JAHSSP

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/

http://dx.doi.org/10.22049/JAHSSP.2022.27500.1401

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال هشتم، شماره دوم ؛

پاییز و زمستان ۱٤۰۰؛ صفحات ۸۳-۹۱

مقاله پژوهشی

Open Access

اثرات دو ماه تمرینات تناوبی شدید و مکمل‌دهی کافئین بر بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2 در میوکارد موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع دو

افشار جعفری[۱]، علی ضرغامی خامنه[۲*]، سعید نیکوخصلت[۱]، پوران کریمی[٤]، ژاله پاشایی[٥]

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۰/۱۲

چکیده

هدف: سازوکارهای مهاری و فعال‌کنندهٔ مداخلاتی همچون تمرینات تناوبی شدید و تجویز کافئین بر مسیرهای اصلی مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلولی (آپوپتوز و اتوفاژی) به خوبی درک نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی آثار تمرین تناوبی شدید به همراه تجویز کافئین بر بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2 در میوکارد قلبی موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع دو انجام شد. **روش‌شناسی:** در مطالعه تجربی حاضر، ۵۰ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار با دامنهٔ سنی ۳-۲ ماه به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D)، دیابتی تمرین کرده (D+T)، دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA) و دیابتی تمرین- کافئین (D+T+CA) تقسیم شدند. برای بررسی بیان پروتئین‌های‌عضلهٔ قلبی (Bcl-2/Beclin-1) از روش وسترن بلات استفاده شد. **یافته‌ها:** میزان بیان پروتئین Beclin-1 نسبت به B-Actin، در گروه D؛ ۲۰۱٪، گروه D+CA؛ ۲۱۵٪ و در گروه D+CA+T؛ ۱۹۹٪ بیشتر از گروه C بود (P=۰/۰۰۱). میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه C به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P=۰/۰۰۱، F=۷۳/۸۳). بطوری‌که، میزان بیان این پروتئین در گروه D نسبت به گروه C به‌طور معنی‌داری در حدود ۳۷ درصد کمتر بود (P=۰/۰۰۱). در حالی‌که میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه D+CA و گروه D+T+CA به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه C به‌ترتیب به میزان ۶۴ و ۷۰ درصد کمتر بود (P=۰/۰۰۱). **نتیجه‌گیری:** نتایج بیانگر این است که انجام تمرینات تناوبی شدید در تعدیل بیان بیش از حد شاخص اتوفاژیکی Beclin-1 و بهبود بیان شاخص ضدآپوپتوزی Bcl-2اثرگذار است. درحالی‌که، مکمل کافئین به تنهایی و به همراه تمرین تناوبی شدید در تعدیل پروتئین اتوفاژیکی و بهبود پروتئین ضدآپوپتوزی مؤثر نبود.

واژه‌های کلیدی: کافئین، تمرین تناوبی شدید، دیابت نوع دو، مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول.

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

۱.دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲.دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. (نویسنده مسئول): ali.zarghami64@gmail.com

۳.دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی دانشگاه، تبریز، ایران.

٤.استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۵.دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

نحوه ارجاع: افشار جعفری، علی ضرغامی خامنه، سعید نیکوخصلت، پوران کریمی، ژاله پاشایی. "اثرات دو ماه تمرینات تناوبی شدید و مکمل‌دهی کافئین بر بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2 در میوکارد موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع دو". مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش. ۱۴۰۰: ۸(۲)، ۹۱-۸۳.

این مقاله با تبعیت از مجوز CC By 4.0 با دو شرط استناد به نویسنده و استفاده برای مقاصد غیرتجاری به طور رایگان در دسترس می‌باشد. استفاده، توزیع، بازتولید محتوای آن فقط برای اهداف غیرتجاری مجاز است و در غیر این صورت باید از سازنده اثر اجازه گرفته شود.

حق چاپ متعلق به نویسندگان و امتیاز انتشار آن متعلق به مجله "مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش" است که توسط دانشگاه شهید مدنی آذربایجان منتشر می‌شود.

شاپای الکترونیکی: ۲۶۷۶-۶۵۰۷

DOI: 10.22049/JAHSSP.2022.27500.1401

DOR: 20.1001.1.26766507.1400.8.2.10.6

Copyright ©The authors

Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

JAHSSP

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/

http://dx.doi.org/10.22049/JAHSSP.2022.27500.1401

Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology
Volume 8, Number 2
Autumn/Winter 2021
83-91

Original Article

Effects of Two Months of High Intensity Interval Training and Caffeine Supplementation on the Expression of Beclin-1 and Bcl-2 Proteins in the Myocardium of Type 2 Male Diabetic Rats

Afshar Jafari[1],1, Ali Zarghami Khameneh[2]*, Saeed Nikookheslat[3], Pouran Karimi[4], Zhaleh Pashaei[5]

Receive 2021 November 8; Accepted 2022 January 2

Abstract

Aim: Inhibitory and activating mechanisms of interventions such as high intensity interval training and caffeine administration on major pathways of programmed cell death (apoptosis and autophagy) are not well understood. The aim of present study was to evaluate the effects of high-intensity interval training along with caffeine administration on Beclin-1 and Bcl-2 proteins expression in myocardium muscle of type 2 diabetic male rats. **Methods**: In the present experimental study, 50 male white Wistar rats with an age range of 2-3 months were randomly divided into 5 groups of 10 rats in each group: Healthy control (C), Diabetic control (D), Diabetic with Training (D+T), Diabetic with Caffeine treatment (D+CA), Diabetic with Training and Caffeine treatment (D+T+CA). Western blot analysis was used to evaluate the cardiac muscle proteins (Bcl-2/Beclin-1). **Results**: The protein expression level of Beclin-1 was more than the C group, in D group; 201%, D+CA group; 215% and in D+CA+T group; 199% in compared to B-Actin (P=0.001). The Bcl-2 protein expression level in the experimental groups were significantly lower in comparison to the C group (P=0.001, F=73.83). As the expression level of this protein was significantly lower at around 37% in the D group compared to the C group (P=0.001). Whereas the Bcl-2 protein expression levels was significantly lower in the D+CA group and D+T+CA group compared to the C group at about 64 and 70 percent, respectively (P=0.001). **Conclusion**: The results indicate that performed high-intensity interval training is effective in modulating the overexpression of Beclin-1 autophagic index and improving expression of Bcl-2 anti-apoptotic index. However, caffeine supplementation alone and along with high-intensity interval training were not effective in modulating of autophagic protein and improving anti-apoptotic protein.

