Research Paper

The effect of eight-week high intensity interval training (HIIT) and caffeine consumption on glycogen synthase expression and hepatic glycogen levels in diabetic rats

Moin Norozi[1], Abbas Sadeghi[2*], Mohadese Faal Pakdehi[2], Gasem Torabi[3]

1. Department of Sports Physiology, Allameh Qazvini Institute of Higher Education, Qazvin, Iran.
2. Department of Sports Sciences, Faculty of Social Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3. Department of Sports Sciences Ayatollah Amoli University, Amol, Iran

*** Corresponding author e-mail: sadeghi@soc.ikiu.ac.ir**

Citation: Norozi M, Sadeghi A, Faal Pakdehi M, Torabi G. The effect of eight-week high intensity interval training (HIIT) and caffeine consumption on glycogen synthase expression and hepatic glycogen levels in diabetic rats. Daneshvar Medicine 2021; 29(5):41-55.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14819.1101

Abstract

Background and Objective: Diabetes is a common metabolic disease that leads to impaired hepatic glycogen synthesis. The present study investigates the effect of eight weeks of intense intermittent exercise (HIIT) and caffeine consumption on glycogen synthase (GYS2) expression and liver glycogen levels in diabetic rats.

Materials and Methods: In an experimental clinical-intervention study, 50 streptozotocin-induced diabetic rats were divided into 5 equal groups of control (C), diabetic (D), supplemental diabetic (D + CAF), diabetic with exercise (D + T), supplement and exercise (D + CAF + T). The training program consisted of eight weeks, 5 sessions per week (6 to 12 2-minute sessions with an intensity of 85-90% of the maximum speed) and 70 mg/kg of caffeine were injected five days a week. After anesthesia, liver tissue was extracted and the expression levels of (GYS2) and liver glycogen were assessed. Data analysis was performed by independent t-test and two-way ANOVA at a significant level of ($P<0.05$).

Results: Induction of diabetes significantly reduced hepatic glycogen and GYS2 expression ($P<0.001$). Also, caffeine consumption ($P<0.01$) and HIIT ($P=0.024$) both significantly increased GYS2, which had a greater effect of caffeine with a 44% effect size. Also, HIIT ($P=0.529$) and caffeine ($P=0.761$) neither alone, nor in combination ($P=0.12$) caused a significant increase in hepatic glycogen.

Conclusion: According to results, it is possible to suggest HIIT and caffeine consumption as an effective intervention to improve (GYS2) expression. However, a clear statement requires further research in this area.

Keywords: High intensity interval training (HIIT), Caffeine, Diabetes, Glycogen, Glycogen synthase

Received: 05 Jul 2021
Last revised: 04 Nov 2021
Accepted: 13 Nov 2021

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف کافئین بر بیان گلیکوژن سنتاز و میزان گلیکوژن کبدی موش های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی

نویسندگان: معین نوروزی[۱]، عباس صادقی[۲]*، محدثه فعال پاکدهی[۲]، قاسم ترابی[۳]

۱. موسسه آموزش عالی علامه قزوینی، قزوین، ایران
۲. گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم اجتماعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی. دانشگاه آیت الله آملی، آمل، ایران

*نویسنده مسئول: عباس صادقی **Email: sadeghi@soc.ikiu.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت بیماری متابولیکی شایعی است که به اختلال در سنتز گلیکوژن کبدی منجرمی شود. پژوهش حاضر به تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و مصرف کافئین بر بیان گلیکوژن سنتاز (GYS2) و میزان گلیکوژن کبدی موش های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی می‌پردازد.

مواد و روش ها: در یک مطالعه‌ی حیوانی بالینی- مداخله‌ای ۵۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ویستار که با استروپتوزوسین القا دیابت شدند به ۵ گروه مساوی کنترل (**C**)، دیابتی (**D**)، دیابتی با مکمل (**D+CAF**)، دیابتی با تمرین (**D+T**)، دیابتی با مکمل و تمرین (**D+CAF+T**) تقسیم شدند. برنامه‌ی تمرین شامل هشت هفته، هفته‌ای ۵ جلسه (٦ تا ۱۲ وهله ۲ دقیقه‌ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد سرعت ماگزیمم) بود و هفته‌ای پنج روز **mg/kg** ۷۰ کافئین هیدراته تزریق شد. بعد از بیهوش کردن موش ها، بافت کبد استخراج و میزان بیان **GYS2** و گلیکوژن کبدی ارزیابی شد. تحلیل داده‌ها با آزمون‌های **t** مستقل و تحلیل واریانس دو راهه در سطح معناداری (**P<0.05**) انجام شد.

نتایج: القای دیابت باعث کاهش معنی‌دار گلیکوژن کبدی و بیان GYS2 شد (P<۰/۰۰۱). همچنین کافئین (P<۰/۰۰۱) و HIIT (P=۰/۰۲٤) هر دو موجب افزایش معنی‌دار GYS2 شدند که مصرف کافئین با اندازه اثر ٤٤ درصدی تاثیر بیشتری داشت. همچنین HIIT (P=۰/۵۲۹) و کافئین (P=۰/۷٦۱) هیچ کدام بتنهایی و در ترکیب با هم (P=۰/۱۲) موجب افزایش معنی‌دار گلیکوژن کبدی نشدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج تحقیق، احتمالاً بتوان تمرینات HIIT و مصرف کافئین را به‌عنوان مداخله‌ی مؤثر در بهبود بیان GYS2 پیشنهاد داد. هر چند اظهار نظر صریح تحقیقات بیشتری را در این زمینه می طلبد.

واژه های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، کافئین، دیابت، گلیکوژن، گلیکوژن سنتاز

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۲
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

