

The Effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) on Reticulophagy-Related Proteins in the Left Ventricle of the Heart of Rats with Type 2 Diabetes

Fatemeh Solhdoust¹, Hamed Alizadeh Pahlavani^{2*}, Mohammad Sherafati Moghadam³

1. Master's student of sports sciences, Department of Sport Sciences, Apadana Institute of Higher Education, Shiraz, Iran
2. Assistant professor of physical education, Department of Physical Education, Farhangian University, P.O. Box 14665-889, Tehran, Iran
3. Assistant professor of sports sciences, Department of Sport Sciences, Apadana Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

Received: 2024/09/05

Accepted: 2025/01/08

Abstract

Introduction: Cardiovascular diseases in patients with diabetes, particularly through endoplasmic reticulum (ER) stress, are leading causes of mortality worldwide. High-Intensity Interval Training (HIIT) has been proposed as a non-pharmacological intervention to prevent diabetes-induced cardiac apoptosis. This study aims to investigate the effects of HIIT on the expression of ATF6, JNK1, and mTOR proteins in the left ventricle of the hearts of rats with type 2 diabetes.

Materials and Methods: This study was conducted on 12 male Sprague-Dawley rats, aged 2 months, with an average weight of 180 ± 20 grams. Type 2 diabetes was induced through the administration of nicotinamide and streptozotocin. The rats were randomly assigned to either the HIIT group or the diabetic control group. The HIIT program comprised five intervals of 4 minutes at an intensity of 85-95% of maximum speed, interspersed with 3-minute active rest periods at 50-60% of maximum speed. Data was analyzed using independent t-tests in SPSS software version 29, with a significance level of $P \leq 0.05$.

Results: Data analysis revealed that the protein content of ATF6 and JNK1 significantly increased after 8 weeks of HIIT compared to the control group, while mTOR protein levels exhibited a significant decrease.

Conclusion: The HIIT protocol appears beneficial for cardiac health in patients with type 2 diabetes due to its capacity to reduce ER stress.

***Corresponding Author:** Hamed Alizadeh pahlavani

Address: Farhangian University, P.O. Box 14665-889, Tehran, Iran

Tel: _989163712199

E-mail: ha.alizadeh@cfu.ac.ir

Keywords: Activating Transcription Factor 6, c-Jun N-Terminal Kinase 1, High-Intensity Interval Training, Mammalian Target of Rapamycin, Type 2 Diabetes

How to cite this article: Solhdoust.F, Alizadeh Pahlavani.H, Sherafati Moghadam.M. The Effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) on Reticulophagy-Related Proteins in the Left Ventricle of the Heart of Rats with Type 2 Diabetes, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2025; 32(2):207-220, DOI: 10.30468/jsums.2025.7895.3131.

Introduction

Cardiovascular diseases linked to diabetes, particularly through endoplasmic reticulum (ER) stress, are among the leading causes of death globally. The relationship between diabetes and heart health is complex, involving metabolic dysregulation, inflammation, and cellular stress responses. The ER plays an important role in protein synthesis, folding, and post-translational modifications. Under normal physiological conditions, the ER maintains cellular homeostasis through proper protein folding. However, various stressors, including hyperglycemia, hypoxia, starvation, infection, oxidative stress, and inflammation, can disrupt this balance, leading to ER stress and subsequent reticulophagy. Reticulophagy is the process by which components within the ER are sequestered to synthesize proteins for the plasma membrane and extracellular matrix. In type 2 diabetes mellitus (T2DM), chronic hyperglycemia can induce ER stress in cardiac cells, contributing to reticulophagy and cardiac dysfunction. Furthermore, ER stress is implicated in various pathophysiological conditions, including neurodegenerative diseases, tumorigenesis, fatty liver disease, cardiovascular diseases, diabetes, and cellular longevity.

Research indicates that reticulophagy-related proteins such as mTOR, JNK1, and ATF6 play significant roles in the pathogenesis of diabetic heart damage. mTOR, a serine/threonine kinase, regulates cell growth, proliferation, and survival. Under cellular stress conditions, such as diabetes, mTOR activation can lead to apoptosis. Conversely, inhibition of mTOR with pharmacological agents like rapamycin and orthoglibiflozin can prevent diabetes-related cardiac cell death. JNK1, part of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, is activated in response to various stress signals, including ER stress. Increased JNK1 activation in T2DM may contribute to cardiomyocyte apoptosis and further compromise cardiac function. ATF6 is activated in response to the accumulation of misfolded proteins in the ER and serves as a key regulator of the unfolded protein response (UPR). Upon activation, ATF6 translocates to the nucleus to promote the expression of chaperone proteins, enhancing protein folding and degradation of unfolded proteins. Dysregulation of ATF6 activity in T2DM may exacerbate cardiac dysfunction by disrupting the balance between cell survival and death. In contrast, HIIT has been proposed as a non-

pharmacological intervention to prevent diabetes-induced cardiac apoptosis. Therefore, this study aims to investigate the effects of HIIT on the content of ATF6, JNK1, and mTOR proteins in the left ventricle of the heart of rats with type 2 diabetes.

Methodology

This study utilized a sample of 12 male Sprague-Dawley rats, aged 2 months, with an average weight of 180 ± 20 grams. Type 2 diabetes was induced through the administration of nicotinamide and streptozotocin. The rats were randomly divided into an HIIT group and a diabetic control group. The HIIT protocol consisted of five intervals of 4 minutes at an intensity of 85-95% of maximum speed and 3-minute active rest periods with an intensity equal to 50-60% of maximum speed. Two days after the final training session, the rats were anesthetized via intraperitoneal injection of a combination of ketamine (30-50 mg/kg body weight) and xylazine (3-5 mg/kg body weight). Then, the left ventricle tissue was removed, washed in physiological saline, and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissue samples were subsequently stored at -80°C for further analysis. The Western blot method was employed to quantify ATF6, JNK1, and mTOR in the left ventricular tissue. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests in SPSS version 29 and GraphPad Prism version 2.10.3, with a significance level of $P \leq 0.05$.

Results

Data analysis indicated that ATF6 and JNK1 protein content significantly increased after 8 weeks of HIIT compared to the control group, while mTOR protein levels exhibited a significant decrease.

Discussion

The notable increase in ATF6 protein content following 8 weeks of HIIT is particularly significant, as ATF6 plays a crucial role in the ER stress response and regulates the expression of genes involved in protein folding and degradation. Research has demonstrated that ATF6 deficiency can increase reactive oxygen species and necrotic cell death in cardiac myocytes subjected to ischemia and reperfusion, which are mitigated by ATF6 overexpression. ATF6 has also been shown to enhance catalase

promoter activity in cardiac myocytes, thereby reducing ER stress and oxidative stress, and supporting mechanisms that diminish ischemic injury and myocardial reperfusion damage.