Keywords: High-intensity Interval Training, Type 2 Diabetes, Programmed Cell Death.

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

١. Associate professor, Department of Biological Sciences in Sport and Health, ShahidBeheshti University, Tehran, Iran.

2. PhD of Exercise Physiology; Faculty of Physical Eduction and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. (Corresponding Author): ali.zarghami64@gmail.com

3. Associate professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

4. Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

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

Cite as:Afshar Jafari, Ali Zarghami Khameneh, Saeed Nikookheslat, Pouran Karimi, Zhaleh Pashaei: " Effects of Two Months of High Intensity Interval Training and Caffeine Supplementation on the Expression of Beclin-1 and Bcl-2 Proteins in the Myocardium of Type 2 Male Diabetic Rats".Applied Health Studies in Sport Physiology. 2021: 8 (2), 83-91.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. © 2021 The Authors. JAHSSP published by AzarbaijanShahidMadani University

Journal ISSN (online): 2676-6507
DOI: 10.22049/JAHSSP.2022.27500.1401
DOR: 20.1001.1.26766507.1400.8.2.10.6

Copyright ©The authors

Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به مرگ یک یاخته در هر شکلی اطلاق می‌گردد که توسط یک برنامهٔ درون سلولی میانجی‌گری می‌شود [۱]. انواع مختلفی از مرگ سلولی (آپوپتوز، اتوفاژی و نکروز) از لحاظ مورفولوژیکی تشخیص داده شده است. با این حال، آپوپتوز و اتوفاژی دو شکل اصلی مرگ سلولی به شمار می‌روند [۱, ۲]. در هر سناریو از مرگ، سلول با توجه به ماهیت تحریکات، ویژگی‌ها، محتویات درونی و محیط پیرامون خود تصمیم می‌گیرد که کدام مسیر اصلی –آپوپتوز یا اتوفاژی را برگزیند. برای نمونه، نشان داده شده است که طی بیماری‌هایی مانند دیابت، واکنش متقابل بین وقایع مرگ آپوپتوز و اتوفاژی دارای ویژگی سینرژی (هم افزایی) و آنتاگونیستی (رقابتی) نسبت به یکدیگر می‌باشد [۳]. البته، تعاملات فیزیولوژیکی و عملکردی بین پروتئین‌های آپوپتوتیک و اتوفاژیک خاص، تقریباً پیچیده و بسیار در هم تنیده به‌نظر می‌آید [۱–۳]. در این راستا، برخی محققان معتقدند که پروتئین‌های اتوفاژی از جمله بکلین– ۱ (Beclin-1)[۱] در تنظیم پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 نقش اساسی دارند. به‌طوری‌که نشان داده شده است اتصال Bcl-2 به دُمین[۲]BH3 پروتئین بکلین–۱ موجب مهار اتوفاژی می‌شود؛ ولی، اتصال بکلین–۱ به Bcl-2 موجب القای آپوپتوز توسط خنثی‌سازی عملکرد ضدآپوپتوتیک Bcl-2 می‌گردد [۴]. به هر حال، تنظیم سویچ بین پروتئین‌های ماشین اتوفاژی و آپوپتوز می‌تواند رویکرد جدیدی برای برقراری هومئوستاز بقاء یا مرگ سلولی به حساب آید [۴]. برای نمونه، هیروشیمی‌موراسی[۳] و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند درمان موش‌های دیابتی نوع دو با ویلداگلیپتین[۴] باعث کاهش مرگ و میر ناشی از انفارکتوس قلبی از طریق کاهش در تعامل مجموعهٔ Bcl-2/Beclin-1 می‌شود [۵]. اخیراً کوی‌ژو[۵] و همکاران (۲۰۱۸) نیز با مطالعهٔ سلول‌های میوبلاست قلبی H9C2 در معرض گلوکز بالا در ترکیب با پالمیتات به مدت ۳۶ ساعت به فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی AMPK و JNK1 و در نتیجه بازیابی اتوفاژی و تعدیل در مرگ آپوپتوتیک از طریق قطع ارتباط Bcl-2/Beclin-1 عنوان داشتند [۶].

این در حالی است که، طی سالیان اخیر نقش دوگانهٔ کافئین[۶] بر فرآیندهای اتوفاژی و آپوپتوز و هم‌سویی موجود بین این دو رویداد مهم سلولی توجه بسیاری از محققان را به سوی خود جلب کرده است [۷]. کافئین پورین کریستالی شکل سفید، تلخ و یک آلکالوئید متیل‌گزانتینی بوده که از لحاظ شکل شیمیایی به آدنین و گوانین موجود در اسید دئوکسی‌ریبونوکلئیک (DNA) و اسید ریبونوکلئیک (RNA) بوده و دارای دامنهٔ گسترده‌ای از فعالیت‌های فارماکولوژیکی شامل مهار نوکلئوتیدهای حلقوی فسفودی‌استراز (PDEs)[۷]، افزایش در سطوح cAMP و مهار فعالیت پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی PI3K-Akt-mTOR است [۷–۹]. سائیکی[۸] و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که کافئین موجب القاء آپوپتوز توسط تقویت اتوفاژی از طریق مهار مسیر $PI3K\text{-}Akt\text{-}mTOR\text{-}p^{70S6K}$ می‌شود [۱۰]. فانگلی[۹] و همکاران (۲۰۱۸) نیز با بررسی دوز خوراکی کافئین (۱۰ میکرومول) بر پیری ناشی از فشار اکسایشی توسط آزوبیس[۱۰] به افزایش در بیان پروتئین بکلین–۱ و تبدیل LC3-I/II بواسطهٔ فعال سازی مسیر A2αR/SIRT3/AMPK اذعان داشتند [۸]. همچنین، گروه تحقیقاتی آنگی‌لی[۱۱] و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی غلظت کافئین به سرکوب موجودیت سلولی و القاء آپوپتوز از طریق افزایش در بیان پروتئین Bax و کاهش در Bcl-2 عنوان داشتند [۱۱]. در حالی که یافته‌های پژوهش ناکاسو[۱۲] و همکاران (۲۰۰۸) نشان دهندهٔ اثرات جلوگیری کنندهٔ کافئین از آپوپتوزیس (کاهش فعالیت کاسپاز–۳) در نرون‌ها از طریق فعال‌سازی مسیر وابسته به Akt می‌گردد [۱۲].

