

## The comparison of the effect of high Intensity interval and progressive resistance training on activated transcription factor 3 myocardial gene expression in male diabetic rats

Shahabuddin Sefal Manesh <sup>1</sup>, Neda Khaledi <sup>1\*</sup>, Hamid Rajabi <sup>1</sup>, Hossein Askari <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### Original Article

#### Abstract

**Purpose:** According to the controversy about the role of ATF3 as a non-inflammatory index of myocardia in metabolic abnormalities as diabetes, the purpose of this study was to compare the effect of high intensity interval versus progressive resistance training on ATF3 myocardial gene expression of male diabetic rats.

**Methods:** Sixty male six weeks rats with a weighing average of 150 g were randomly divided into five groups: diabetic (D), diabetes- high intensity interval training (DIT), high intensity interval training (HIIT), resistance (RT), and diabetes- resistance training (DRT). High intensity interval training included 10 repetitions of one minute running on a treadmill with two minutes of rest. Progressive resistance training included four climb of a resistance ladder with weights. The training program was performed three days a week for six weeks. Data analysis was performed using Fisher's and M-ANOVA tests at a significant level of  $P \leq 0.01$ .

**Results:** Significant increase in expression of ATF3 in diabetes- high intensity interval training group was observed between diabetes and diabetes- high intensity interval training ( $P < 0.001$ ). Between two groups of diabetes and diabetes- resistance training ( $P = 0.001$ ), there was a significant increase in expression in diabetes- resistance training. In comparison between DIT and DRT groups, progressive respond were observed in DIT versus DRT ( $P = 0.03$ ).

**Conclusion:** high intensity interval training has been shown to be more effective in comparison with the progressive resistance training, because it activates more different molecular cell mechanisms, perhaps, significantly reduces the negative effects of diabetes mellitus on cardiovascular disease.

**Keywords:** Active Transcription Factor 3, Diabetes, Heart Tissue, High intensity Interval Training, Diabese

How to cite this article: Sefal Manesh S, Khaledi N, Rajabi H, Askari H. The Comparison of the effect of High Intensity Interval and Progressive Resistance Training on Activated Transcription Factor 3 myocardial gene expression in male Diabetic Rats. Journal of Sport and Exercise Physiology 2021;14(2): 67-76

\*Corresponding Author; E-mail: n.khaledi@khu.ac.ir

DOI: 10.52547/joeppa.14.2.67

Received: 28/08/2018

Accepted: 07/06/2020

## مقایسه اثر تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر بیان ژن ATF3 عضله قلبی موش‌های صحرایی دیابتی نر

شهاب الدین سفال منش<sup>۱</sup>، ندا خالدی<sup>۲</sup>، حمید رجبی<sup>۱</sup>، حسین عسکری<sup>۲</sup>

۱ دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲ دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**هدف:** با توجه به تناقضات موجود درباره نقش عامل رونویسی فعال شده<sup>۳</sup> به عنوان یک شاخص غیرالتهابی فعالیت میوکاردی در ناهنجاری‌های متابولیکی مانند دیابت، پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر دو تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر بیان ژن ATF3 عضله قلبی موش‌های صحرایی دیابتی نر انجام گرفت. **روش‌ها:** ۶۰ سر موش صحرایی نر ۶ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۵۰ گرم به صورت تصادفی به پنج گروه دیابتی (D)، دیابت-تناوبی شدید (DIT)، تناوبی شدید (HIIT)، مقاومتی (RT) و دیابت-مقاومتی (DRT) تقسیم شدند. تمرین تناوبی شدید شامل ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای دویدن روی نوار گردان با ۲ دقیقه استراحت و تمرین مقاومتی فزاینده شامل ۴ صعود از نردبان مقاومتی همراه وزنه بود. برنامه تمرین، ۳ روز در هفته، به مدت ۶ هفته همزمان انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون فیشر و M-ANOVA در سطح معناداری  $P \leq 0.01$  انجام گرفت. **نتایج:** میزان افزایش معنادار بیان ATF3 در دیابت-تناوبی شدید نسبت به دیابت بیشتر بود ( $P < 0.001$ ). بین دو گروه افزایش معنادار ( $P = 0.001$ ) بیشتر بود، پاسخ فزاینده بیان ژن ATF3 در گروه دیابت تناوبی شدید به طور معنادار بیشتر از پاسخ بیان ژن ATF3 گروه دیابت-تمرین مقاومتی بود ( $P = 0.003$ ). **نتیجه‌گیری:** تمرین تناوبی شدید در مقایسه با تمرین مقاومتی فزاینده سازوکارهای سلولی مولکولی مختلف را به طور مؤثرتری فعال می‌کند و احتمالاً موجب کاهش چشمگیر تأثیرات منفی ناشی از بیماری دیابت بردستگاه قلبی-عروقی می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** بافت قلب، تمرین تناوبی شدید، تمرین مقاومتی فزاینده، دیابت، عامل رونویسی فعال شده<sup>۳</sup>.