Similarly, the significant increase in JNK1 protein content after HIIT emphasizes its role in cardiac adaptation. JNK1, part of the MAPK signaling pathway, is activated in response to various stressors, including inflammation and oxidative stress. The increase in JNK1 following HIIT may reflect a temporary rise in inflammation and oxidative stress due to the lack of adaptation. Although JNKs, as stress-induced kinases, have been linked to cardiometabolic syndrome, increased JNK1 following HIIT may indicate a potential protective role, promoting cell survival and mediating inflammatory responses. Evidence suggests that inflammation involving NF- κ B complexes and the JNK1/c-Jun pathway is reduced following HIIT intervention.

In contrast, the significant decrease in mTOR protein content after 8 weeks of HIIT suggests adaptive mechanisms in response to exercise. mTOR is a central regulator of cell growth and metabolism that is often activated in response to nutrients and growth factors. Its reduction post-HIIT, particularly in diabetic rats, may indicate a shift from growth-promoting signals to a more protective and survival-oriented mode.

Research has shown that excessive mTOR activity in diabetic conditions is associated with adverse cardiac remodeling and dysfunction, while short-term treatment with rapamycin, an mTOR inhibitor, has shown promise in

managing cardiac diseases such as acute myocardial infarction and cardiac hypertrophy in type 2 diabetes. Furthermore, mTOR signaling has been reported to interfere with oxidative stress in the diabetic heart. Therefore, the reduction in mTOR levels observed in this study may represent a compensatory mechanism aimed at preventing the detrimental effects associated with excessive mTOR signaling in diabetes.

Conclusion

The findings indicate that while ATF6 and JNK1 levels increased, suggesting a protective response, mTOR levels decreased, indicating a transition from growth to survival mechanisms. This dichotomy suggests that exercise can reprogram signaling pathways in diabetic hearts, favoring protective mechanisms over growth-promoting pathways. Consequently, the HIIT protocol may be recommended for individuals with type 2 diabetes due to its potential to reduce ER stress.

Acknowledgment

The results reported are derived from the Master's Thesis, conducted at the Apadana Institute of Higher Education, Shiraz. We extend our gratitude to all individuals who contributed to the execution and collection of this research.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest related to this study.

تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) بر پروتئین‌های مرتبط با رتیکولوفازی در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲

فاطمه صلح‌دوست^۱، حامد علیزاده پهلوانی^۲، محمد شرافتی مقدم^۳

۱. دانشجوی ارشد علوم ورزشی، گروه علوم ورزشی، مؤسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، ایران

۲. استادیار گروه آموزش تربیت‌بدنی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

۳. استادیار گروه علوم ورزشی، مؤسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۵

چکیده

* نویسنده مسئول: حامد

علیزاده پهلوانی

نشانی: استادیار گروه آموزش

تربیت‌بدنی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق

پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵ تهران، ایران

تلفن: ۹۸۹۱۶۳۷۱۲۱۹۹+

رایانامه:

ha.alizadeh@cfu.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-

0000-0002-2313-9684

شناسه ORCID نویسنده اول:

0009-0003-6907-2803

DOI: 10.30468/jsums.2025.7895.

3131

کلیدواژه‌ها:

تمرین تناوبی با شدت بالا

(HIIT)، دیابت نوع ۲،

فعال‌کننده فاکتور رونویسی ۶،

کیناز-۱ c-Jun-ترمینال-N،

هدف رایپاماسین در پستانداران

زمینه و هدف: بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران مبتلا به دیابت یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند. در مقابل، پیشگیری از رتیکولوفازی قلبی ناشی از دیابت توسط تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) به‌عنوان مداخله غیر دارویی پیشنهاد شده است. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر HIIT بر محتوای پروتئین‌های mTOR، JNK1 و ATF6 در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر ۱۲ موش صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزن 180 ± 20 گرم انتخاب شدند. دیابت نوع ۲ از طریق تزریق محلول‌های نیکوتین‌آمید و استرپتوزوتوسین القاء شد. موش‌های صحرایی به روش تصادفی به گروه HIIT و کنترل دیابتی تقسیم شدند. برنامه HIIT شامل ۵ نوبت ۴ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵-۹۵ درصد حداکثر سرعت و دوره‌های استراحت فعال ۳ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰-۶۰ درصد حداکثر سرعت بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری t-مستقل در نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۹ استفاده شد. سطح معناداری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که محتوای پروتئین ATF6 و JNK1 پس از ۸ هفته HIIT افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان داد. در حالی که محتوای پروتئین mTOR کاهش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پروتکل HIIT به دلیل توانایی کاهش استرس شبکه آندوپلاسمی (ER) می‌تواند برای آزمودنی‌های قلبی مبتلا به دیابت نوع ۲ توصیه شود.

مقدمه

زیستی فعال و برگشت‌پذیر سلولی است که در تنظیم تعادل بین رشد و مرگ سلولی در قلب نقش دارد [۲-۵]. شبکه آندوپلاسمی (ER) یک اندامک مهم سلولی است که در سنتز پروتئین و تغییرات پس از ترجمه سلولی نقش دارد. تحت شرایط فیزیولوژیکی، ER هموستاز سلولی را از طریق تاخوردگی مناسب پروتئین‌ها حفظ می‌کند. باین‌حال، عوامل

بیماری‌های قلبی عروقی یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند [۱]. تأثیر متقابل بین دیابت و سلامت قلب چندوجهی است که شامل التهاب و استرس سلولی است. آپوپتوز یک فرایند

1. Endoplasmic Reticulum

Copyright © 2025 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۳۵، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۴، ص ۲۲۰-۲۰۷

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۱۳۷۵-۲۸۲۱

بالقوه برای کاهش آپوپتوز ناشی از دیابت در قلب باشد. از طرفی، فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان یک راهکار درمانی غیر دارویی برای کنترل عوارض قلبی ناشی از دیابت مطرح است. به‌عنوان مثال، تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)^۴ با افزایش ظرفیت هوازی و بهبود عملکرد قلبی عروقی همراه است [۱۵، ۱۶] و می‌تواند بر محتوای پروتئین‌های مرتبط با رتی‌کولوفازی در بافت قلب تأثیر بگذارد [۱۷، ۱۸]. مطالعه‌ای نشان داد ۸ هفته HIIT می‌تواند بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوتیک BAX و کاسپاز ۳ و ۹ را در بافت قلب دیابتی کاهش دهد [۱۸]. مطالعه دیگر نشان داد HIIT با کاهش پروتئین mTOR و افزایش بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتزی مانند BCL-2 می‌تواند از آپوپتوز قلبی ناشی از دیابت جلوگیری کند [۱۹، ۲۰]؛ بنابراین به نظر می‌رسد HIIT با تعدیل فعالیت پروتئین‌های مرتبط با ER می‌تواند در کاهش مرگ سلول قلبی ناشی از دیابت مؤثر باشد؛ اما نیاز به مطالعات بیشتری وجود دارد. از این‌رو هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر HIIT بر محتوای پروتئین‌های JNK1، ATF6 و mTOR در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ است.