از سوی دیگر، نشان داده شده است که تحریکات فیزیولوژیکی ناشی از انجام فعالیت‌های بدنی باعث برقراری تعادل متقابل بین این دو حالت از بین برندهٔ سلولی می‌شوند. به‌عنوان نمونه، هی[۱۳] و همکاران (۲۰۱۲) متعاقب انجام فعالیت حاد دویدن در شیب ۱۰ درجه به مدت ۵۰ دقیقه به افزایش در جریان اتوفاژی از طریق جداسازی مجموعهٔ Bcl-2/Beclin1 در عضلات دوقلوی موش‌ها اشاره داشتند [۱۳]. به‌علاوه، وِنگ[۱۴] و همکاران (۲۰۱۳) عنوان نمودند که قرارگیری در معرض فعالیت هیپوکسیک (بار کاری ۱۰۰ وات به‌مدت ۳۰ دقیقه درون محفظه با غلظت اکسیژن ۱۲٪ مطابق با ارتفاع ۴۴۶۰ متری) ۴۸ ساعت قبل و پس از دو رژیم تمرینی تناوبی با شدت بالا (HIIT) و تمرینات تداومی با شدت متوسط (MICT)[۱۵] هر دو به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز (۵ روز در هفته و به‌مدت ۵ هفته) در ۳۰ مرد کم‌تحرک سالم موجب سرکوب مراحل مرگ سلولی اتوفاژی توسط کاهش در بیان پروتئین‌هایی همچون: بکلین–۱، Atg1، LC3-II و LAMP-2 و به‌طور همزمان افزایش جریان آپوپتوز توسط افزایش در فسفوریلاسیون پروتئین Bcl-2 (درصورت فسفوریله شدن مهار می‌گردد) و فعال شدن کاسپاز–۳ و ۹ در لنفوسیت‌های CD4 می‌گردد [۱۴].

۱Beclin-1
۲Domin
۳HiromichiMurase
۴Vildagliptin
۵KuiXu
۶Dual role of caffeine
۷Phosphodiesterase
۸Saiki
۹Yi-Fangli
۱۰Azobis
۱۱Anqi li
۱۲Nakaso
۱۳Congcong He
۱۴Weng
۱۵Moderate intensity-continuous

Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

از این رو، با توجه به اثرات مثبت احتمالی سازگاری‌های فیزیولوژیک قلبی در پاسخ به تمرینات تناوبی شدید [۱۵] و نقش احتمالی مکمل کافئین و همچنین نقش مثبت این مداخلات در تعدیل فرآیند اتوفاژیکی و بهبود فرآیند ضدآپوپتوزی میوکارد قلبی [۱۶] و احتمال تحریک بیان ژن‌های Beclin-1 و Bcl-2در راستای سازگاری‌های مثبت میوکارد قلبی [۱۷-۱۹]، ما چنین فرض کردیم که: ۱- تمرین تناوبی شدید می‌تواند بر بیان پروتئین‌های Beclin-1و Bcl-2در موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع دو موثر باشد. ۲- مکمل کافئین می‌تواند در بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2در موش‌های نر دیابتی نوع دو موثر باشد. ۳- ترکیب مداخلات تمرین تناوبی شدید و مکمل کافئین می‌توانند نقش موثرتری در بهبود بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2در موش‌های نر دیابتی نوع دو داشته باشند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات دو ماه تمرین تناوبی شدید و مکمل‌دهی کافئین بر بیان پروتئین‌های Beclin-1 و Bcl-2 در میوکارد قلبی موش‌های صحرایی نر دیابتی نوع دو بود.

روش شناسی

الف) روش تحقیق

تحقیق حاضر از نوع مطالعات حیوانی بالینی مداخله‌ای تجربی (دو متغیر مستقل) در قالب یک طرح پیش‌آزمون- پس‌آزمون دو عاملی است که با استفاده از پنج گروه ۱۰ سری از موش‌ها بر اساس مقررات نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز پس از تصویب در کمیتهٔ اخلاق در پژوهش معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز (IR.TBZMED.VCR.REC.1397.389) انجام شد.بدین منظور، تعداد ۵۰ سر موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار به روش در دسترس از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با سن حدود سه ماه و در محدودهٔ وزنی ۲۲۵ الی ۳۰۰ گرمی انتخاب شدند. در ادامه، به‌منظور 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 چرخهٔ شبانه (ساعت ۱۹:۰۰) در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. به‌طوری‌که آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل؛ دما ۲±۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کمترین صدا و چرخهٔ روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح الی ۱۹:۰۰ عصر) به‌صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به‌صورت آزادانه[۱] به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان اصفهان) به‌مدت سه ماه (فصل بهار) دسترسی داشتند که این میزان غذای مصرفی به‌صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد. به‌علاوه، در این تحقیق از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده گردید که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آن‌ها پائین‌تر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. سپس نمونه‌ها در پایان این دوره (سازگاری)، پس از مطابقت وزنی به‌طور تصادفی ساده در ۵ گروه ۱۰ سری جای گرفتند.

