Li X, Hu X, Wang J, Xu W, Yi C, Ma R, Jiang H. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Med* 2018;42(4):1917-1924.
 20. Ji J, Petropavlovskaja M, Khatchadourian A, Patapas J, Makhlin J, Rosenberg L, Maysinger D. Type 2 diabetes is associated with suppression of autophagy and lipid accumulation in β -cells. *J Cell Mol Med* 2019;23(4):2890-2900.
 21. Hye Seung Jung, Kun Wook Chung, Jeong Won Kim, Jin Kim, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka. Loss of Autophagy Diminishes Pancreatic β -Cell Mass and Function with Resultant Hyperglycemia. *Cell Metab* 2008;8(4):318-24.
 22. Fritzen AM, Madsen AB, Kleinert M, Treebak JT, Lundsgaard AM, Jensen TE. Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. *J Physiol* 2016;594(3):745-61.
 23. Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem* 2012;68(2):229-35.
 24. Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim HJ, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *J Physiol Biochem* 2013;69(4):697-705.
 25. Lee Y, Kim JH, Hong Y, Lee SR, Chang KT, Hong Y. Prophylactic effects of swimming exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats. *Lab Anim Res* 2012;28(3):171-9.
 26. Darin Bloemberg, Joe Quadrilatero. Autophagic flux data in differentiated C2C12 myotubes following exposure to acetylcholine and caffeine. *Data Brief* 2016;7: 692–696.
 27. Kyung Min Chung, Eun-Ji Jeong, Hyunhee Park, Hyun-Kyu An, and Seong-Woon Yu. Mediation of Autophagic Cell Death by Type 3 Ryanodine Receptor (RyR3) in Adult Hippocampal Neural Stem Cells. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 116.
 28. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 2011;7(2):176-87.
 29. Safa M, Bashash D, Hamidpoor M. Induction of cell death and decreased cell proliferation in acute promyelocytic leukemia cells (NB4) by caffeine. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2016;12(4):331-339.

THE EFFECT OF HIGH-INTENSITY INTERVAL TRAINING (HIIT) WITH AND WITHOUT CAFFEINE INJECTION ON EXPRESSION OF MYOCARDIAL AUTOPHAGY-RELATED PROTEINS IN DIABETIC RATS

Afshar Jafari^{1,2*}, Ali Zarghami Khameneh¹, Saeed Nikookheslat¹, Poursan Karimi³

1. Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biological Sciences in Sport and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3. Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ABSTRACT

Background: Autophagy is a new therapeutic strategy aimed at reducing the diabetic abnormalities. While excessive or insufficient autophagic activity during diabetes leads to altered cellular homeostasis. So, aim of the present study was conducted to determine the effect of eight-week high-intensity interval training (HIIT) along with caffeine injection on the levels of some myocardial autophagy-related proteins in diabetic rats.

Methods: In experimental design, fifty male white wistar rats with an age range of 3-2 months (average weight 250±25 g) were randomly divided into 5 groups of homogeneous 10 rats in each group: Healthy control (C: intraperitoneal injection of saline), Diabetic control (D: high-fat diet combined with a single intraperitoneal injection of streptozotocin, Diabetic with training (D+T: running with intensity at the 85-90% of maximum speed in 5 to 12 bout of 2 min⁻¹; 5 days/week for 8 weeks), Diabetic with caffeine supplementation (D+CA: intraperitoneal injection of pure caffeine at 70 mg.kg⁻¹ 5 days/week for 8 weeks), Diabetic with training and with caffeine supplementation (D+T+CA). For evaluate changes in the expression profile of some of the genes associated with autophagy signaling pathway (LC3-II, ULK-1, Beclin1) in the myocardium (left ventricular), based on Western blot analysis will be used. Also, the one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc test were be used to analyze the data.

Results: The expression of all autophagic proteins in diabetic with trained and non-trained groups was higher than in healthy group (P≤0.05). On the one hand, the expression of autophagy-related proteins in the trained group with caffeine supplementation was significantly higher than that of the training group without caffeine intake (P=0.001).

Conclusion: The findings of this study suggest that caffeine injection exacerbated the expression of autophagic proteins induced by diabetes; On the other hand, high-intensity interval training can as a preventive strategy, modulate diabetes-induced myocardial autophagy.

Keywords: High-intensity Interval Training, Caffeine, Autophagy, Type 2 Diabetes

* Shahid Beheshti University, Shahid Shahrari Square, Daneshjou Boulevard, Shahid Chamran Highway, Tehran, Iran. Phone: +982129905849, Fax +982129905822, E-mail af_jafari@sbu.sc.ir