۲. مواد و روش

تحقیق حاضر از نوع تجربی-بنیادی بود که تعداد ۱۲ سر موش صحرایی ۲ ماهه نر از نژاد اسپراگ‌داولی با وزن متوسط 180 ± 20 گرم به‌صورت تصادفی خریداری گردیدند. سپس موش‌ها در اتاقی مخصوص با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای موش‌ها به‌صورت آزاد و استاندارد برای حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب موردنیاز موش‌ها به‌صورت آزاد در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آن‌ها بود. این مطالعه دارای کد اخلاق IR.US.PSYEDU.REC.1403.042 است.

۲.۱. به وزن رساندن موش‌های صحرایی

موش‌های صحرایی به مدت ۴ هفته تحت غذای کنترل‌شده پرچرب در قالب پلت، ترکیبی از پودر غذای استاندارد موش صحرایی (۳۶۵ گرم/کیلوگرم)، چربی گوسفندی (۳۱۰ گرم/کیلوگرم)، مخلوط ویتامین‌ها و مواد معدنی (۶۰

استرس‌زای مختلف مانند هایپرگلیسمی، استرس اکسیداتیو و التهاب می‌توانند این تعادل را مختل کنند و منجر به استرس ER شوند که متعاقباً می‌تواند باعث رتی‌کولوفازی^۱ شود. رتی‌کولوفازی فرآیندی است که مسئول جداسازی اجزای داخل ER برای سنتز پروتئین‌های موجود در غشای پلازما و پروتئین‌های موجود در ماتریس خارج سلولی است. در شرایط T2DM، هایپرگلیسمی مزمن می‌تواند استرس ER را در سلول‌های قلبی القاء نماید و به رتی‌کولوفازی و اختلال عملکرد قلب کمک کند [۶]. علاوه بر این، پروتئین‌های مرتبط با رتی‌کولوفازی مانند هدف راپامایسین در پستانداران (mTOR)^۲، کیناز-۱-c-Jun N-ترمینال (JNK1)^۳ و فعال‌کننده فاکتور رونویسی ۶ (ATF6)^۴ در آسیب قلبی ناشی از دیابت نقش دارند [۵].

mTOR یک سرین/ترئونین کیناز است که در تنظیم رشد، تکثیر و بقای سلولی نقش دارد. مطالعات ارتباطی را بین تجمع گلوکز ۶ فسفات، فعال‌سازی mTOR، استرس ER و اختلال عملکرد انقباضی قلب نشان داده‌اند که همگی از طریق راپامایسین (مهارکننده mTOR) یا متفورمین (فعال‌سازی AMPK) تعدیل می‌شود [۷]. از این‌رو، به نظر می‌رسد تحت شرایط دیابت، فعال‌سازی بیش‌ازحد mTOR می‌تواند منجر به آپوپتوز شود؛ درحالی‌که مهار mTOR با داروهایی مانند راپامایسین و ارتوگلیفلوزین می‌تواند از مرگ سلولی قلب ناشی از دیابت جلوگیری کند [۸، ۹]. علاوه بر این، JNK1 بخشی از مسیر پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن (MAPK)^۵ است که در پاسخ به سیگنال‌های استرس مختلف از جمله استرس ER فعال می‌شود. تحت شرایط T2DM، افزایش فعال‌سازی JNK1 ممکن است به افزایش آپوپتوز کاردیومیوسیت کمک کند و عملکرد قلب را بیشتر به خطر بیندازد [۱۰]. درعین‌حال، ATF6 در پاسخ به انباشت پروتئین‌های معیوب در شبکه آندوپلاسمیک فعال می‌گردد. پس از فعال‌سازی، ATF6 به هسته منتقل می‌شود، جایی که بیان پروتئین‌های چارپون را تقویت می‌کند و به چین‌خوردگی پروتئین و تخریب پروتئین‌های تا نشده کمک می‌نماید [۱۱-۱۳]. در شرایط T2DM، اختلال در تنظیم فعالیت ATF6 ممکن است با ایجاد تعادل بین بقای سلولی و مرگ، اختلال عملکرد قلبی را تشدید کند [۱۴]؛ بنابراین، تعدیل فعالیت این پروتئین‌ها می‌تواند یک راهکار درمانی

4. Activating transcription factor 6
5. mitogen-activated protein kinases
6. high-intensity interval training

1. reticulophagy
2. Mammalian target of rapamycin
3. c-Jun N-terminal kinase 1

در پایان هر جلسه نیز موش‌های صحرایی با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه (معادل ۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت) سرد کردند [۲۵] (شکل ۱).

۲.۴. روش بافت‌برداری

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس موش‌های صحرایی در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. سپس بافت بطن چپ قلب بدن موش‌های صحرایی برداشته و بعد از شستشو در سرم فیزیولوژیک، بلافاصله در تانک ازت منجمد شد. سپس نمونه‌های بافتی برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- در فریزر گذاشته شد.

۲.۵. روش آزمایشگاهی وسترن بلات

از روش وسترن بلات برای سنجش میزان JNK1 و ATF6 و MTOR در بافت بطن چپ قلب استفاده شد که شامل مراحل زیر بود:

۱. لیز کردن بافت: برای لیز کردن بافت‌ها از Lysis buffer با ترکیب زیر استفاده شد و سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ مدل Eppendorph 5415 R در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع شفاف (Supernatant) حاوی پروتئین استخراج و در فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد.

۲. تعیین غلظت پروتئین به‌وسیله بردفورد: برای ساخت محلول بردفورد کوماسی بلو کاملاً در الکل به مدت ۲۰ دقیقه حل گردید، سپس اسیدفسفوریک قطره‌قطره به آن اضافه شد. سپس آب را قطره‌قطره اضافه کرده تا محلول حاصل به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. محلول تهیه‌شده با کاغذ صافی دو بار صاف‌شده و در بطری تیره داخل یخچال نگهداری شد.

۳. تهیه غلظت‌های مختلف BSA برای کشیدن منحنی استاندارد: از BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه‌گیری میزان پروتئین استفاده می‌شود. غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۱۲۵ از پروتئین استاندارد با افزودن نصف حجم آب به غلظت قبلی ساخته شد.

گرم/کیلوگرم)، DL میتونین (سه گرم/کیلوگرم)، پودر مخمر (۱ گرم/کیلوگرم) و کلریدسدیم (یک گرم/کیلوگرم) قرار گرفتند تا به میانگین وزن 280 ± 20 گرم رسیدند [۲۱].