ب) روش القاء دیابت

پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع ۲، طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران[۲] 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 و سپس تزریق درون صفاقی (IP)[۳] سم استرپتوزوسین[۴] (شرکت سیگما آلدریچ[۵]، 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 به‌صورت تک وهله‌ای اعمال شد [۲۰]. برای گروه کنترل سالم و دیابتی (بدون مکمل و بدون تمرین) نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک (سالین)[۶] برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت کنندهٔ مکمل تزریق گردید. یک هفته پس از دیابتی کردن، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ 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 (۲۱). به منظور کنترل وزن، وزن موش‌های صحرایی در ابتدا، وسط و انتهای تحقیق توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

ج) مصرف کافئین

طریقهٔ مصرف کافئین بدین شکل بود که پودر کافئین خالص انهیدروز[۷] (خشک) تهیه شده از شرکت آلمانی مرک[۸] 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 به متوسط دوز کشندهٔ LD_{50}=۱۹۰mg.kg^{-1} برای موش) به‌طور کافئین هیدراته (محلول با سالین) و به‌صورت درون صفاقی

۱Ad libitum

۲Suja Rani Sasidharan

۳Intraperitoneal injection

۴Streptozotocin

۵Sigma-Aldrich

۶Saline

۷Anhydrous

۸Merck KGaA

Copyright ©The authors

Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

(IP)[۱] با استفاده از سرنگ انسولین تزریق گردید (برابر با ۱۴ میلی‌گرم کافئین به ازای هر ۲۰۰ گرم از وزن بدن موش). باتوجه به اینکه به خوبی نشان داده شده است منحنی‌های جذب و فراهمی زیستی کافئین بر اساس غلظت–زمان (AUC)[۲] در میان انسان و موش مشابه بوده و 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[۳] می‌باشد [۱۰،۲۲]؛ بنابراین، برای ارتقاء سطوح کافئین پلاسمایی در طی فعالیت در تحقیق حاضر نیز، کافئین ۶۰ دقیقه قبل از انجام قرارداد تمرینی تجویز شد. لازم به ذکر است، کافئین در دورهٔ بیدارشدن موش‌ها از خواب و اوایل زمان فعالیت آن‌ها در محدودهٔ زمانی ساعت ۱۹–۱۸ عصر تجویز گردید.

د) روش تمرینی

روش تمرینی دو گروه تمرینی تحقیق حاضر (T+D و D+T+CA) برگرفته از مطالعهٔ عسگری‌هزاوه و همکاران (۱۳۹۶) بود که در آن آزمودنی‌ها ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) به مدت ۸ هفته در یک برنامهٔ تمرین تناوبی شدید (HIIT) در محدودهٔ ساعت ۲۰–۱۹ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (مدل TR105، شرکت تکنیک آزما، تبریز، ایران) شرکت نمودند [۲۳]. قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبهٔ بیشینه سرعت موش‌ها انجام گرفت. بطوری‌که، سرعت 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 با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوارگردان باوجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص گردید. به‌طوری‌که میانگین بیشینه سرعت به‌دست آمده به هنگام واماندگی معادل ۳±۲۸ متر بر دقیقه بود.

روش تمرین HIIT شامل سه مرحلهٔ گرم‌کردن، تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحلهٔ گرم و سرد کردن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (معادل ۴۰–۳۰٪ $VO2_{max}$) برای موش‌ها در نظر گرفته شد. شدت تمرین نیز برابر با ۹۰–۸۵٪ سرعت بیشینه در آزمون وامانده ساز (تقریباً برابر با ۲۵–۲۳ متر بر دقیقه) سرعت بیشینه در ۶ تا ۱۳ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه گردید) بود. به‌علاوه، تناوب‌های یک دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دوهای تداومی روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود که میان وهله‌های فعالیتی اعمال گردید [۲۴]. همچنین، گروه کنترل سالم که در هیچ‌گونه برنامهٔ فعالیتی شرکت نکردند، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با وُلتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان استفاده گردید.

ه) روش تجزیه و تحلیل ایمونوبلاتینگ

تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ $mg.kg^{-1}$) و زایلازین (۱۰ $mg.kg^{-1}$) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت نوک بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع (۱۹۶ C°–) منجمد و در دمای (۷۰ C°–) نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان برخی از پروتئین‌های درگیر در مسیرهای اتوفاژی و آپوپتوز از روش وسترن بلات استفاده گردید. ابتدا، برای تهیهٔ هموژنه ۱۰٪ وزنی حجم بافت قلب از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهار کنندهٔ پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده گردید. غلظت تام پروتئین‌ها با روش برآدفورد (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دِناتوره کنندهٔ پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) با دستگاه الکتروفورز (Biorad) تفکیک شد. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) سیگما منتقل گردید. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی بادی اولیه خرگوشی ضد Beclin-1 و ضد Bcl-2 ساخت شرکت سانتاکروز آمریکا به ترتیب با کُد sc-48341 و sc-492 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. 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 به‌مدت 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 شده و دانسیتهٔ باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا–اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج بصورت دانسیتهٔ نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه شد [۲۴].

و) روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها در قالب میانگین به‌صورت توصیفی به‌شکل نمودار ارائه شد. سپس، توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف–اسمیرنوف بررسی گردید. پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها و باتوجه به هدف تحقیق، نخست پیش فرض تحقیق مبنی بر تفاوت معنی‌دار گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از ANOVA یک طرفه بررسی و اثرات جداگانه و همزمان متغیرهای مستقل تمرین و مصرف مکمل کافئین بر روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح

۱Intra Protaneal

۲Area Under the Curve

۳Dose-dependent effect

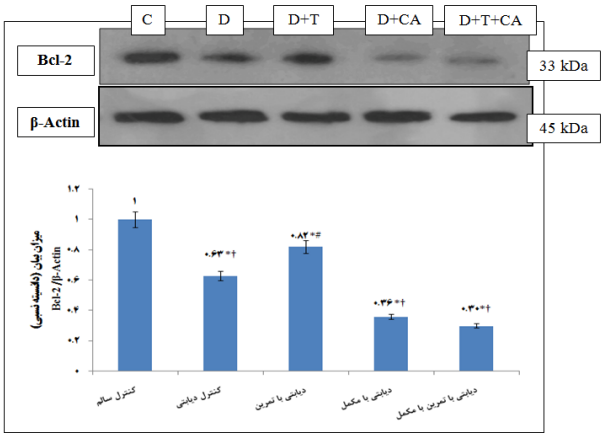
Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

آماری ۲×۲ با ANOVA عاملی دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل گردید. سهم اثر هریک از متغیرها نیز با استفاده از مجذور اِتا یا امگا دو (یا دست کم با درصد تغییرات) مشخص شد. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار آماری SPPS تحت ویندوز انجام شد.