مقدمه

دیابت بیماری متابولیکی شایعی است که در آن دوره‌های طولانی مدت هایپرگلیسمی می‌تواند به بافت‌های مختلف آسیب برساند (۱). کبد از طریق فرآیندهای گلیکوژنز, گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز نقش مهمی در کنترل گلوکز خون ایفا می‌کند که این عملکرد در بیماری دیابت به‌شدت آسیب می بیند (۲). بعد از صرف غذا, با تبدیل گلوکز به گلیکوژن در عضله و کبد گلوکز از جریان خون پاکسازی می‌شود, کبد می تواند هنگام دریافت خوراکی گلوکز تا یک‌سوم از بار گلوکز خون را به خود اختصاص بدهد (۳،٤). برای سنتز گلیکوژن در بدن, گلوکز باید به شکل فعال خود تبدیل شود و سپس به واحدهای انتهایی گلیکوژنین نوساخته اضافه گردد. این واکنش توسط آنزیم گلیکوژن سنتاز (GYS) که توسط دو ژن GYS1 در عضله و سایر بافت‌ها و GYS2 در کبد, رمزگذاری می‌شود کاتالیز می‌گردد (٤،٥). نقص در بیان ژن GYS2 باعث هیپوگلایسمی ناشتا, هایپرگلایسمی بعد از غذا (٦) و کاهش یا عدم فعالیت گلیکوژن سنتاز کبد می شود (۷). در مطالعه‌ای بر روی موش‌های فاقد GYS2, کمبود گلیکوژن سنتاز کبدی و کاهش ۹۵ درصدی ذخایر گلیکوژن کبد را مشاهده کردند (٤). همچنین مشاهده شد که موش‌هایی که GYS2 در آن‌ها مختل شده بود بعد از صرف غذا دارای ظرفیت کمتری برای انجام تمرینات طاقت‌فرسا نسبت به گروه کنترل بودند (۸). با توجه به مطالعاتی که بر روی ژن GYS (با توجه به شیوه فعال‌سازی مشترک هر دو نوع این ژن ها با واسطه پروتئین فسفاتاز ۱ (PP1) فعال می‌شوند) (٦) انجام شده است, در نمونه برداری‌های عضلانی از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش بیان ژن GYS1 و فعالیت گلیکوژن سنتاز گزارش‌شده است و تزریق انسولین باعث تحریک در بیان آن شد (۹). انسولین باعث افزایش تحریک سنتز پروتئین گلیکوژن سنتاز و فعالیت آن می‌شود (۷). در مطالعه‌ای کاهش بیان ژن GYS2 در بافت چربی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ تایید گردید (۱۰) و در مطالعه ای دیگر ارتباطی بین دیابت نوع ۲ با نقص ژن GYS2 را مشاهده نشد (۱۱). نمی‌توان نظر قطعی در ارتباط بین بیماری دیابت نوع دو و نقص در ژن GYS داد و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه هست اما چیزی که مسلم است این است که اختلال در بیان GYS بر میزان آنزیم گلیکوژن سنتاز که محدود کننده سرعت گلیکوژنز در کبد است, آسیب می زند (۱۲) و یافتن روش‌هایی برای افزایش بیان GYS می‌تواند در ذخیره‌سازی گلیکوژن مؤثر باشد (۱۱).

تمرین تناوبی شدید (HIIT), تمریناتی با تکرارهای کوتاه ورزشی و شدت زیاد است که با دوره‌های استراحت از هم جدا می‌شوند. در مطالعه ای مشاهده شد تمرینات HIIT در ۱۲ هفته نسبت به ٦ هفته و در هر دو دوره تمرینی نسبت به گروه کنترل منجر به افزایش ذخایر گلیکوژن کبدی می‌شود (۱۳). به نظر می‌رسد که تمرینات (HIIT) در راستای بهبود سوخت‌وساز گلوکز و تعدیل مرگ سلولی در مدل‌های دیابتی دارای اثراتی به‌مراتب بهتر از سایر مداخلات غیر دارویی باشد (١٤). مشابه همین نتیجه در مورد GYS عضلانی نیز مشاهده شده است و مشخص گردید که ۳ ساعت بعد از فعالیت بیان GYS تا ۲ برابر افزایش داشته و باعث افزایش جذب گلوکز در عضله اسکلتی و سنتز گلیکوژن گردید (۱۵).

کافئین نیز محرکی است که به‌طور طبیعی در قهوه, چای, شکلات و برخی نوشابه‌های انرژی‌زا وجود دارد و به‌سرعت از دستگاه گوارش جذب‌شده و در تمام بافت‌ها ازجمله مغز توزیع می‌شود (١٦) اوج غلظت کافئین در پلاسما پس از مصرف طبیعی معمولاً حدود ۵۰ میکرومولار و نیمه عمر آن بین ۲/۵ تا ۱۰ ساعت است (۱۷). مصرف قهوه در بیماران مبتلابه دیابت نوع ۲ باعث کاهش سطح گلوکز پلاسما می‌شود و مصرف منظم آن خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ را کاهش می‌دهد. کافئین از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های ریانودین, افزایش تحمل گلوکز, افزایش حساسیت به انسولین و ترشح آن از سلول های بتای جزایر لانگرهانس تأثیر مثبت خود را بر دیابت نوع ۲ اعمال می‌کند, در بیشتر مقالات تجربی به رابطه معکوس بین دیابت نوع ۲ و کافئین اشاره‌شده است (۱۸). در مطالعه‌ای به تأثیر مثبت نوشیدنی های کافئین دار برکاهش قند خون (۱۹) و در مطالعه ای دیگر به هم‌افزایی تأثیرکافئین و گلوکز در مقابل گلوکز به تنهایی در تسریع فعال‌سازی گلیکوژن سنتاز اشاره شده است (۲۰).

تاکنون مطالعه‌ای در مورد تأثیر تمرینات HIIT و مصرف کافئین بر بیان GYS2 و سطح گلیکوژن کبدی در بیماران دیابتی انجام نشده است. در این راستا, این مطالعه به بررسی تأثیر دو مداخله تمرینات HIIT و مکمل کافئین بر میزان بیان GYS2 و سطح گلیکوژن کبدی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی القای دیابت شده با استروپتوزوتوسین پرداخته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

پژوهش حاضر یک مطالعه حیوانی بالینی-مداخله‌ای در قالب یک طرح پس‌آزمون دوعاملی است. کلیه‌ی مراحل تیمار موش‌های بزرگ آزمایشگاهی و آزمایش‌های تجربی در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گردید. این مقاله دارای کد اخلاق TBZMED.VCR.REC.1397.389 است. در این مطالعه اصول و کدهای اخلاق در پژوهش و مفاد بیانیه هلسینکی و کلیه‌ی موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های پزشکی رعایت شده است.برای این منظور ۵۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر سفید سه ماهه نژاد ویستار از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و با روش استروپتوزوسین دیابت شدند, سپس به صورت تصادفی به پنج گروه مساوی ۱۰ تایی به شرح زیر گروه‌بندی شدند:: ۱. گروه کنترل سالم (C) ۲. گروه کنترل دیابتی (D) ۳. گروه دیابتی+کافئین (D+CAF) ٤. گروه دیابتی+تمرین (D+T) و ۵. گروه دیابتی+تمرین+کافئین (D+T+CAF).