۲.۲. روش القای دیابت نوع ۲

برای القای دیابت نوع ۲، دو مرحله تزریق به موش‌های صحرایی انجام شد. مرحله اول، محلولی از نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن را به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. مرحله دوم، ۱۵ دقیقه بعد از تزریق نیکوتین‌آمید، محلولی از استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. برای مطمئن شدن از دیابتی‌شدن موش‌های صحرایی، سه روز بعد از تزریق، قند خون آن‌ها را با دستگاه اندازه‌گیری قند خون اکتیو (Active)، ساخته شرکت آکواچک (Accu-Chek) ساخت آلمان، از نمونه خون‌گرفته شده از سیاهرگ دم موش‌ها، سنجیده شد. قند خون بین ۱۲۶ تا ۲۶۰ میلی‌گرم در سی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابت نوع ۲ در نظر گرفته شد [۲۲، ۲۳]. سپس موش‌های صحرایی به گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین دیابتی تقسیم شدند.

۲.۳. مؤلفه‌های تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)

۲.۳.۱. آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت

قبل از شروع برنامه تمرین اصلی HIIT، آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت بر روی گروه پایلوت (۵ سر) که حدوداً یک هفته جلوتر از گروه تمرین اصلی بودند، جهت تنظیم و کنترل سرعت موش‌های صحرایی گروه تمرین اصلی انجام گرفت. این موش‌های صحرایی گروه پایلوت با سرعت ۵ متر بر دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۳ دقیقه سرعت نوار گردان ۵ متر بر دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرایی به خستگی برسند. معیار خستگی موش‌های صحرایی چسبیدن به انتهای تردمیل بود. سرعتی که در آن موش‌های صحرایی به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۲۴].

۲.۳.۲. پروتکل اصلی HIIT

موش‌های صحرایی گروه تمرینی در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه (معادل ۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت) گرم کردند. سپس برنامه تمرینی شامل ۵ نوبت ۴ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت (معادل ۲۰ تا ۳۲ متر بر دقیقه) و دوره‌های استراحت فعال ۳ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر سرعت (معادل ۱۵ تا ۱۸ متر بر دقیقه) انجام شد.

۴. آماده سازی نمونه: نمونه های پروتئینی تهیه شده قبل از ریخته شدن در چاهک می بایست هم غلظت شده و با بافر نمونه مخلوط و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شود. این بافر موجب سنگین شدن، احیا و خطی شدن پروتئین ها می شود علاوه بر آن برموفنول بلو موجود در بافر طبقه حرکت پروتئین ها را در ژل نشان می دهد.

۵. ساخت الکتروفورز بر روی ژل SDS page: SDS page از پلیمر آکریل آمید ساخته شده است که بیس آکریل آمید این پلیمر را به صورت عرضی به هم مرتبط کرده است. به گونه ای که منافذ با قطر معین و یکسان در ژل حاصل می شود. پلیمریزاسیون ژل با افزودن آمونیوم پرسولفات (APS) شروع شده و با اضافه کردن تترامتی اتیلن دی آمین (TEMED) موجب تشکیل رادیکال های آزاد از APS شده که این رادیکال ها باعث پلیمریزاسون می شود.

۶. روش انجام آزمایش و ساختن ژل پایین و بالا: برای دورگیری ژل، ۱۰۰۰ میکرولیتر از ژل پایین کاملاً فاقد تمد را برداشته و به آن ۴ میکرولیتر تمد اضافه شد. سپس محلول حاصل را به سرعت از گوشه هایی از فضایی دو ژل ریخته شد، بعد از دورگیری ۱۵ دقیقه، فرصت داده شد تا کاملاً بگیرد و سپس محلول ژل کامل به همراه تمد را برداشته به وسیله سمپلر در فضایی بین دو شیشه ریخته به طوری که تا دوسوم شیشه ها پر شد. سپس مقداری اتانول اشباع شده اسپری کرده تا مانع خشک شدن ژل شود و به علت سنگینی حاصل از آن سطح ژل صاف شد. حدود ۴۵ دقیقه برای پلیمریزاسیون ژل پایین لازم است و در این مرحله ژل بالا ۵ درصد آماده شد.

۷. الکتروفورز بر ژل SDS page: شیشه های حاوی ژل، درون تانک الکتروفورز قرار داده شدند. بافر الکتروفورز اضافه گردید و سپس ابتدا مارکر پروتئین رنگی (دارای پروتئین هایی با وزن مولکولی مشخص است که رنگی است و از ژل به کاغذ منتقل می شود) به میزان دو میکرولیتر در چاهک اول و نمونه ها در سایر چاهک ها به میزان ۱۲ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون لود شد. سپس الکترودها را به دستگاه مولد جریان وصل کرده و تا رسیدن پروتئین ها به ژل پایین، حدود ۴۵ دقیقه جریان با ولتاژ ۱۲۰ برقرار شد.

۸. وسترن بلات یا ایمونوبلاتینگ: ایمونوبلاتینگ روشی است که طی آن باندهای پروتئینی جدا شده توسط ژل

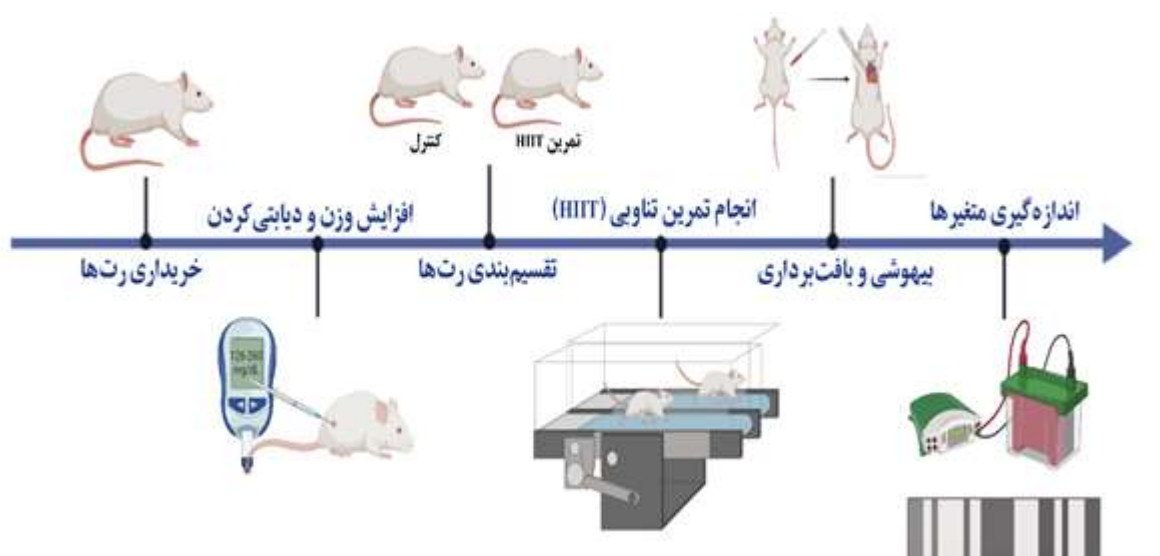
الکتروفورز به غشایی از جنس نیترو سلولوز یا PVDF انتقال یافته و سپس به وسیله آنتی بادی اختصاصی پروتئین های روی آن شناسایی می شود. انتقال نمونه ها از ژل به کاغذ توسط جریان الکتریکی صورت گرفت. بعد از اتمام الکتروفورز ژل به آرامی از شیشه ها جدا شده و در بافر انتقال قرار گرفت. سپس کاغذ PVDF به اندازه ژل بریده شده و برای فعال شدن به مدت ۱ دقیقه در متانول شلیک شده و با آب مقطر شسته شد و درون بافر انتقال قرار گرفت. در حین قرار دادن کاغذ صافی روی کاغذ PVDF و کاغذ PVDF روی ژل، حباب هایی ایجاد شده توسط حرکت آهسته اسپیسر روی کاغذ صافی خارج گردید. در نهایت دستگاه و با ولتاژ ۱۲۰ میلی ولت به مدت یک و نیم ساعت به منبع مولد جریان متصل گشته و پروتئین های موجود در ژل به کاغذ منتقل گردید.