یافته‌ها

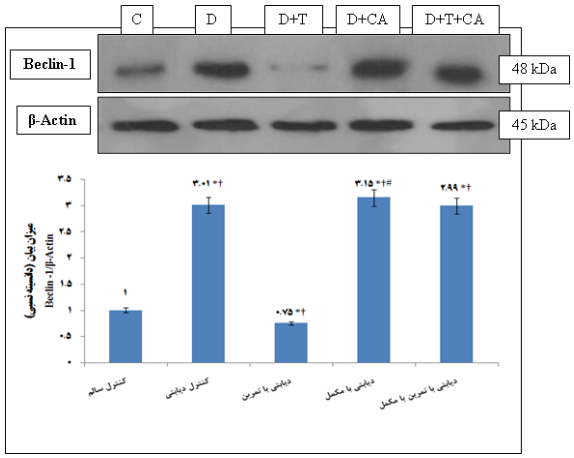
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که القاء دیابت دارای اثرات تاملی قابل توجهی با گروه‌هایی است که تحت تیمار با مکمل کافئین قرار گرفتند، در حالی‌که، یافته‌ها بر اثرات تقابلی گروه مداخلهٔ تمرینی با بروز دیابت اشاره داشتند (F=۴۵۸/۶۲ ،P=۰/۰۰۱). چنان‌که، میزان بیان پروتئین بکلین-۱ نسبت به B-Actin، در گروه کنترل دیابتی (D) ۲۰۱٪، گروه دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA) ۲۱۵٪ و در گروه دیابتی تمرین- کافئین (D+CA+T) ۱۹۹٪ بیشتر از گروه کنترل سالم (C) بود (P=۰/۰۰۱). از طرفی، میزان بیان پروتئین مرتبط با اتوفاژی در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در مقایسه با گروه کنترل سالم در حدود ۲۵ درصد کمتر بود (P=۰/۰۳۸). ذکر این نکته ضروری است که اثر بکلین-۱ در گروه دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA)، به‌طور غیرمعنی‌دار و در حدود ۱۵٪ بیشتر از گروه کنترل دیابتی (D) بود (P=۰/۳۹).

همچنین، میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (F=۷۳/۸۳ ،P=۰/۰۰۱). به‌طوری‌که میزان بیان این پروتئین در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری در حدود ۳۷ درصد کمتر بود (P=۰/۰۰۱). در حالی‌که میزان بیان این پروتئین در گروه دیابتی دریافت کننده کافئین (D+CA) و گروه دیابتی تمرین- کافئین (D+T+CA) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم به‌ترتیب در حدود ۶۴ و ۷۰ درصد کمتر بود (P=۰/۰۰۱). به‌طوری‌که، میزان کاهش این پروتئین در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در حدود ۲۰٪ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کمتر بود (P=۰/۳۲).



نمودار ۱. میزان بیان پروتئین Bcl-2 در میوکارد موش‌های صحرایی دیابتی تمرین کرده با و بدون تیمار کافئین در مقایسه با گروه‌های کنترل.

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین Bcl-2 نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. * نشان دهندهٔ تفاوت معنی‌دار گروه ها (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل سالم. † نشان دهندهٔ تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین گروه های دیابتی تمرین کرده در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی.



نمودار ۲. میزان بیان پروتئین بکلین-۱ (Beclin-1) در میوکارد موش های صحرایی دیابتی تمرین کرده با و بدون تیمار کافئین در مقایسه با گروه های کنترل.

الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین بکلین-۱ (Beclin-1) نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. * نشان دهندهٔ تفاوت معنی‌دار گروه ها (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل سالم. † نشان دهندهٔ تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین گروه های دیابتی تمرین کرده در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی.

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های مطالعهٔ حاضر نشان داد که القای دیابت نوع دو موجب افزایش در میزان پروتئین بکلین-۱ مرتبط با اتوفاژی و همچنین کاهش بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 می‌شود. نتایج پژوهش پیش‌رو حاکی از وجود اثر تقابلی معنی‌دار بین گروهی در میزان بیان پروتئین Beclin-1 در عضلهٔ قلبی موش‌های دیابتی بود. چنانچه، مصرف کافئین در گروه دیابتی (D+CA) موجب تشدید در میزان بیان این پروتئین به میزان ۲۱۵و ۲۴۰ درصد در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم (C) و دیابتی با تمرین (D+T) گردید. در حالیکه، میزان بیان این پروتئین در گروه دیابتی با تمرین با کافئین (D+T+CA) بطور غیرمعنی‌داری سبب کاهش در مقایسه با گروه‌های کنترل دیابتی (D) و دیابتی با کافئین (D+CA) گردید. در تأیید نتایج تحقیق ما، گروه تحقیقاتی شانخین‌لی[1] و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که سطوح پروتئین‌های اتوفاژیک مانند بکلین-۱ در مُدل مقاومت به انسولینی