به‌منظور جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی و ایجاد حالت سازش با محیط, آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات در شرایط دمایی ۲±۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد, رطوبت نسبی ۵±۵۰٪, و چرخه‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته به صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو قرار گرفتند. در طی این دوره مطالعه تمامی حیوانات به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه‌شده از شرکت خوراک سازان اصفهان) که به‌صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت‌شده بود, دسترسی آزاد داشتند.

روش دیابتی کردن موش‌ها

برای القای دیابت, پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری موش‌ها با محیط آزمایشگاه, طبق روش مطالعات موجود, دو هفته مصرف غذای پرچرب (٤٥٪ چربی, ۲۱٪ پروتئین و ۳٤٪ کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک سازان اصفهان تهیه گردید و سپس تزریق درون صفاقی (IP) استرپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلدریچ, آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (pH=٤/۵) بعد از شش ساعت ناشتایی به‌صورت تک وهله‌ای اعمال شد (۲۱). برای گروه کنترل سالم و دیابتی (بدون کافئین و بدون تمرین) نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت‌کننده کافئین تزریق گردید. پس از یک هفته, نمونه خونی از ورید دمی حیوان جمع‌آوری و میزان گلوکز با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر به عنوان موش‌های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین وارد تحقیق شدند. به‌منظور کنترل بیشتر, وزن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در مراحل مختلف تحقیق توسط ترازوی دیجیتالی انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه تغییرات وزن اولیه و ثانویه و میزان گلوکز خون موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه های تحقیق

	C group	D group	D+T group	D+CA group	D+T+CA group
The Initial weight (g)	299/12±15/88	308/85 ±27/61	301/85±27/15	292/00±64/30	299/14±62/21
The Second weight (g)	329/25 ±24/04	296/14±18/49	312/85±39/03	279/42± 83/59	312/28±19/66
Glucose(mg/dL)	80.6±5.23	373.9±89.78	141.8±50.18	235.80±48.95	150.6±29.45

Values are expressed as mean ± SD
Control(C), Diabetic (D), Diabetic + Caffeine (D+CA), Diabetic + Training (D+T) and Diabetic + Training + Caffeine (D+T+CA)

تیمار با مکمل کافئین

سطح منحنی‌های جذب و فراهمی زیستی کافئین براساس غلظت-زمان (AUC)، در بین انسان و موش مشابه است. به‌گونه‌ای که در مدت تقریباً یک ساعت پس از مصرف مقادیر بالای ۱۰ میلی‌گرم، معمولاً ۹۹٪ از مقادیر مصرفی در طی ٤٥ دقیقه جذب و این مقادیر نیز در یک اثر وابسته به دوز است (۲۲). بنابراین، برای ارتقاء سطوح کافئین پلاسمایی در طی فعالیت در تحقیق حاضر نیز، کافئین ٦٠ دقیقه قبل از انجام پروتکل تمرینی تزریق شد. طریقه‌ی تیمار با کافئین بدین شکل بود که پودر کافئین خالص تهیه از شرکت مرک آلمان با شماره مجوز (۲۵۱۸۳۵۹٤۳۵۵۷۱۰۲۰) از سازمان غذا و دارو، ۵ روز در هفته قبل از پروتکل تمرینی با توجه به وزن بدن حیوان به‌صورت کافئین هیدراته و تزریق درون صفاقی (IP) صورت گرفت (۷ میلی‌گرم کافئین به ازای هر ۱۰۰ گرم از وزن بدن موش محلول در سالین ۰٫۹ گرم درصد NACL).

پروتکل تمرینی (HIIT)

در ابتدا نمونه‌های تحقیق، بجز گروه‌های C و D، به مدت هفت روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۵-۱۰ دقیقه در روز بود. همچنین، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های تمرینی، برای گروه‌های C و D که در هیچ‌گونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نداشتند، ۵ روز در هفته به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوار گردان بی‌حرکت قرار داده شدند. قبل از اجرای پروتکل تمرینی، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبه‌ی بیشینه سرعت موش‌ها انجام گرفت. به‌طوری‌که سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع شد و تا زمان واماندگی موش‌ها ادامه یافت. در هر دو دقیقه یک‌بار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن اضافه شد. زمان خستگی با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوار گردان با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. آزمودنی‌های دو گروه تمرینی تحقیق حاضر (دیابتی با تمرین و دیابتی با تمرین و کافئین) برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) و به مدت هشت هفته در محدوده‌ی ساعت ۱۸-۱٦ عصر بر روی نوار گردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند. روش تمرین HIIT شامل سه مرحله‌ی گرم کردن، بدنه‌ی اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحله‌ی گرم و سرد کردن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (برابر با شدت ٤۰-۳۰٪ VO2max) برای موش‌ها در نظر گرفته شد. بدنه‌ی اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در ٦ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه شد) بود. علاوه بر این، تناوب‌های یک دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوار گردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود در میان وهله‌های فعالیتی اعمال شد (جدول ۲). همچنین، گروه کنترل سالم که در هیچ‌گونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نکرده بود، 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 نوار گردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن نیز از محرک الکتریکی با ولتاژ کم که در قسمت عقبی نوار گردان تعبیه‌شده، استفاده شد (۵).

جدول ۲. پروتکل تمرین تناوبی شدید مورد استفاده در مطالعه

Week	No. of running intervals (2 min)	Running Speed (m.min)	Treadmill grade (%)	Speed of return to active initial state (m.min)
1	6	max speed %85-90	0	10
2	7	max speed %85-90	0	10
3	8	max speed %85-90	0	10
4	9	max speed %85-90	0	10
5	10	max speed %85-90	0	10
6	11	max speed %85-90	0	10
7	12	max speed %85-90	0	10
8	12	max speed %85-90	0	10

Values are expressed as mean ± SD ($p<0.05$)
Control(C), Diabetic (D), Diabetic+Caffeine (D+CA), Diabetic+Training (D+T) and Diabetic+Training+Caffeine (D+T+CA)

نمونه‌گیری خونی و آنالیز آزمایشگاهی

تمامی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی, ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی و پس از ١٢ تا ١٤ ساعت ناشتایی, با تزریق داخل صفاقی کتامین (٩٠ mg/kg) و زایلازین (١٠ mg/kg) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بی‌هوش و جراحی شدند و پس از آن بخش عمده خون (حدود ٥-٤ سی‌سی) مستقیماً از بطن چپ قلب جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون به‌منظور تهیه سرم با دستگاه سانتریفیوژ به مدت ١٥ دقیقه با ٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن‌ها جدا شد. سپس سرم حاصل تا زمان آزمایش‌های بیوشیمیایی در فریزر و در دمای (٨٠-) درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. میزان گلوکز ناشتا با روش کالری متری آنزیمی با فناوری گلوکزاکسیداز با استفاده از کیت گلوکز (شرکت یاخته پژوهان سارای- ایران) اندازه‌گیری شد.