۹. مرحله بلاکینگ: در مرحله بلاکینگ، محلول بلاکینگ به منظور پوشاندن کاغذ برای جلوگیری از واکنش غیراختصاصی آنتی بادی اولیه به کار می رود.

۱۰. مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه و ثانویه: پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ کاغذ با آنتی بادی اولیه ای که با محلول بلاکینگ به مقدار معین آنتی بادی اولیه بتا-اکتین (anti-β-Actin (C4) (sc-47778)) مخلوط و رقیق شده، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه گردید. سپس کاغذ با آنتی بادی ثانویه با غلظت (۱:۱۰۰۰) برای تمام آنتی بادی های اولیه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شیک شد.

مرحله آشکارسازی: پس از شست و شوی نهایی مرحله قبل آب اضافی کاغذ PVDF روی سلفون قرار گرفت و محلول کمولومینسانس با سمپلر روی نواحی باند موردنظر ریخته شد. کاغذ در سلفون گذاشته شد و درون کاست فیلم قرار داده شد. برای مشاهده باند پروتئینی موردنظر فیلم عکاسی را بر کاغذ دارای پوشش نایلونی گذاشته و در کاست بسته شد. مدت زمان باقی ماندن فیلم در کاست به نوع آنتی بادی و شدت نور دیده شده از باند پروتئینی بستگی داشت. در مورد آنتی بادی های anti-ATF6 (F-7) (sc-166659)، anti-JNK1 (D-2) (sc-7345) و anti-mTOR (F-7) (sc-517464) ساخت شرکت Santa-Cruz، ۶۰ تا ۸۰ ثانیه و در مورد آنتی بادی بتا-اکتین ۱۰، ثانیه زمان مناسبی بود. سپس در تشتک آب فیلم را به مدت ۲۰ ثانیه شسته و بعد از آن به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ثبوت تکان داده شد. سپس مجدداً

فیلم را با آب جاری شسته و با گیره آویزان کرده تا خشک شدند.



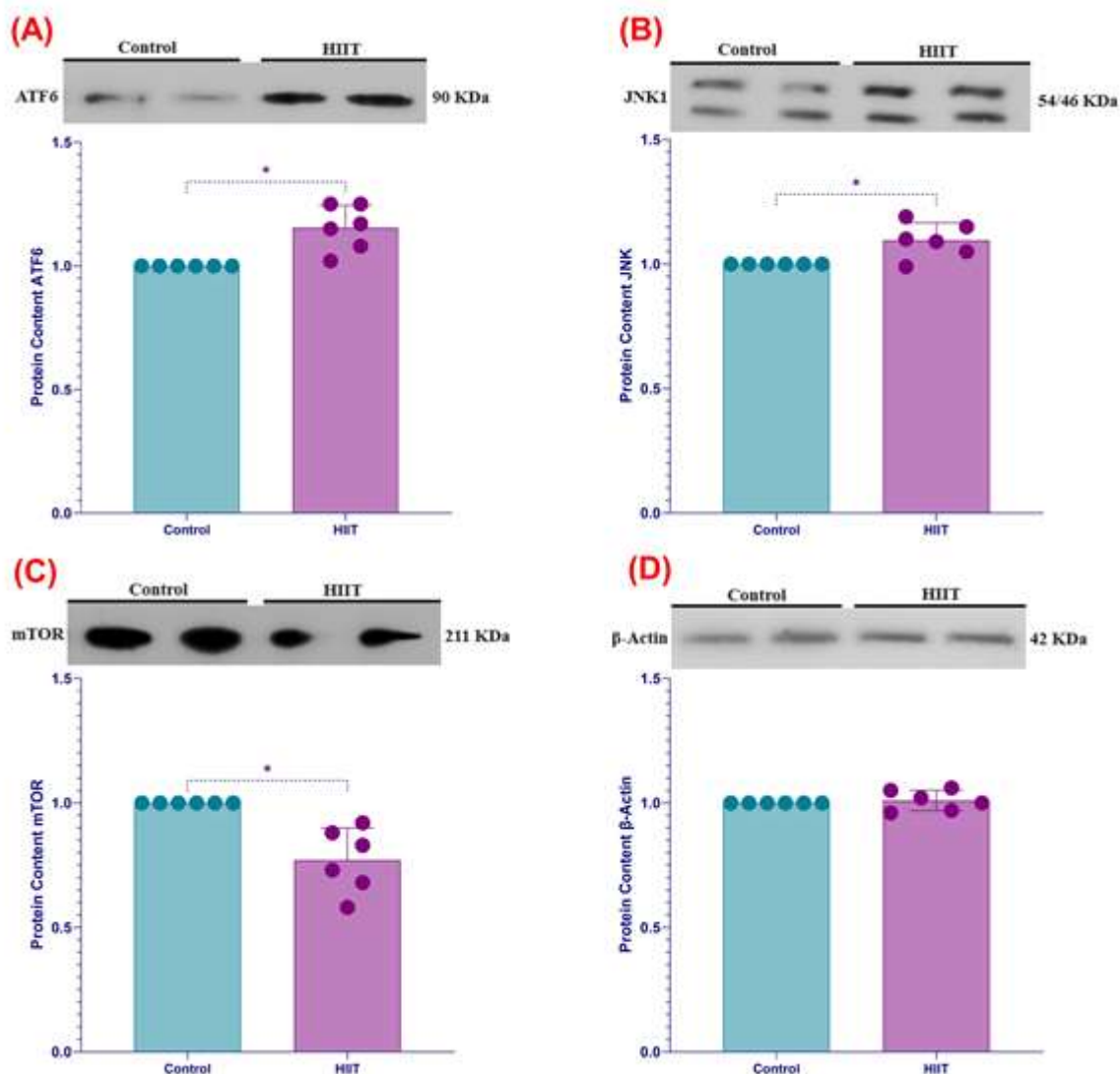
شکل ۱. تصویر شماتیک از فرآیند اجرای مطالعه