[1] Shanxin Li

Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

کاردیوموسیت‌های موش‌های در معرض اسیدپالمتیک تشدید شده و همچنین سبب فعال‌سازی و افزایش در میزان آپوپتوز (کاهش در فعالیت Bcl-2) می‌شود [۲۵]. همین‌طور، چایونگ هی[۱] و همکاران (۲۰۱۳) از قطع ارتباط مجموعهٔ Bcl-2 و بکلین-۱ توسط فعال‌سازی AMPK و تقویت اتوفاژی قلبی و حفاظت در برابر آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌های دیابتی از طریق فعال‌سازی مسیرهای JNK-1/Bcl-2 و جداسازی ارتباط بکلین-۱ از Bcl-2 خبر دادند [۲۶]. محققان افزایش در هر دوی فعالیت ماشین اتوفاژی و آپوپتوزی را احتمالاً از طریق کاهش در فسفوریلاسیون (خاموش کردن) اجزاء مسیر بقاء یعنی PI3K-Akt-mTOR-p70s6k و افزایش در فسفوریلاسیون (روشن کردن) پروتئین‌های مسیرهای پیام‌رسانی مرگ یعنی JNK ERK1/2 و افزایش پروتئین PTEN عنوان کرده‌اند [۹،۱۱]. از سویی، بوخ‌مولر[۲] و همکاران (۲۰۱۷) چنین گزارش کردند که پروتئین‌های 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 [۲۷]. مشاهدهٔ تفاوت در نقش تقویت‌کنندگی در مقایسه با اثرات سرکوب‌کنندگی مرگ سلولی ناشی از دیابت ممکن است به‌علت ضرورت در حفظ عمکلرد طبیعی سلول در شرایط مختلف و آن هم از طریق یک پارادایم وابسته به تعاملات فیزیولوژیک میان برخی از جفت پروتئین‌های اتوفاژیک و آپوپتوتیک هم‌چون تحقیق پیش‌رو باشد [۲۶،۲۷]. به‌طوری‌که، آرایش مولکولی آن‌ها در بسیاری از جنبه‌ها متفاوت و گاهاً متناقض است. چنان‌که در مطالعات فوق‌الذکر نیز مشاهده شد نقش پروتئین‌های خانوادهٔ Bcl-2 به‌عنوان شریک اتصال مستقیم پروتئین بکلین-۱ سبب کاهش در فعالیت اتوفاژیک می‌گردد. در حالت استراحت سلولی، Bcl-2 دائماً متصل به بکلین-۱ بوده و باعث ایجاد اتوفاژی سطح پائین می‌شود. در حالی‌که تحت وضعیت القاء اتوفاژی مانند شرایط ایجاد دیابت، Bcl-2 از بکلین-۱ جدا شده و منجر به افزایش اتوفاژی و از سویی تقویت آپوپتوز می‌گردد [۴, ۲۷].

به هر حال، نتایج تحقیق حاضر در راستای تعیین اثر عوامل مداخله‌گر، انجام تمرین تناوبی شدید و تیمار کافئین در میوکارد موش‌های صحرایی نشان داد که دو ماه تیمار کافئین به میزان ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز می‌تواند باعث افزایش قابل توجه در هر دوی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق افزایش ۲۱۵٪ در میزان بیان پروتئین بکلین-۱ و کاهش معنی‌دار ۶۴٪ در بیان پروتئین Bcl-2 در بافت میوکارد موش‌های مبتلاء به دیابت نوع دو شود. همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، سائیکی[۳] و همکاران (۲۰۱۱) متعاقب تجویز کافئین به میزان ۲۵-۵ میلی‌مول به مدت ۴۸ ساعت در رده سلولی SH-SY5Y به افزایش در میزان LC3-II و درنتیجه افزایش اتوفاژی و همچنین کاهش در پتانسیل غشای میتوکندریایی (MMP)[۴]، تعدیل در چرخهٔ سلولی و القاء پروتئین p53 می‌شود. از این‌رو، آن‌ها اعلام داشتند که افزایش فرآیند آپوپتوز تا حد زیادی به دوز مصرفی کافئین وابسته است [۱۰]. فانگلی و همکاران (۲۰۱۸) نیز بر اثر وابسته به دوز کافئین (۱۰ میکرومول) بر بیان پروتئین بکلین-۱، تبدیل LC3-I/II و در نتیجه القاء اتوفاژی تأکید داشتند [۸]. در این راستا، لی و همکاران (۲۰۱۶) اظهار داشتند تیمار ۴۰۰ یا ۶۰۰ میکرومولی کافئین به‌طور معنی‌داری باعث القاء آپوپتوز (افزایش در میزان پروتئین Bax و کاهش در Bcl-2) و کاهش در موجودیت سلول‌های ملانوم می‌شود [۱۱]. در راستای این مفهوم، محققان سازوکار سلولی و مولکولی که کافئین از طریق آن موجب تحریک در پیام‌رسانی مسیرهای درگیر در آبشار مرگ سلولی می‌گردد را شامل غیرفعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی بقاء سلولی PI3K-Akt-mTOR و فعال‌سازی مسیرهای دخیل در مرگ سلولی همچون پروتئین‌کیناز ۲ فعال شده بر اثر p21 (PAK2) و کینازهای N-ترمینال و C-جانوس (JNK) می‌دانند [۲, ۱۰]. این در حالی است که، برخی از مطالعات نیز در تناقض با یافته‌های تحقیق حاضر به اثرات مهاری کافئین بر شاخص‌های مرگ سولی اشاره دارند. به‌عنوان نمونه، پیتاکسالی و همکاران (۲۰۱۵) اظهار داشتند که اتوفاژی در خط سلولی نروبلاستوما SH-SY5Y به‌دنبال مواجهه با ۱ میلی‌مول کافئین مهار شده که این کاهش از طریق سرکوب بیان LC3-II و تعداد اتوفاگوزوم‌ها می‌گردد [۲۹].

به هر حال، نتایج حاضر حاکی است که اعمال دو ماه تمرین تناوبی شدید (HIIT) این توانایی را دارد که باعث افزایش در بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 کاهش یافته و تعدیل در سطوح افزایش یافتهٔ پروتئین اتوفاژیک یعنی بکلین-۱ در میوکارد موش‌های صحرایی ناشی از دیابت گردد. بر این اساس، حسنی و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه اثرات تمرین تناوبی شدید با سرعت ۳۴-۲۰ متر بر دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳ روز در هفته به‌مدت ۸ هفته به کاهش در سطوح Bax و افزایش در Bcl-2 در بافت مغزی موش‌های صحرایی ویستار اشاره داشتند [۳۰]. مخیاس‌پنا[۵] و همکاران (۲۰۱۷) نیز با بررسی اثرات ۸ هفته تمرینات مقاومتی بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) در آزمودنی‌های زن و مرد سالم کهنسال، به روند کاهشی بیان پروتئین بکلین-۱ و روند افزایشی بیان پروتئین Bcl-2 و Bcl-xl اشاره داشتند [۳۱]. به‌علاوه، کای‌لو[۶] و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثر تمرینات تناوبی شدید (۸ هفته به صورت ۵ روز در هفته) بر میزان آپوپتوز بافت بطن چپ میوکارد، به افزایش Bcl-2 و کاهش در سطوح Bax اشاره داشتند [۳۲]. از طرفی در تناقض با یافته‌های پژوهش حاضر، نتایج یافته‌های وِنگ و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد، اگرچه فعالیت در