مقایسه تغییرات وزن اولیه و ثانویه و میزان گلوکز خون موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه های تحقیق:

وسترن بلات

بعد از بیهوش کردن موش‌ها بلافاصله کبد آن‌ها استخراج و در سرم فیزیولوژیک شستشو و جهت انجام آزمایش‌های سلولی مولکولی بلافاصله در تانک ازت فریز شده و در فریزر منهای ٨٠ درجه‌ی سانتی گراد نگه‌داری شد. برای استخراج پروتئین‌های کبدی از بافر RIPA حاوی ٠/٠٥ میلی مولار بافر تریس ١٥٠ مولار کلرید سدیم ٠/١ درصد, EGTA, یک درصد SDS به اضافه ٠/١ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل (ROCHE) استفاده شد. به این نحو که ١٠٠ میلی‌گرم بافت در ٥٠٠ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز با یک هموژنایزر دستی هموژنیزه و نیم ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند و سپس به‌مدت ١٠ دقیقه سانتریفوژ شد, بعد از سانتریفوژ کردن, مایع رویی جمع‌آوری و غلظت پروتئین آن با کیت (Bio- Rad) در طول موج ٥٩٥ نانومتر اندازه‌گیری و در پایان در دمای ٢٠ درجه‌ی زیر صفر نگهداری شد, سپس محلول هموژن به‌دست آمده به نسبت ١:١ با نمونه لودینگ بافر (mM50 تریس-کلرید هیدروژن, ٢ درصد سدیم دودسیل سولفات, ١٠ درصد گلیسرول و ٥ در صد بتامرکاپتواتانول و ٠/٠٠٥ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها ٥ دقیقه جوشانده شدند تا پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل-SDS polyacrylamide جداسازی شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت ١ ساعت در ٥ درصد BSA در Tris - Buffered saline و ٠/١ درصد Tween 20 TBST مسدود و در آنتی‌بادی اولیه (١:٥٠٠) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به‌مدت ١ ساعت در دمای اتاق در ٤ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه تحلیل دنسیتومتری با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شدند. آنتی‌بادی‌های استفاده شده عبارتند از:

Glycogen synthase: (SANTA CRUZ, mouse monoclonal antibody (GYS-7H5) sc-81173),
Beta actin (SANTA CRUZ, sc-47778) شرکت SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

هم چنین برای سنجش میزان گلیکوژن از روش colorimetric (570 nm) با استفاده از کیت مربوطه با شماره Catalog Number MAK016 شرکت Sigma-Aldrich Co طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

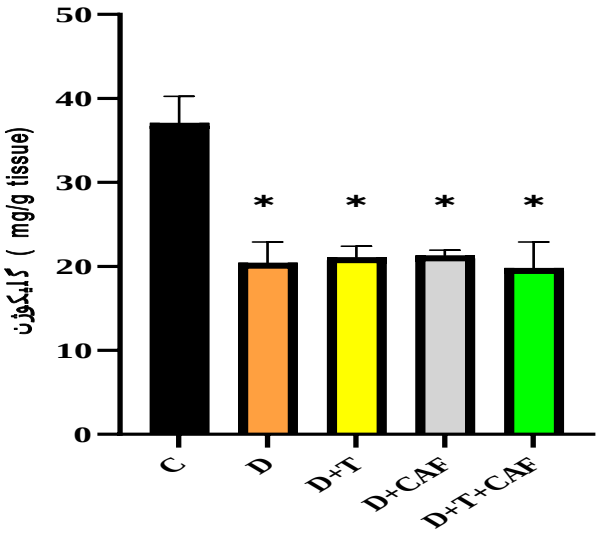
ابتدا توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون شاپیرو-ویلک مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به تأئید توزیع طبیعی داده‌ها به منظور بررسی اثر متغیر مستقل بر متغیرهای وابسته از آزمون‌های t مستقل, تحلیل واریانس دو راهه و مجذور اتا استفاده شد. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٤ در سطح معنی‌داری $p<0.05$ انجام شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که القای دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی باعث کاهش معنی‌دار ٥٥ درصدی گلیکوژن کبدی (P<٠/٠٠١) و نیز کاهش معنی‌دار ٤٦ درصدی (P<٠/٠٠١) میزان بیان mRNA GYS2 شد (نمودار ١).

همچنین براساس نتایج حاصل, مصرف مکمل کافئین بتنهایی موجب افزایش معنی‌دار GYS2 در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی شد (P<٠/٠٠١) هم چنین تمرین تناوبی شدید نیز بتنهایی تأثیر معنی‌داری بر این شاخص داشت (P=٠/٠٢٤) در این خصوص اثر تعاملی بین تمرین تناوبی با شدت بالا و مصرف مکمل کافئین بر GYS2 موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی وجود نداشت (P=٠/٠٩٨). مصرف مکمل کافئین با اندازه اثر ٤٤ درصدی بیشترین تأثیر را بر GYS2 داشت (جدول ٣).

در رابطه با گلیکوژن کبدی, نتایج مطالعه‌ی حاضر حاکی از آن بود که نه تمرین تناوبی با شدت بالا بتنهایی (P=٠/٥٢٩) و نه مصرف مکمل کافئین بتنهایی(P=٠/٧٦١) هیچ کدام موجب افزایش معنی‌دار گلیکوژن کبدی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی نشدند. هم چنین هیچ اثر تعاملی یا تقابلی معنی‌داری بین تمرین تناوبی با شدت بالا و مصرف مکمل کافئین بر گلیکوژن کبدی وجود نداشت (P=٠/١٢)(جدول ٣).