نشان داد ($P=0/002$) (شکل ۲). اندازه اثر Choen'd، برای پروتئین ATF6 برابر با ۲/۳۶ بود ($EF=2/36$). همچنین افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین JNK1 به دنبال ۸ هفته HIIT نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب مشاهده شد ($P=0/002$) (شکل ۲). اندازه اثر Choen'd، برای پروتئین JNK1 برابر با ۱/۸۹ بود ($EF=1/89$). در مقابل محتوای پروتئین mTOR به دنبال ۸ هفته HIIT کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان داد ($P=0/001$) (شکل ۲). اندازه اثر Choen'd، برای پروتئین mTOR برابر با ۲/۵۱ بود ($EF=2/51$). از طرفی محتوای پروتئین β -Actin به دنبال ۸ هفته HIIT تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان نداد ($P=0/56$) (شکل ۲). اندازه اثر Choen'd، برای پروتئین β -Actin برابر با ۰/۲۲ بود ($EF=0/22$).

تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون آماری شاپیرو-ویلک بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، داده‌های متغیرهای تحقیق حاضر از طریق آزمون آماری t -مستقل تجزیه و تحلیل شدند. بررسی داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۹ و گراف‌پد پریسم (GraphPad Prism) نسخه ۱۰/۲/۳ انجام گرفت. اندازه اثر از طریق آزمون Choen'd بررسی شد. شکل ۱ از طریق نرم‌افزار ادوبی ایندیزاین نسخه ۲۰۲۳ و شکل ۲ از طریق نرم‌افزار گراف‌پد پریسم طراحی شد. سطح معناداری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

تجزیه و تحلیل محتوای پروتئین ATF6 به دنبال ۸ هفته HIIT افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب



شکل ۲. مقایسه محتوای پروتئین‌ها در گروه‌های HIIT و کنترل در بطن چپ قلب.

- (A). نمودار ستونی نشان‌دهنده مقادیر کمی شده و تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین ATF6.
 (B). نمودار ستونی نشان‌دهنده مقادیر کمی شده و تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین JNK.
 (C). نمودار ستونی نشان‌دهنده مقادیر کمی شده و تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین mTOR.
 (D). نمودار ستونی نشان‌دهنده مقادیر کمی شده و تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین β-Actin
 (* وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه HIIT نسبت به گروه کنترل در سطح $P \leq 0.05$)

۴. بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر بینش‌های قابل توجهی را در مورد اثرات تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) بر بیان پروتئین قلبی در موش‌های دیابتی، به‌ویژه با تمرکز بر بطن چپ، ارائه می‌دهد. افزایش محتوای پروتئین‌های ATF6 و JNK1 همراه با کاهش محتوای پروتئین mTOR، نشان‌دهنده پاسخ‌های سازگاری پیچیده به تمرین ورزشی HIIT در زمینه دیابت نوع ۲ است. این یافته‌ها نه تنها درک ما از فیزیولوژی قلب را افزایش می‌دهند، بلکه زمینه وسیع‌تری برای تفسیر نتایج فراهم می‌کنند.

افزایش قابل توجه محتوای پروتئین ATF6 پس از ۸ هفته HIIT به‌طور ویژه‌ای جالب است؛ زیرا ATF6 نقش مهمی در پاسخ استرس ER ایفا می‌کند و بیان ژن‌های دخیل در چین‌خوردگی و تخریب پروتئین تا نشده را تنظیم می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند کمبود یا نقص ATF6 در میوسیت‌های قلبی در معرض ایسکمی و خون‌رسانی مجدد، گونه‌های فعال اکسیژن و مرگ سلولی یک روزه را افزایش می‌دهد که هر دو بابیان بیش‌ازحد ATF6 کاهش یافته‌اند [۱۳]. علاوه بر این، قلب‌های فاقد ATF6 افزایش آسیب و کاهش عملکرد پس از ایسکمی را نشان دادند. از نظر مکانیکی، ATF6 به‌عنوان القاکننده ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ER شناخته شده است که چین‌خوردگی پروتئین ER را تقویت می‌کنند؛ لذا ATF6 ژن‌های پاسخ استرس اکسیداتیو متعددی مانند کاتالاز را القا می‌کند که به کاهش گونه‌های مخرب اکسیژن فعال در قلب معروف است. نشان داده شده است ATF6 در میوسیت‌های قلبی باعث افزایش فعالیت پروموتور کاتالاز می‌شود؛ بنابراین ATF6 نقش مهمی را در کاهش استرس ER و استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند و از مکانیسم جدیدی پشتیبانی می‌کند که به‌وسیله آن ATF6 آسیب ایسکمی و خون‌رسانی مجدد میوکارد را کاهش می‌دهد [۱۳]. تحقیقات بعدی نشان دادند که افزایش فعالیت ATF6 در کاردیومیوسیت‌ها مکانیسم‌های بقاء را در طول استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد [۲۶] و این هم‌راستا با افزایش ATF6 در مطالعه ما است که نشان‌دهنده یک پاسخ سازگاری تحت شرایط دیابت از طریق HIIT است. افزایش محتوای پروتئین ATF6 در تحقیق حاضر هم‌راستا با نتایج تحقیق Chen و همکاران (۲۰۲۴) است که گزارش کردند تمرین ورزشی هوازی می‌تواند بیان ATF6 را افزایش دهد و در نتیجه عملکرد قلب را از طریق کاهش استرس ER بهبود بخشد و در نتیجه آپوپتوز را در جوندگان دیابتی کاهش دهد [۲۷]. همچنین نتایج مطالعه حاضر از این ایده حمایت می‌کند