\* نویسنده مسئول: رایانامه: n.khaledi@khu.ac.ir

## مقدمه

منفی دیابت را بردستگاه قلبی-عروقی کاهش می دهد، فعالیت جسمانی است. پژوهش های متعدد نشان داده اند که تغییرات در سبک زندگی مانند ترک سیگار، تغذیه مناسب و ورزش منظم می تواند موجب کاهش تأثیرات کاردیومیوپاتی دیابتی و کاهش مرگ ناگهانی ناشی از مشکلات قلبی شود. فعالیت بدنی موجب تغییر سوبسترای مصرفی از اسید چرب به گلوکز، گلیکوزن عضله، چربی و به مقدار کمتر اسیدهای آمینه می شود. با افزایش شدت ورزش، اتکا به سوخت کربوهیدرات بیشتر می شود. هنگام فعالیت ورزشی کوتاه مدت و شدید (HIIT) سطوح کاتکولامین های پلازما افزایش می یابد و به افزایش تولید گلوکز می انجامد. استفاده بیشتر سلول های قلبی از گلوکز به جای اسیدهای چرب آزاد موجب کاهش تأثیرات منفی ناشی از اکسایش اسید چرب در سلول ها می شود (۸-۱۰). تحقیقات نشان می دهد انجام فعالیت ورزشی تناوبی شدید و کوتاه مدت (HIIT) موجب افزایش نشانگرهای بیونز میتوکندری در سلول های قلب، کاهش عوامل التهابی و آپوپتوزی، افزایش ظرفیت ضد اکسایشی و به طور کلی کاهش تأثیرات کاردیومیوپاتی دیابتی می شود (۱۱، ۱۲). تمرینات مقاومتی (RT) نیز از عوامل کمک کننده در کنترل عوارض متابولیکی دیابت نوع ۲ است (۱۳). از آنجا که انجام تمرین مقاومتی برای افراد دیابتی، به ویژه افراد مسن و چاق ساده تر بوده و قادر به ایجاد پاسخ های مناسب فیزیولوژیک در آنان است، می توان انجام این گونه تمرین را در مقابله با آتروفی به این بیماران توصیه کرد. گستردگی ناهنجاری های قلبی-عروقی متعاقب بیماری دیابت که تأثیرات منفی کاردیومیوپاتی دیابتی را نشان می دهد، توجه به ویژگی محافظتی ATF3 و از طرف دیگر تأثیرات مثبت بیان شده ناشی از فعالیت ورزشی بر مقادیر آن و تغییرات قند خون به عنوان متغیر مؤثر و بهبود یافته از تمرین، بررسی مقایسه تأثیر یک دوره تمرین مقاومتی فزاینده و تناوبی شدید بر مقادیر ATF3 در موش های صحرایی نر دیابتی را ضروری می سازد.

## روش پژوهش

**نمونه های پژوهش:** پژوهش انجام گرفته به لحاظ هدف توسعه ای، به لحاظ شیوه تجربی و از منظر اجرا آزمایشگاهی و با شیوه حیوانی بوده است. تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر ۶ هفته ای با وزن ۱۴۰ - ۱۶۰ گرم از