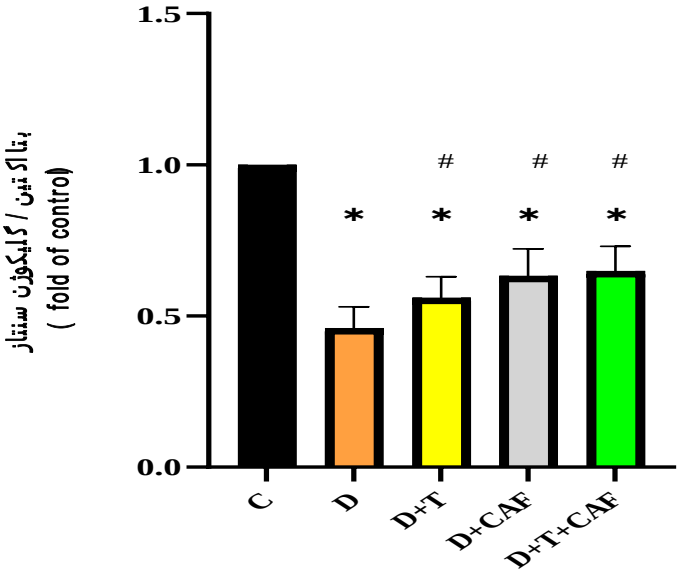
جدول ٣. تحلیل واریانس دوراهه شاخص‌های مورد مطالعه در گروه‌های تحقیق

variable		P Value	Eta squared
GYS2	Training	0.024	0.14
	Caffeine	0.001	0.44
	Training× Caffeine	0.098	0.074
Glycogen	Training	0.529	0.011
	Caffeine	0.761	0.003
	Training× Caffeine	0.12	0.066



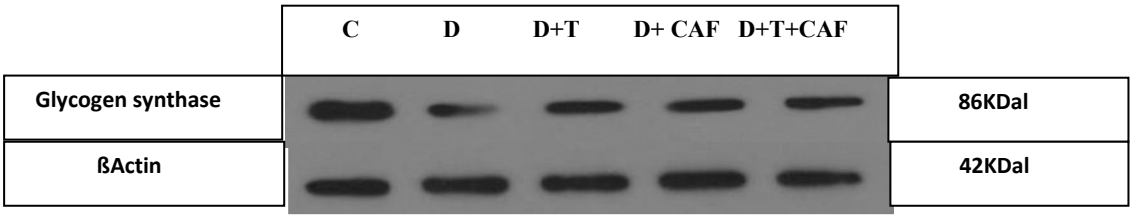
نمودار ۱. میزان گلیکوژن کبدی در بین گروه های تحقیق

علامت * بیانگرتفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم(**C**) است.



نمودار ۱. میزان بیان گلیکوژن سنتاز در بین گروه های تحقیق

علامت * بیانگرتفاوت معنی دار با گروه کنترل سالم(**C**) است. علامت # بیانگرتفاوت معنی دار با گروه کنترل دیابتی(**D**) است.



شکل ۱. باند وسترن بلات **Glycogen synthase** و **ßActin** در بافت کبدی

بحث

در این مطالعه تأثیر هشت هفته تمرینات HIIT و مصرف مکمل کافئین بر میزان گلیکوژن و بیان GYS کبدی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی شد. افزایش معنی‌داری در بیان GYS2 در گروه‌های D+T),(D+CAF و (D+T+CAF) در مقایسه با گروه موشهای دیابتی مشاهده شد اما تغییر معنی‌داری در سطح گلیکوژن کبدی در هیچ یک از گروه‌ها دیده نشد. مسلماً کبد نقش اساسی در حفظ هموستاز گلوکز خون در شرایط فیزیولوژیکی کاملاً متغیر دارد, در دیابت نوع ۲ افزایش قند خون تا حدی ناشی از تولید بیش از حد گلوکز از کبد می باشد (۲۳). همچنین بیماری دیابت با نقص در ترشح و عملکرد انسولین همراه است (۲٤). ژن GYS2 مسئولیت رمزگذاری GYS کبدی را به عهده دارد و انسولین باعث فعال سازی GYS و افزایش سنتز گلیکوژن کبدی و بهبود تحمل گلوکز می شود (۲۵). محرک‌های فیزیولوژیکی چون انسولین, ورزش و غلظت گلوکز بر فعالیت GYS تأثیرگذارند, تمرین ورزشی سرعت سنتز گلیکوژن را در افراد مقاوم به انسولین بهبود می‌بخشد و ورزش حاد باعث تحریک فوری GYS و سنتز گلیکوژن در افراد سالم و مقاوم به انسولین می‌شود (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر مشاهده گردید تمرین HIIT منجر به افزایش بیان GYS می شود که می توان دلیل این امر را مرتبط با تأثیر ورزش در کاهش مقاومت به انسولین در بیمارن دیابتی دانست (۲٦). علاوه بر این اشاره شده که ورزش با بالابردن سطح بیلی روبین پلاسما باعث افزایش بیان ژن GYS2 و تقویت عملکرد کبد در ذخیره سازی گلیکوژن می گردد (۲۷), همچنین لاکتات یکی از عوامل افزایش یافته پس از ورزش شدید می باشد و بیان گردیده است لاکتات می تواند منجر به افزایش GLUT4 و GYS2 در کبد گردد (۲۸).

در مطالعه‌ای همسو با پژوهش حاضر, مشاهده شد ۳۰ دقیقه ورزش با شدت ۷۰ درصد VO2max بعد از تزریق انسولین در افراد مبتلا به دیابت نوع دو و افراد غیر دیابتی مقاوم به انسولین, فعالیت GYS را در هر دو گروه به یک اندازه افزایش داد, همراه شدن ورزش با انسولین در افراد غیر دیابتی فعالیت GYS را افزایش داد و در افراد دیابتی باعث افزایش برداشت گلوکز خون در مقایسه با انسولین به تنهایی شد و مشخص شد که افزایش در برداشت گلوکز ناشی از ورزش به‌طور انتخابی به سمت سنتز گلیکوژن هدایت می‌شود که احتمالاً با افزایش فعالیت GYS همراه است (۲۹). محققان کاهش گلوکز خون و افزایش عملکرد انسولین را پس از فعالیت بدنی مرتبط با افزایش فعالیت آنزیم های GYS و هگزوکیناز دانسته اند (۳۰). همچنین در برخی مطالعات بر روی موش‌ها, افزایش حساسیت به انسولین در جذب گلوکز پس از ورزش به افزایش انتقال GLUT4 نسبت داده می‌شود. با این‌حال, افزایش فعالیت GYS احتمالاً ازنظر اکسیداسیون گلوکز برای القای سنتز گلیکوژن حائز اهمیت است. ورزش می‌تواند با تنظیم GLUT4 مشابه با مکانیزم انسولین فعالیت GYS را به‌طور مستقل از سیگنالینگ انسولین تعدیل کند و این اثر در افراد مقاوم به انسولین نیز حفظ می‌شود (۳۱). در حمایت از این نظر در مطالعه ای در این زمینه محققین دریافتند که تمرینات کاهش‌دهنده گلیکوژن منجر به تولید مقدار زیادی GYS به طور مشابه در هر دو گروه مقاوم به انسولین و کنترل در اولین ساعت ریکاوری می‌شود با این که این مرحله ریکاوری اولیه به عنوان مرحله مستقل از انسولین تعریف شده است ولی در مرحله بعدی که ریکاوری وابسته به انسولین می باشد نیز میزان GYS بین ۱ تا ۵ ساعت پس از ورزش به‌طور قابل توجهی در افراد مقاوم به انسولین پایین بود (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۳ گروه (۲ گروه افراد باتحمل نرمال گلوکز (چاق و لاغر) و گروه افراد چاق مبتلابه دیابت نوع دو), مشاهده شد که فعالیت GYS بعد از ورزش تا ۲ برابر افزایش داشت و این اثر تا ۳/۵ ساعت بعد از تمرین ادامه داشت که همچنین باعث کاهش ۵۰ تا ۷۰ درصدی در دفسفوریلاسیون GYS شد که این کاهش فسفوریلاسیون تا ۳/۵ ساعت بعد ورزش ادامه داشت (۳۳). بررسی روی افراد مبتلا به دیابت نوع دو و افراد غیر دیابتی مقاوم به انسولین در طی ۸ هفته تمرین محققین نتیجه گرفتند که ورزش حساسیت به انسولین را در افراد با و بدون دیابت نوع ۲ بهبود می‌بخشد و باعث افزایش بیان GLUT4 و فعالیت GYS می شود (۳٤). مطالعات فوق که هم راستا با پژوهش حاضر هستند به افزایش فعالیت GYS پس از ورزش اشاره