که HIIT ممکن است مسیرهای محافظتی را فعال کند و به‌طور بالقوه برخی از اثرات مضر دیابت بر بافت قلب را کاهش دهد. به‌طور مشابه، افزایش قابل توجه محتوای پروتئین JNK1 پس از HIIT بر نقش این کیناز در سازگاری قلبی تأکید می‌کند. شایان‌ذکر است JNK1 بخشی از مسیر سیگنالینگ MAPK است که در پاسخ به عوامل استرس‌زای مختلف از جمله التهاب و استرس اکسیداتیو فعال می‌شود [۲۸]. افزایش این پروتئین پس از HIIT ممکن است همراه با افزایش موقت التهاب و استرس اکسیداتیو به دلیل عدم سازگاری باشد. درعین حال، اگرچه JNKs خانواده‌ای از کینازهای ناشی از استرس هستند که اخیراً در سندروم کاردیومتابولیک نشان داده شده‌اند [۲۹]؛ اما در تحقیقی توسط Bo و همکاران (۲۰۲۳) گزارش شد افزایش JNK1 به دنبال HIIT نقش محافظتی بالقوه‌ای را نشان می‌دهد، زیرا JNK1 در ارتقاء بقای سلولی و میانجیگری پاسخ‌های التهابی نقش دارد. این محققان بر اساس نتایج خود بیان کردند که پس از مداخله HIIT، التهاب با کمپلکس‌های NF-κB و مسیر JNK1/c-Jun کاهش می‌یابد [۳۰]. در این راستا، مطالعات تأکید کردند که فعال‌سازی JNK1 می‌تواند با ارتقای پاسخ‌های انطباقی به استرس و افزایش عملکرد میتوکندری به نتایج مفیدی در قلب منجر شود. به عبارت دیگر، در طول ورزش، سطوح داخل سلولی یون‌های کلسیم، گروه‌های فسفات آزاد، ROS و مولکول‌های تنظیم‌کننده انرژی مانند ADP یا AMP افزایش می‌یابد. این عوامل سیگنال‌های قوی هستند که پروتئین کینازها را مانند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم/کالمودولین (CaMKs)، پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK)، PMAPK، کیناز تنظیم‌شده با سیگنال (ERK)، JNK و PKB را فعال می‌کنند. این موارد به‌نوبه خود، تنظیم‌کننده فعال میتوکندری و سیستم میتوفاژی نیز شناخته می‌شوند [۳۱]. این یافته‌ها به‌طور ویژه در زمینه دیابت که در آن التهاب قلبی و اختلال عملکرد میتوکندری شایع است، مرتبط است؛ بنابراین، به نظر می‌رسد فعال‌سازی JNK1 ناشی از HIIT می‌تواند کاهش استرس ER، افزایش متابولیسم و عملکرد قلبی را در مدل‌های دیابتی منجر شود. با این حال، افزایش محتوای پروتئین JNK1 در مطالعه ما ممکن است نشان‌دهنده تغییراتی به سمت فنوتیپ قلبی انعطاف‌پذیرتر باشد که قادر به مقاومت در برابر چالش‌های ناشی از دیابت است. در مقابل، کاهش قابل توجه محتوای پروتئین mTOR پس از ۸ هفته HIIT مکانیسم‌های سازگاری با ورزش را نشان می‌دهد. mTOR یک تنظیم‌کننده مرکزی رشد و متابولیسم سلولی است

می‌کند و افزایش ATF6 و JNK1 را در کنار کاهش mTOR نشان می‌دهد. این یافته‌ها به بدنه رو به رشد ادبیات کمک می‌نماید که بر اهمیت ورزش در تعدیل سلامت قلب، به‌ویژه در زمینه دیابت تأکید می‌کند. این تحقیق با روشن کردن تعامل پیچیده این پروتئین‌ها، بر پتانسیل HIIT به‌عنوان یک مداخله درمانی برای بهبود عملکرد قلب و انعطاف‌پذیری در جمعیت‌های دیابتی تأکید می‌کند. تحقیقات آینده باید برای کشف مکانیسم‌های پشت این سازگاری‌ها و پیامدهای آن‌ها برای عملکرد بالینی ادامه یابد و در نهایت باهدف ارتقای کیفیت زندگی افراد مبتلا به دیابت استمرار پیدا کند.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش‌شده حاصل تلاش نویسندگان این مقاله است که در موسسه آموزش عالی آپادانا شیراز انجام شده است. از همه افرادی که در انجام و جمع‌آوری این پژوهش ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر دارای کد اخلاق IR.US.PSYEDU.REC.1403.042 است.

سهم نویسندگان

خانم فاطمه صلح دوست کار اجرایی را انجام داده است. آقای حامد علیزاده پهلوانی مقاله را نوشته است و آقای محمد شرافتی مقدم ایده پردازی و نظارت کار را انجام داده است.

حمایت مالی

این مقاله هیچ‌گونه حمایت مالی نداشته است.

تضاد منافع

پژوهش حاضر هیچ‌گونه تضاد منافی برای نویسندگان نداشته است.

که اغلب در پاسخ به مواد مغذی و عوامل رشد فعال می‌شود. کاهش آن پس از HIIT، به‌ویژه در موش‌های صحرایی دیابتی، حاکی از تغییر احتمالی سیگنال‌های محرک رشد به سمت حالت محافظت‌کننده‌تر و بقای محور است. این یافته در تضاد با ادبیات قبلی است که معمولاً ورزش را با فعال‌سازی mTOR مرتبط می‌کند که برای هیپرتروفی عضلانی و ریکاوری بسیار مهم است [۳۲]. با این حال، نتایج مطالعه فعلی ممکن است منعکس‌کننده محیط متابولیک منحصر به فرد موش‌های دیابتی باشد، جایی که سیگنالینگ mTOR می‌تواند مختل شود. تحقیقات نشان داده‌اند که در شرایط دیابتی، فعالیت بیش‌ازحد mTOR می‌تواند منجر به بازسازی نامطلوب قلب و اختلال در عملکرد قلب شود [۸]. تحت شرایط دیابت، فعال‌سازی مزمن mTOR باعث ایجاد چندین رویداد پاتولوژیک می‌شود؛ درحالی‌که درمان کوتاه‌مدت (حاد) با راپامایسین، یک مهارکننده mTOR، یک استراتژی امیدوارکننده برای بیماری‌های قلبی مانند انفارکتوس حاد میوکارد و هیپرتروفی قلب در T2DM است [۸]. همچنین گزارش شده است سیگنال دهی mTOR در قلب دیابتی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با استرس اکسیداتیو تداخل دارد [۳۳]؛ بنابراین، کاهش محتوای mTOR در مطالعه ما ممکن است یک مکانیسم جبرانی باهدف جلوگیری از اثرات مضر باشد که معمولاً با سیگنالینگ بیش‌ازحد mTOR در دیابت مرتبط است.

نتایج حاضر در مورد سطوح ATF6، JNK1 و mTOR پس از HIIT درک متفاوتی از سازگاری قلبی در دیابت ارائه می‌کند. درحالی‌که سطوح ATF6 و JNK1 افزایش یافتند که نشان‌دهنده یک پاسخ محافظتی است، اما محتوای mTOR کاهش یافت که نشان‌دهنده تغییر از رشد به سمت بقاء سلولی است. این دوگانگی پیشنهاد می‌دهد تمرین ورزشی HIIT می‌تواند برنامه‌ریزی مجدد مسیرهای سیگنالینگ در قلب‌های دیابتی را القاء کند و مکانیسم‌های محافظتی را به مکانیسم‌های محرک رشد ترجیح دهد.