بیماری دیابت نوع ۲ از شایع ترین بیماری های متابولیک شناخته شده در جهان و علت اصلی مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست که هر ساله افراد زیادی را درگیر می کند. از بین انواع مختلف این بیماری، دیابت نوع ۲ شایع تر است و بیش از ۹۰ درصد موارد را شامل می شود. دیابت نوع ۲ آثار مخرب زیادی بردستگاه قلبی و عروقی افراد مبتلا می گذارد و قلب را در شرایط استرسی بالایی قرار می دهد. تأثیرات دیابت بردستگاه قلبی-عروقی و مشکلات ایجاد شده ناشی از آن در قلب، بیماری کاردیومیوپاتی دیابتی نامیده می شود. تغییرات متابولیکی که دیابت در عضله قلبی ایجاد می کند، سبب آسیب و کاهش انقباض پذیری میوکاردا، تغییرات ساختاری و عملکردی قلب، ایجاد التهاب در میوسیت ها و در موارد شدید سکنه قلبی و مرگ می شود (۱، ۲). مقاومت انسولینی ایجاد شده در بدن در نتیجه دیابت، موجب افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد در خون و دریافت و استفاده بیش از حد اسید چرب توسط سلول های قلبی می شود. در این شرایط، آثار مخرب غلظت زیاد و اکسایش بیش از حد اسید چرب مانند عملکرد میتوکندری ها می شود. افزایش سایتوکاین های التهابی در گردش (اینترلوکین ۶ و ۱۸، اینترلوکین ۱ بتا و TGF آلفا)، افزایش فعالیت کاسپازها و فعال شدن مسیره های آپوپتوزی و نکروزی، در سلول های قلبی نمایان می شود. قلب نیز در پاسخ به این شرایط، سازوکارها، مسیره های پیام رسانی و عوامل رونویسی فراوانی را فعال می کند. یکی از این عوامل رونویسی، عامل رونویسی فعال شده<sup>۳</sup> (ATF3) است (۳، ۴). ATF3 عضوی از سوپر خانواده<sup>۲</sup> Bzip<sup>۲</sup> هاست که در شرایط استرسی بالا و در پاسخ به اختلالات متابولیکی به سرعت بیان آن افزایش می یابد. این عامل سبب حفاظت قلب در برابر اختلالات عملکردی، فشارهای اکسایشی، متابولیک و همچنین التهاب ایجاد شده توسط دیابت می شود. ATF3 با اتصال به عامل CRE<sup>۲</sup> موجب تنظیم بیان ژن سایتوکاین های پیش التهابی می شود. در تحقیقی روی موش های صحرایی دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب، کاهش بیان ATF3 موجب فیروز و اختلال عملکرد قلب و کاهش طول عمر موش های صحرایی در برابر سکنه قلبی شد (۵-۷). از دیگر عواملی که تأثیرات

**روش اجرای پژوهش:** تمرین تناوبی شدید (HIIT):  
 آشناسازی موش‌های صحرایی با نوارگردان ۳ روز طول کشید. برنامه انجام گرفته برای گروه دیابت - تناوبی شدید در هر روز به این صورت بود: روز اول، ۴ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۱۲ تا ۱۸ متر بر دقیقه و شیب ۰ درجه که بین هر نوبت ۲ دقیقه زمان استراحت بود. روز دوم، ۷ نوبت ۱ دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ تا ۱۸ و شیب ۰ درجه. روز سوم، ۸ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۱۲ تا ۱۸ متر بر دقیقه و شیب ۰ درجه. تمرین گروه تناوبی شدید نیز به همین صورت انجام گرفت، با این تفاوت که این گروه در روز اول ۶ نوبت، روز دوم ۷ نوبت و روز سوم ۸ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت را انجام دادند. موش‌های صحرایی که به هر دلیلی از دویدن امتناع می‌کردند، توسط پژوهشگر جایگزین می‌شدند. برنامه تمرینی تناوبی شدید برای گروه‌های تمرینی با استفاده از نوارگردان اجرا شد. برای تحریک موش‌های صحرایی به دویدن روی نوارگردان از شوک الکتریکی تعبیه شده روی دستگاه استفاده شد. برای گرم کردن موش‌های صحرایی پیش از شروع تمرین در هر روز، موش‌های صحرایی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه روی نوارگردان دویدند و سپس وارد روش تمرینی اصلی شدند. تمرین اصلی ۶ هفته‌ای تمرین (هر هفته ۳ روز) موش‌های صحرایی بدین صورت انجام گرفت: هفته اول، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۱۸ تا ۲۰ متر بر دقیقه (معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۲ درجه که بین هر نوبت ۲ دقیقه زمان استراحت بود؛ هفته دوم، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۲۲ تا ۲۴ متر بر دقیقه (معادل ۶۵ تا ۷۵ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۴ درجه؛ هفته سوم، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۲۴ تا ۲۶ متر بر دقیقه (معادل ۷۵ تا ۸۵ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۶ درجه؛ هفته چهارم، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۲۶ تا ۲۷ متر بر دقیقه (معادل ۸۵ تا ۹۰ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۸ درجه؛ هفته پنجم، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۲۷ تا ۲۹ متر بر دقیقه (معادل ۹۰ تا ۱۰۰ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۱۰ درجه و هفته ششم، ۱۰ نوبت ۱ دقیقه‌ای فعالیت با سرعت ۲۹ تا ۳۱ متر بر دقیقه (معادل ۱۰۰ تا ۱۱۰ درصد  $Vo_{2max}$ ) و شیب ۱۰ درجه (۱۴).  
 تمرین مقاومتی فزاینده (RT): موش‌های صحرایی تحت تمرین مقاومتی فزاینده شامل بالا رفتن از نردبان