شده است و به طور کلی می توان گفت ورزش باعث افزایش فعالیت GYS در افراد مقاوم به انسولین و نرمال می‌شود و تأثیر آن بعد از ورزش هم باقی می‌ماند (۳۳). در تأیید تأثیر شدت تمرین باید اذعان داشت که در مطالعه مروری پس از مقایسه تأثیر تمرینات با شدت کم یا متوسط با تمرینات HIIT بر متغیر های مرتبط با سلامتی از جمله گلوکز ناشتا در افراد مبتلا به دیابت نوع دو, بهبود معنی داری در اثر تمرینات HIIT نسبت به تمرینات با شدت کم یا متوسط و یا عدم تفاوتی بین این دو نوع تمرین ذکر شده است (۳۵). در تایید آن در مطالعه ای دیگر هم به کارایی بیشتر تمرینات HIIT نسبت به تمرینات با شدت متوسط بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو اشاره شه است (۳٦). در مطالعه ای ناهمسو پس از بررسی موشهای بزرگ آزمایشگاهی با یک برنامه دویدن تردمیل در سه بار کاری مختلف تأثیر قابل توجهی بر افزایش GYS, فسفوریلاز و محتوای گلیکوژن در کبد مشاهده نشد (۳۷), البته در این مطالعه تأثیر ورزش بر سطح گلیکوژن کبد با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. در مطالعه ای دیگر نیز در افرادی که تمرینات استقامتی انجام می‌دهند, افزایشی در سطح گلیکوژن کبد پایه مشاهده نشد (۳۸). در مطالعه‌ای ناهمسو ۸ هفته تمرینات مقاومتی HIIT منجر به ذخیره بیشتر گلوکز توسط کبد گردید که شیوه‌ی تمرین با پروتکل تمرینی تحقیق حاضر متفاوت می‌باشد (۳۹).

در مورد تأثیر کافئین بر بیماران دیابتی, به نقش کافئین به عنوان یک آنتی اکسیدان, ضد التهاب, ضد میکروب و ضد دیابت اشاره شده که می تواند با افزایش حساسیت به انسولین, غلظت گلوکز خون موش مدل دیابتی نوع ۲ را کاهش دهد (٤۰). در رابطه با تأثیر کافئین بر ریکاوری گلیکوژن عضله نشان داده شده است که مصرف کافئین باعث افزایش سطح گلوکز, فسفوریلاسیون پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کلمودولین, میزان بازسازی سنتز گلیکوژن, افزایش آدنوزین مونوفسفات پروتئین کیناز و فسفوریلاسیون استیل کوآ کربوکسیلاز و انتقال گلوکز و تجمع گلیکوژن بعد از ورزش می شود و در نهایت به تأثیر مثبت مصرف کافئین اشاره شده است (٤۱) و به تأثیر وابسته به دوز کافئین در تحریک گلیکوژن سنتاز کبد اشاره شده است (٤۲) در مطالعه‌ای همسو با پژوهش حاضر گزارش کردند که کافئین (در کل ٦ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) تجویز شده قبل و در حین ورزش تخلیه گلیکوژن باعث افزایش ذخیره گلیکوژن بیش از ۵ ساعت بهبودی در هنگام مصرف کربوهیدرات (کل ۳۷۵ گرم) نشده است (٤۳) و در مطالعه‌ای ناهمسو, تأثیر مصرف کربوهیدرات تنها و کربوهیدرات همراه با کافئین را بر ۷ دوچرخه‌سوار در طی دو آزمایش بررسی کردند و مشخص شد که میزان گلیکوژن عضله آن‌ها در زمان خستگی و یک ساعت بعد از فعالیت به یک اندازه است, اما بعد از چهار ساعت استراحت غیرفعال میزان گلیکوژن ٦٦ درصد در زمان مصرف کربوهیدرات همراه با کافئین بیشتر بود. این اختلاف می‌تواند به علت تفاوت در نوع آزمودنی‌ها و پروتکل تمرین باشد (٤٤) اگر چه در مواردی نیز به اثرات منفی کافئین در بیماران دیابتی نوع ۲ اشاره شده است که نیاز به بررسی‌هایی در مقیاس‌های بزرگ‌تر, مدت زمان مصرف بیشتر و دوزهای متفاوت است (١٤).