درنتیجه، پژوهش حاضر اثرات قابل توجه HIIT را بر محتوا و بیان پروتئین‌های قلبی در موش‌های صحرایی دیابتی برجسته

References

- [1]. Ponikowski, P. et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide. ESC heart failure, 2014. 1(1): p. 4-25. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12005>
- [2]. Pahlavani, H.A. Exercise-induced signaling pathways to counteracting cardiac apoptotic processes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022. 10: p. 950927. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.950927>
- [3]. Baraka, A. and H. AbdelGawad, Targeting apoptosis in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2010. 15(2): p. 175-181. <https://doi.org/10.1177/1074248409356557>
- [4]. Kuethe, F. et al. Apoptosis in patients with dilated cardiomyopathy and diabetes: a feature of diabetic cardiomyopathy? *Hormone and metabolic research*, 2007. 39(09): p. 672-676. DOI: 10.1055/s-2007-985823
- [5]. Kato, H. et al. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway. *Cell Death & Differentiation*, 2012. 19(2): p. 310-320. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.98>
- [6]. Xu, J. et al. Endoplasmic reticulum stress and diabetic cardiomyopathy. *Journal of Diabetes Research*, 2012. 2012(1): p. 827971. <https://doi.org/10.1155/2012/827971>
- [7]. Sen, S. et al. Glucose regulation of load-induced mTOR signaling and ER stress in mammalian heart. *Journal of the American Heart Association*, 2013. 2(3): p. e004796. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.004796>
- [8]. Suhara, T. et al. The mTOR signaling pathway in myocardial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, 2017. 17: p. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0865-4>
- [9]. Moellmann, J. et al. The sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor ertugliflozin modifies the signature of cardiac substrate metabolism and reduces cardiac mTOR signalling, endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2022. 24(11): p. 2263-2272. <https://doi.org/10.1111/dom.14814>
- [10]. Tang, Y. J. Long, and J. Liu, Hyperglycemia-associated oxidative stress induces autophagy: involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 pathway, in *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, 2014, Elsevier. p. 105-115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405530-8.00008-X>
- [11]. Pandey, V.K. A. Mathur, and P. Kakkar, Emerging role of Unfolded Protein Response (UPR) mediated proteotoxic apoptosis in diabetes. *Life sciences*, 2019. 216: p. 246-258. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.041>
- [12]. Yan, B. et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress alleviated heart ischemia/reperfusion injury via modulating IRE1/ATF6/RACK1/PERK and PGC-1 α in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. 118: p. 109407. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109407>
- [13]. Jin, J.K. et al. ATF6 decreases myocardial ischemia/reperfusion damage and links ER stress and oxidative stress signaling pathways in the heart. *Circulation research*, 2017. 120(5): p. 862-875. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310266>
- [14]. Liu, Z.W. et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular diabetology*, 2013. 12: p. 1-16. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-158>
- [15]. Sherafati-Moghadam, M. et al. The effect of high-intensity interval training (HIIT) on protein expression in Flexor Hallucis Longus (FHL) and soleus (SOL) in rats with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2022. 21(2): p. 1499-1508. <https://doi.org/10.1007/s40200-022-01091-3>
- [16]. Shabani, M. et al. The effect of four weeks high intensity interval training (HIIT) and aerobic training on troponin T content in healthy male Wistar rats myocardial tissue. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 2017. 24(5): p. 305-310. https://jsums.medsab.ac.ir/article_1000_en.html?lang=en
- [17]. Alizadeh Pahavani, H. et al. The effect of aerobic exercise with medium and high intensity on the gene expression of Bax (BCL2 associated X) and Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion. *Sport Physiology*, 2020. 12(45): p. 31-44. <https://doi.org/10.22089/spj.2018.4598.1618>
- [18]. Pahlavani, H.A. et al. The effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences*, 2019. 41(3): p. 68-77. doi: 10.34172/mj.2019.035
- [19]. Mirsepasi, M. et al. The effects of high intensity interval training on gene expression of AKT1 and mTORc1 in the left ventricle of type 2 diabetic rats: An experimental study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 2019. 17(12): p. 1119-1130. https://journal.rums.ac.ir/browse.php?a_id=4321&sid=1&sl_c_lang=en&html=1
- [20]. Rami, M. et al. Highlighting the novel effects of high-intensity interval training on some histopathological and molecular indices in the heart of type 2 diabetic rats. *Frontiers in Endocrinology*, 2023. 14: p. 1175585. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1175585>
- [21]. Fathi, R. M. Ebrahimi, and S. Khenar Sanami, Effects of High Fat Diet and High Intensity Aerobic Training on Interleukin 6 Plasma Levels in Rats. *Pathobiology Research*, 2015. 18(3): p. 109-116. <https://mjms.modares.ac.ir/article-30-146-en.html>
- [22]. Safhi, M.M. et al. The combination of canagliflozin and omega-3 fatty acid ameliorates insulin resistance and cardiac biomarkers via modulation of inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2018. 22(5): p. 493-501. DOI: <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.5.493>
- [23]. Khalili, A. A.A. Nekooiean, and M.B. Khosravi, Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *Journal of Asian natural products research*, 2017. 19(10): p. 1011-1021. <https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1307834>
- [24]. Garcia, N.F. et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr^{-/-} mice: role of aerobic exercise training. *American journal of cardiovascular disease*, 2017. 7(2): p. 64. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5435607/>
- [25]. Khoramshahi, S. et al. Effect of five weeks of high-intensity interval training on the expression of miR-23a and Atrogin-1 in gastrocnemius muscles of diabetic male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2017. 18(5). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173237866>
- [26]. Koul, S. Role of Atf6 β as a Mediator of Cardiac Myocyte Viability and Survival. 2018, San Diego State University. <https://www.proquest.com/openview/2c9b0ad8ec396658941971c59ff61164/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- [27]. Chen, Q. et al. Endoplasmic reticulum stress mechanisms and exercise intervention in type 2 diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024. 177: p. 117122. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117122>
- [28]. Baines, C.P. and J.D. Molkentin, STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2005. 38(1): p. 47-62. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2004.11.004>
- [29]. Craige, S.M. et al. JNK and cardiometabolic dysfunction. *Bioscience Reports*, 2019. 39(7): p. BSR20190267. <https://doi.org/10.1042/BSR20190267>
- [30]. Bo, B. et al. Elucidating the primary mechanisms of high-intensity interval training for improved cardiac fitness in obesity. *Frontiers in Physiology*, 2023. 14: p. 1170324. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1170324>
- [31]. Ebadi, B. et al. Cardiomyocyte mitochondrial dynamics in health and disease and the role of exercise training: A brief review. *Research in Cardiovascular Medicine*, 2018. 7(3): p. 107-115. DOI: 10.4103/rcm.rcm_11_18
- [32]. de Oliveira França, G. et al. Effects of short-term high-intensity interval and continuous exercise training on body composition and cardiac function in obese sarcopenic rats. *Life Sciences*, 2020. 256: p. 117920.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117920>
[33]. Zhao, D. J. Yang, and L. Yang, Insights for oxidative stress and mTOR signaling in myocardial ischemia/reperfusion injury under diabetes. *Oxidative medicine and cellular longevity*,

2017. 2017(1): p. 6437467.
<https://doi.org/10.1155/2017/6437467>

[1].