انستیتو پاستور ایران خریداری شد. موش‌های صحرایی به پنج گروه ۱۲ تایی زیر تقسیم شدند: گروه ۱: موش‌های صحرایی دیابتی (D)، گروه ۲: دیابت - تمرین تناوبی شدید (DIT)، گروه ۳: دیابت - تمرین مقاومتی فزاینده (DRT)، گروه ۴: تمرین تناوبی شدید (HIIT) و گروه ۵: تمرین مقاومتی فزاینده (RT). همه موش‌های صحرایی از شرایط محیطی (در درجه هوا ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (۵۵ تا ۶۰ درصد) و دوره شبانه‌روزی ۱۲-۱۲ (ساعت روشنایی و تاریکی) یکسان برخوردار بودند. پس از اینکه موش‌های صحرایی خریداری و به محیط آزمایشگاه وارد شدند، به منظور آشناسازی با محیط به مدت یک هفته در آزمایشگاه قرار گرفتند. موش‌های صحرایی گروه دیابتی به منظور اعمال چاقی به مدت ۴ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب شامل ۲۲ درصد چربی، ۴۸ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین تهیه شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی قرار گرفتند. پس از دو هفته موش‌هایی با اضافه وزن (چاق) داشتیم. برای ایجاد دیابت در هر دو گروه از استرپتوزوتوسین به صورت تک‌دوز و به مقدار ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش تزریق داخل صفاقی استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، به منظور اطمینان از ایجاد دیابت در موش‌ها، قطره‌های خون از ورید دمی اخذ و میزان قند خون توسط دستگاه گلوکومتر تعیین شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن تعیین شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی ابتدا موش‌های صحرایی گروه کنترل و تمرین تناوبی شدید مورد نمونه‌گیری قرار گرفتند و ۲۴ ساعت پس از آن موش‌های صحرایی گروه تمرینی دیابتی و گروه دیابت نمونه‌گیری شدند. ابتدا به موش‌های صحرایی به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن ۰/۱ میلی‌گرم مخلوط کتامین - زایلوزین (۱۰ میلی‌گرم کتامین + ۱/۵ میلی‌گرم زایلوزین) تزریق شد تا بی‌هوش شوند. سپس با باز کردن قفسه سینه و شکم، بلافاصله خون حیوان با سرنگ از داخل قلب گرفته شده و قلب آنان جدا شد تا معدوم شوند. پس از جدا کردن قلب، بطن راست و چپ با تیغ جراحی از هم جدا شده و در ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن‌کشی شدند و بلافاصله پس از قرارگیری در کراتیوب مخصوص، درون مایع ازت قرار گرفتند. کراتیوپ‌ها تا زمان آماده‌سازی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

داخلی چنین محاسبه شد:

این رابطه، سطح بیان ژن موردنظر (target) را در شرایطی (cond2) نسبت به شرایط دیگر (cond1) مقایسه می‌کند. بدین منظور کارایی PCR برای ژن موردنظر Etarget و ژن کنترل داخلی EHK در نظر گرفته شد. همچنین منظور از cond1 نمونه در شرایط ۱ و منظور از cond2 نمونه در شرایط ۲ است. در نهایت برای مقایسه بیان ژن‌ها log2FC محاسبه شد. در روش ( $\Delta\Delta Ct$ ) که توسط لیواک<sup>۵</sup> و همکاران ارائه شد، است بررسی تغییرات نسبی بیان ژن به شیوه زیر انجام گرفت:

$$1) PC = (Ct_{target} - Ct_{thk})_{cond2} - (Ct_{target} - Ct_{thk})_{cond1} \Delta\Delta$$

$$2) PC = -(\Delta Ct_{cond2} - \Delta Ct_{cond1}) \Delta\Delta$$

$$3) Ratio = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$$

در اینجا منظور از cond1 نمونه در شرایط ۱ که معمولاً شاهد آزمایشی بوده و منظور از cond2 نمونه در شرایط ۲ است. همچنین منظور از target، ژن موردنظر و منظور از HK housekeeping یا کنترل داخلی است. هنگامی که طول رشته کمتر از ۱۵۰bp، غلظت +MG2 و آغازگر، بهینه باشد، Efficiency تقریباً برابر با ۲ می‌شود:

$$4) RATIO = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

روش Pfaffl به دلیل بالا بودن دقت آن بهترین روش است، ولی مزیت روش  $\Delta\Delta Ct$  در سهولت مراحل کار شایان توجه بود.