در مورد تأثیر هم زمان برنامه تمرینی HIIT و کافئین در دو مطالعه که تأثیر برنامه تمرینی HIIT و کافئین را بررسی کردند به تأثیر مثبت هم زمانی این دو متغیر اشاره شده است. اما در هیچ مطالعه ای تأثیر این دو متغیر بر میزان گلیکوژن و بیان GYS کبدی در بیماری دیابت بررسی نشده است که بتوان نتایج تحقیق صورت گرفته را با آن مقایسه کرد. Alkhatib و همکاران در مطالعه ای برای بررسی تأثیر هم زمان تمرین HIIT و مصرف مکمل کافئین روی ٢٤ زن چاق در طول ۸ هفته برنامه تمرینی نتیجه گرفتند که تمرین HIIT باعث کاهش میزان چربی در زنان چاق می شود و عوارض جانبی چاقی مانند اندوتوکسمی و هیپرانسولینمی نیز با مصرف مکمل کافئین بهبود می یابد (٤۵). Taylor و همکاران در مطالعه ای بر روی ٦ مرد که برنامه ورزشی دوی اینتروال با شدت بالا تا زمان تخلیه گلیکوژن و خستگی ارادی در صبح انجام می دادند, مشاهده کردند که مصرف همزمان کافئین با CHO در مقایسه با مصرف CHO به تنهایی پس از ورزش, باعث افزایش ظرفیت دویدن با شدت زیاد متعاقب آن می شود و دلیل آن را بالا بودن میزان سنتز مجدد گلیکوژن در عضلات بعد از ورزش دانستند (٤٦). متأسفانه تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد تأثیر مستقیم کافئین بر میزان بیان GYS

و محتوای گلیکوژن کبد صورت نگرفته است. با توجه به نتایج ضد و نقیض در مطالعات به نظر می‌رسد که نیاز به بررسی بیشتری در این زمینه برای اظهارنظر صحیح هست. طبق بررسی‌های ما, این اولین مطالعه‌ای است که تا کنون در مورد اثر تمرینات تناوبی شدید همراه با مکمل‌سازی کافئین بر بیان گلیکوژن سنتاز و میزان گلیکوژن کبدی موش های بزرگ آزمایشگاهی مدل دیابتی در حیوانات مدل دیابتی انجام شده است و تأئید یا رد کامل نتایج این تحقیق نیازمند انجام مطالعات بیشتر در این زمینه است. از طرفی, این مطالعه محدودیت هایی نیز داشته است, از جمله این که امکان بررسی موضوع و تکرار مطالعه در مدل های تجربی دیگری از دیابت امکان پذیر نشد. محدودیت دیگر عدم استفاده از دوزهای مختلف مکمل کافئین و عدم اندازه‌گیری شاخص‌های دیگر چون گلیکوژن سنتاز و میزان گلیکوژن عضلانی بود. مطالعه‌ی حاضر به علت محدودیت‌های مالی تنها گلیکوژن سنتاز و میزان گلیکوژن کبدی را مورد ارزیابی قرار داده است و مسلماً سنجش شاخص‌های دیگر در این زمینه در ارزیابی دقیق‌تر مؤثرتر است.

نتیجه گیری

در مجموع, در این تحقیق, مداخله تمرینات HIIT و مکمل کافئین هر دو به افزایش معنی‌داری در بیان GYS2 در آزمودنی‌های دیابتی منجر شد که در بیماری دیابت که با کاهش شدید GYS2 همراه است از اهمیت بسزایی برخوردار است؛ بنابراین با توجه به ویژگی خاص کوتاه بودن زمان اجرای این نوع تمرینات در مقایسه با پروتکل‌های تمرینی تداومی و سازوکار متفاوت این تمرینات بر بهبود و تنظیم GYS2 و از سوی دیگر نظر به تأثیر مثبت مصرف کافئین در بهبود این شاخص, شاید بتوان اجرای این نوع تمرینات و مصرف کافئین را به عنوان یک مداخله‌ی مؤثر در این زمینه در افراد دیابتی پیشنهاد داد. اگر چه اظهار نظر قطعی در این زمینه مستلزم بررسی‌های بیشتری است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد مصوب مؤسسه آموزش عالی علامه قزوینی و دارای کد اخلاق TBZMED.VCR.REC.1397.389 است. در این مطالعه اصول و کدهای اخلاق در پژوهش و مفاد بیانیه هلسینکی و کلیه‌ی موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های پزشکی رعایت شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب سال ۱۳۹۷ مؤسسه‌ی آموزش عالی علامه قزوینی و دفاع شده در شهریور ۱۳۹۹ است. بدین‌وسیله از مساعدت و همکاری صمیمانه مسؤولین مؤسسه‌ی آموزش عالی علامه قزوینی و کلیه‌ی عزیزانی که در انجام این پژوهش نویسندگان را یاری نموده‌اندخصوصا آقای دکتر ضرغامی, و هم چنین خانم دکتر کریمی مدیریت کلینیک یاخته پژوهان سارای برای آنالیز نمونه‌ها قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تضاد منافعی را گزارش نکرده‌اند.

منابع

1. Association AD. Prevention or delay of type 2 diabetes: standards of medical care in diabetes—2019. Diabetes Care 2019;42(Supplement 1):S29-S33.
2. Wang L, Liu Q, Wang M, Du Y, Tan X, Xu B, et al. Effects of fasting on liver glycogen structure in rats with type 2 diabetes. Carbohydrate Polymers 2020;237:116144.
3. Fan X, Tao J, Zhou Y, Hou Y, Wang Y, et al. Investigations on the effects of ginsenoside-Rg1 on glucose uptake and metabolism in insulin resistant HepG2 cells. European Journal of Pharmacology 2019; 843:277-84.
4. Irimia JM, Meyer CM, Peper CL, Zhai L, Bock CB, Previs SF, et al. Impaired glucose tolerance and predisposition to the fasted state in liver glycogen synthase knock-out mice. Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(17):12851-61.
5. Kollberg G, Tulinius M, Gilljam T, Östman-Smith I, Forsander G, Jotorp P, et al. Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease 0. New England Journal of Medicine 2007; 357(15):1507-14.
6. Chown EE, Wang P, Zhao X, Crowder JJ, Strober JW, Sullivan MA, et al. GYS1 or PPP1R3C deficiency rescues murine adult polyglucosan body disease. Annals of Clinical and Translational Neurology 2020; 7(11):2186-98.
7. Arko JJ, Debeljak M, Tansek MZ, Battelino T, Groselj U. A patient with glycogen storage disease type 0 and a novel sequence variant in GYS2: a case report and literature review. Journal of International Medical Research 2020; 48(8):0300060520936857.
8. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Biochemical Journal 2012; 441(3):763-87.
9. Huang X, Vaag A, Hansson M, Weng J, Laurila ES, Groop L. Impaired insulin-stimulated expression of the glycogen synthase gene in skeletal muscle of type 2 diabetic patients is acquired rather than inherited. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2000; 85(4):1584-90.
10. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. Diabetes 2014 ;63(9):2962-76.
11. Orho M, Bosshard NU, Buist NR, Gitzelmann R, Aynsley-Green A, Blümel P, et al. Mutations in the liver glycogen synthase gene in children with hypoglycemia due to glycogen storage disease type 0. The Journal of Clinical Investigation 1998;102(3):507-15.
12. Doi R, Oishi K, Ishida N. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. Journal of Biological Chemistry 2010; 285(29):22114-21.
13. Kleinert M, Sylow L, Richter EA. Regulation of glycogen synthase in muscle and its role in Type 2 diabetes. Diabetes Management 2013; 3(1):81.
14. 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;8(11):e80248.

15. Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, Collier G, Hargreaves M. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology 2000;88(2):794-6.

16. Wedick NM, Brennan AM, Sun Q, Hu FB, Mantzoros CS, van Dam RM. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. Nutrition Journal 2011;10(1):1-9.

17. Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2005;45(7-8):535-62.

18. Akash MS, Rehman K, Chen S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. Nutrition 2014;30(7-8):755-63.

19. MacKenzie T, Comi R, Sluss P, Keisari R, Manwar S, Kim J, et al. Metabolic and hormonal effects of caffeine: randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. Metabolism 2007;56(12):1694-8.

20. Gilboe DP, Nuttall FQ. The synergistic action of caffeine or adenosine on glucose stimulation of liver glycogen synthase phosphatase activity. FEBS letters 1984;170(2):365-9.

21. 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.

22. Francis SH, Sekhar KR, Ke H, Corbin JD. Inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases by methylxanthines and related compounds. Methylxanthines 2011:93-133.

23. Wahren J, Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. Annual Review of Nutrition 2007; 27:329-45.

24. Akash MS, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Journal of Cellular Biochemistry 2018;119(1):105-10.

25. Jensen J, Lai YC. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. Archives of Physiology and Biochemistry 2009;115(1):13-21.

26. Dela F, Ingersen A, Andersen NB, Nielsen MB, Petersen HH, Hansen CN, Larsen S, et al. Effects of one-legged high-intensity interval training on insulin-mediated skeletal muscle glucose homeostasis in patients with type 2 diabetes. Acta Physiologica 2019;226(2):e13245.

27. Hinds TD, Creeden JF, Gordon DM, Spegele AC, Britton SL, Koch LG, et al. Rats genetically selected for high aerobic exercise capacity have elevated plasma bilirubin by upregulation of hepatic biliverdin reductase-A (BVRA) and suppression of UGT1A1. Antioxidants 2020;9(9):889.

28. Kyun S, Yoo C, Hashimoto T, Tomi H, Teramoto N, Kim J, et al. Effects of exogenous lactate administration on fat metabolism and glycogen synthesis factors in rats. Physical Activity and Nutrition 2020;24(2):1.

29. Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Mandarino LJ. Increased insulin

receptor signaling and glycogen synthase activity contribute to the synergistic effect of exercise on insulin action. Journal of Applied Physiology 2003;95(6):2519-29.

30. Khosravi M, Tayebi SM, Safari H. Single and concurrent effects of endurance and resistance training on pulmonary function. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2013;16(4):628.

31. Wang Y, Wen L, Zhou S, Zhang Y, Wang XH, He YY, et al. Effects of four weeks intermittent hypoxia intervention on glucose homeostasis, insulin sensitivity, GLUT4 translocation, insulin receptor phosphorylation, and Akt activity in skeletal muscle of obese mice with type 2 diabetes. PLoS One 2018;13(9):e0203551.

32. Hingst JR, Bruhn L, Hansen MB, Rosschou MF, Birk JB, Fentz J, et al. Exercise-induced molecular mechanisms promoting glycogen supercompensation in human skeletal muscle. Molecular Metabolism 2018;16:24-34.

33. Jensen J, Tantiwong P, Stuenæs JT, Molina-Carrion M, DeFronzo RA, Sakamoto K, et al. Effect of acute exercise on glycogen synthase in muscle from obese and diabetic subjects. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2012;303(1):E82-9.

34. Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Metabolism 2004;53(9):1233-42.

35. da Silva DE, Grande AJ, Roever L, Tse G, Liu T, Biondi-Zoccai G, et al. High-intensity interval training in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. Current Atherosclerosis Reports 2019;21(2):8.

36. Wormgoor SG, Dalleck LC, Zinn C, Harris NK. Effects of high-intensity interval training on people living with type 2 diabetes: a narrative review. Canadian Journal of Diabetes 2017;41(5):536-47.

37. James DE, Kraegen EW. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology 1984;52(3):276-81.

38. Fuchs CJ, Gonzalez JT, Beelen M, Cermak NM, Smith FE, Thelwall PE, et al. Sucrose ingestion after exhaustive exercise accelerates liver, but not muscle glycogen repletion compared with glucose ingestion in trained athletes. Journal of Applied Physiology 2016; 120(11):1328-34.

39. Muller GY, de Amo AH, Vedovelli KS, Mariano IR, Bueno GC, Furlan JP, et al. Resistance High-Intensity Interval Training (HIIT) Improves Acute Gluconeogenesis from Lactate in Mice. American Journal of Sports Science 2019;7(2):53-9.

40. Tarigan EB, Herawati D, Giriwono PE. Komponen bioaktif kopi berpotensi sebagai antidiabetes/the potency of bioactive compounds of coffee as antidiabetis. Perspektif 2020;19(1):41-52.

41. Loureiro LM, Reis CE, da Costa TH. Effects of coffee components on muscle glycogen recovery: a systematic review. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism 2018;28(3):284-93.

42. Gilboe DP, Nuttall FQ. Stimulation of liver glycogen particle synthase D

phosphatase activity by caffeine, AMP, and glucose 6-phosphate. Archives of Biochemistry and Biophysics 1982;219(1):179-85.

43. Battram DS, Shearer J, Robinson D, Graham TE. Caffeine ingestion does not impede the resynthesis of proglycogen and macroglycogen after prolonged exercise and carbohydrate supplementation in humans. Journal of Applied Physiology 2004;96(3):943-50.

44. Pedersen DJ, Lessard SJ, Coffey VG, Churchley EG, Wootton AM, Ng T, et al. High rates of muscle glycogen resynthesis after exhaustive exercise when carbohydrate is coingested with caffeine. Journal of Applied Physiology. 2008 ;105(1):7-13.

45. Alkhatib A, Hsieh MJ, Kuo CH, Hou CW. Caffeine optimizes hiit benefits on obesity-associated metabolic adversity in women. Medicine and Science in Sports and Exercise 2020 ;52(8):1793-1800.

46. Taylor C, Higham D, Close GL, Morton JP. The effect of adding caffeine to postexercise carbohydrate feeding on subsequent high-intensity interval-running capacity compared with carbohydrate alone. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism 2011;21(5):410-6.