۱Chayong He
۲BuchMøller
۳Saiki
۴Mitochondrial Membrane Potential
۵Mejias-Pena
۶KAI LU

Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

یک محیط هیپوکسیک منجربه نقص در سازوکارهای مرگ سلولی می‌گردد، اما اعمال رژیم فعالیتی HIIT باعث جلوگیری از اتوفاژی کاهش یافته و آپوپتوز تقویت شده از طریق بازیابی فعالیت پروتئین‌های اتوفاژیک و افزایش سطوح پروتئین‌های ضدآپوپتوتیکی می‌گردد [۱۴]. چنانچه پیش‌تر نیز اشاره شد به‌نظر می‌رسد وضعیت و محیط فعالیتی که بافت با آن مواجهه می‌شود، همچون ابتلاء به دیابت در تحقیق حاضر و قرارگیری در شرایط هیپوکسیک همچون مطالعه وِنگ و حتی کهنسالی در پژوهش مخیاس‌پنا در چگونگی پاسخ بافت مورد مطالعه به مسیرهای مرگ سلولی از اهمیت فوق‌العادی برخوردار باشد. با این اوضاع یکی از بزرگترین محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم وجود گروه کنترل سالم تمرین کرده است تا پاسخ پروتئین‌های درگیر در مرگ سلولی را در شرایط ابتلاء به دیابت و عدم ابتلاء مورد مقایسه و بحث و بررسی قرار داده تا از این طریق نحوهٔ پاسخ به این شرایط از سوی مداخلات آشکارتر گردد.

از طرفی، مشاهده شد که نتایج حاصل از اعمال تمرینات تناوبی شدید به‌دنبال ترکیب با کافئین به‌کلی معکوس شده و کافئین احتمالاً مُلغی کنندهٔ آثار فعالیت‌بدنی بر بیان پروتئین‌های مرتبط با مرگ سلولی در شرایط پاتولوژیک باشد. در این راستا، نشان داده شده است که کافئین القاء کنندهٔ مرگ سلولی از طریق فعال‌سازی پیام‌رسانی وابسته به مسیرهای آپوپتوتیک و غیرفعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی بقاء در سلول‌های استئوبلاست انسانی است. در مطالعه‌ای گروه پین‌ژن لو[۱] و همکاران (۲۰۰۸) اذعان داشتند که سطوح پروتئین Bax و Bcl-2 در استئوبلاست‌ها متعاقب تیمار کافئین با غلظت بیش از ۰/۵ میلی‌مول به‌ترتیب افزایش و کاهش پیدا می‌کند [۳۳]. به‌علاوه، کافئین می‌تواند موجب کاهش سطوح پروتئین‌های HSP90، Ras، Raf-1 و Akt، مهار فعالیت ERK و Akt و فعال کنندهٔ PAK2 و JNK درگیر در فعال‌سازی آپوپتوز شود [۳۳]. در این راستا، چن[۲] و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثرات ۰/۵ و ۱ میلی‌مول کافئین در سلول‌های گلیومای ردهٔ RT-2، به این نکته اشاره داشتند که تیمار کافئین می‌تواند باعث توقف فاز G0/G1 در چرخه سلولی (کاهش تکثیر سلول)، افزایش بیان پروتئین PTEN، غیرفعال کردن مسیر پیام‌رسانی PI3K-Akt-mTOR و القاء مرگ سلولی وابسته به کاسپاز شود [۳۴]. ماتیو[۳] و همکاران (۲۰۱۴) نیز اظهار داشتند کافئین ارتقاء دهندهٔ اتوفاژی به‌واسطهٔ افزایش در بیان پروتئین LC3-II در سلول‌های عضلات اسکلتی پستانداران از طریق افزایش در فعال‌سازی پروتئین‌کیناز فعال شده بر اثر کلسیم/کالمودولین(CaMKKB) در یک روش وابسته به دوز می‌گردد [۳۵]. چنین به نظر می‌رسد که تجویز کافئین در شرایط بیماری‌زا همچون دیابت باعث هیپرفسفوریلاسیون اجزاء مسیرهای پائین‌دستی درگیر در فعال‌سازی فرآیندهای مرگ سلولی یعنی PI3k/Akt/mTOR/P70s6k می‌گردد [۱۰].

نتیجه‌گیری

به هر حال، نتایج مطالعه حاکی است که القاء دیابت موجب افزایش در میزان هردوی مرگ سلولی آپوپتوتیک و اتوفاژیک از طریق کاهش در بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش در بیان پروتئین بکلین-۱ می‌گردد. هر چند، تجویز جداگانهٔ کافئین و تمرین تناوبی شدید به‌ترتیب موجب تشدید و تعدیل فعالیت هر دو ماشین مرگ سلولی می‌شود. ولی، ترکیب همزمان کافئین با تمرینات تناوبی شدید باعث افزایش هرچه بیشتر در فرآیند مرگ آپوپتوتیک و اتوفاژیک می‌گردد. چنانچه به‌نظر می‌رسد مصرف کافئین سبب از بین بردن اثرات سودمند و مثبت تمرینات تناوبی شدیدی می‌شود که خود منجربه کاهش در فعالیت شاخص‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی سلولی است. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد کافئین مداخلهٔ مناسبی برای تعادل بین دو مسیر اصلی مرگ سلولی ناشی از ابتلاء به دیابت در بافت قلبی موش‌ها نباشد. البته، برای نتیجه‌گیری قطعی در این مورد و به‌ویژه در رابطه با تعیین اثر مصرف کافئین به‌تنهایی و همراه با تمرینات تناوبی شدید بر شاخص‌های آپوپتوتیک و اتوفاژی در نمونه‌های سالم و دیابتی در بافت‌های انسانی، نیاز به مطالعات بیشتری است.

تقدیر و تشکر

پژوهشگران مراتب سپاس خویش را از همه کسانی که به نوعی در اجرای این طرح یاری فرمودند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

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

منابع

1. Dorn, G.W., Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure. Cell Cycle, 2010; **9**(17): p. 3442-3448.
2. Rubinstein, A.D. and A. Kimchi, Life in the balance– a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. Journal of Cell Science, 2012; **125**(22): p. 5259-5268.
3. Nikoletopoulou, V., et al., Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research,2013; **1833**(12): p. 3448-3459.
4. Marquez, R.T. and L. Xu, Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple,mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. American Journal of Cancer Research, 2012; **2**(2): p. 214.

۱Pin-Zhen Lu

۲Jin-Cherngchen

۳Mathew

Copyright ©The authors

Applied Health Studies in Sport Physiology. 2020; **7**(2):45-52.
18. Majidi A, Poozesh Jadidi R, Nourazar MAR, Bashiri J, Azali Alamdari KJSP. Effects of Aerobic Training and Curcumin Supplementation on Cardiomyocyte Apoptosis and MiRNAs Expression in Rats Exposed to Arsenic. Sport Physiology. 2020; **12**(48):39-60.
19. PouzeshJadidi G, Seifi-Skishahr F, Bolboli L, Azali Alamdari K, Pourrahim Ghouroghch A. Effect of high intensity interval training and curcumin supplementation on left ventriclular miR-133 and miR-1 gene expression levels in isoproterenol induced myocardial infarction rat model. Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport. 2021; 4337.1638.
20. Sasidharan, S.R., et al. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. BioMed Research International. **2013**; p. 752870.
21. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Life Sciences. 2003; **29**;73(15):1907-16.
22. Sinha, R.A., et al., Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy lysosomal pathway in mice. Hepatology. 2014; **59**(4): p. 1366-1380.
23. Asgari Hazaveh, D., S. Riyahi Malayeri, S. Babaei. 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. Journal of Arak University Medical Sciences. 2018;**20**(11): p. 67-75. [In Persian]
24. Farhadi, H., et al. Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats. Journal of Sports Science. 2016; **2**(16): p. 70-9.
25. Li, S., et al., Excessive autophagy activation and increased apoptosis are associated with palmitic acid-induced cardiomyocyte insulin resistance. Journal of Diabetes Research. **2017:**ID 2376893.
26. He, C., et al., Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. Nature. 2012; **481**(7382): p. 511-515.
27. Møller, A.B., et al., Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. Scientific Reports. 2017; **7**(1): p. 1-11.
28. Flusberg, D.A. and P.K. Sorger, Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. Trends in Cell Biology. 2015; **25**(8): p. 446-458.
29. Pitaksalee, R., et al., Autophagy inhibition by caffeine increases toxicity of methamphetamine in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. Neurological Research. 2015; **27**(4): p. 421-429.
30. Hasani, S. and M. Habibian, The effect of regular high-intensity interval exercise on some apoptotic factors in the brain tissue of old female rats. Feyz:
5. Murase, H., et al., Inhibition of DPP-4 reduces acute mortality after myocardial infarction with restoration of autophagic response in type 2 diabetic rats. Cardiovascular Diabetology, 2015; **14**(1): p. 1-16.
6. Xu, K., et al., Resveratrol modulates apoptosis and autophagy induced by high glucose and palmitate in cardiac cells. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018; **46**(5): p. 2031-2040.
7. Zarghami Kamaneh A, Pashaei Z. The Effect of Medium- And High- Dose of Caffeine (1,3,7-Trimethylxanthine) Intake on Cardiovascular Factors Response at Baseline and Following One-Bout Aerobic Exercise. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2019; **6**(2):25-31.
8. Li, Y.-F., et al., Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of autophagy. Theranostics. 2018; **8**(20): p. 5713-21.
9. 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: (Journal of Kashan University of Medical Sciences). 2014; **18**(3): p. 220-228.[In Persian]
10. Saiki, S., et al., Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. Autophagy. 2011; 7(2): p. 176-187.
11. Li, A. Low concentration of caffeine inhibits cell viability, migration and invasion, and induces cell apoptosis of B16F10 melanoma cells. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2016; **9**(11): p. 11206-11213.
12. Nakaso, K., S. Ito, and K. Nakashima, 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): p. 146-150.
13. He, C., et al., Dissociation of Bcl-2–Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. Journal of Diabetes. 2013; **62**(4): p. 1270-1281.
14. Weng, T.-P., et al., Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. PLOS ONE. 2013; **8**(11): p. e80248.
15. Dadashzadeh A, Poozesh Jadidi R. Effect of HIIT and curcumin consumption on serum troponin I and creatine kinase levels in isopretrenol-treated male mice. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2021; **8**(1):44-53.
16. Ebadi B, Damirchi A, Alamdari K, Darbandi-Azar A, Naderi N. Cardiomyocyte mitochondrial dynamics in health and disease and the role of exercise training: A brief review. Research in Cardiovascular Medicine. 2018; **7**(3):107-15.
17. Moieni A, Hosseini SA. Effect of Resistance Training Combined with Curcumin Supplementation on Expression of Regulatory Genes Related to Myocardial Remodeling in Obese Rats. Journal of

Copyright ©The authors Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

(Journal of Kashan University of Medical Sciences). 2018; **22**(2): p. 128-133. [In Persian]
31. Mejías-Peña, Y., et al., Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. Aging. 2017; **9**(2): p. 408.
32. Lu, K., et al., Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. Molecular Medicine Reports. 2015; **12**(2): p. 2374-2382.
33. Lu, P.-Z., C.-Y. Lai, and W.-H. Chan, 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): p. 698-718.
34. Chen, J.-C., Y.-C. Chan, and J.-H. Hwang, Effects of tetrandrine and caffeine on cell viability and expression of mammalian target of rapamycin, phosphatase and tensin homolog, histone deacetylase 1, and histone acetyltransferase in glioma cells. Tzu Chi Medical Journal. 2015; **27**(2): p. 74-78.
35. Mathew, T., et al., Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2014; **453**(3): p. 411-418.

Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University