RNA کل با استفاده از کیت ترایزول<sup>۶</sup> استخراج شد. نمونه‌های ذخیره شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در هاون سرد ریخته شده و به کمک نیتروژن مایع کوبیده شدند تا به حالت پودری درآمدند. سپس از پودر حاصل مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم در ویال ۲ میلی‌لیتری قرار داده شد و برای استفاده بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه نگهداری می‌شد. همه ویال‌ها و سر سمپلرهای مورد استفاده در مراحل استخراج RNA از نوع عادی RNase تهیه و برای اطمینان ۲ مرتبه و هر بار به مدت ۴۵ دقیقه اتوکلاو شدند. در مرحله بعدی به ویال‌های حاوی پودر نمونه‌های مورد بررسی ۵۰۰ میکرولیتر محلول کیت ترایزول اضافه شد. سپس ویال‌ها ۳۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس و ۳۰ ثانیه با دستگاه همونایز با ۲۵۰۰ دور در دقیقه یکنواخت شدند و پس از آن به تمام ویال‌ها ۵۰۰ میکرولیتر دیگر از محلول کیت ترایزول افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری

عمودی به طول ۱۱۰ سانتی‌متر و فاصله پله‌های ۲ سانتی‌متر و زاویه ۸۵ درجه قرار گرفتند که در قسمت بالا محفظه‌ای مجزا برای استراحت حیوان تعبیه شد. پیش از شروع تمرینات، پیش‌آزمون IRM (یک تکرار بیشینه) و پس از پایان تمرینات نیز، پس‌آزمون IRM گرفته شد. یک تکرار در طول نردبان شامل ۲۶ پله یا ۱۳ گام در هر اندام بود. در بالای نردبان موش‌های صحرایی به یک اتاقک ۲۰×۱۰×۲۰ سانتی‌متری دسترسی داشتند که به آن‌ها اجازه داده شد به مدت ۶۰ ثانیه در آن استراحت کنند. به دنبال ۳ روز آشناسازی با بالا رفتن از نردبان، موش‌های صحرایی گروه تمرین مقاومتی (RT)، تمرین مقاومتی فزاینده را آغاز کردند که به موجب آن وزنه‌ها به دم آنها بسته شد. اولین جلسه تمرینی شامل ۴ تا ۸ صعود از نردبان بود که وزنه‌ها به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد وزن بدن حیوان را تشکیل می‌داد. پس از اتمام موفقیت‌آمیز این بار، ۳۰ گرم به وزنه‌ها اضافه شد که این روش به طور متوالی ادامه یافت تا جایی که وزنه‌ها به حدی برسد که نمونه‌ها نتوانند به طور کامل نردبان را طی کنند. بیشترین باری که با موفقیت و به طور کامل در تمام طول نردبان حمل شد، به عنوان ظرفیت حمل بیشینه موش‌های صحرایی در آن تمرین مطرح شد. جلسه تمرینی بعدی شامل ۴ تا ۹ صعود از نردبان بود. در طول چهار صعود اولیه موش‌های صحرایی به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت حمل بار بیشینه قبلی خود را حمل کردند. این دوره تمرینی ۳ روز در هفته به مدت ۶ هفته تکرار شد و در کل ۱۸ جلسه طراحی شد (۱۵).

**روش‌های آزمایشگاهی:** به منظور سنجش بیان ژن ATF3 نمونه‌های عضله قلبی استخراج شده از موش‌های صحرایی در دمای منفی ۸۰ درجه نگهداری شدند. به طور معمول، به منظور بررسی مقدار نسبی بیان ژن، از روش مبتنی بر کارایی (Pfaffl) و غیرمبتنی بر کارایی ( $\Delta\Delta Ct$ ) استفاده شد. روش Pfaffl شامل تعیین

$$FC = \text{relative expression} = \frac{(E_{HK})^{ct_{cond2}}}{(E_{tar})^{ct_{cond2}}} \div \frac{(E_{HK})^{ct_{cond1}}}{(E_{tar})^{ct_{cond1}}}$$

مقدار بیان ژن و طبیعی کردن آن با یک ژن کنترل داخلی است. طبیعی کردن به منظور تصحیح و حذف اختلاف‌های موجود در بازده تکثیر، شرایط تخلیص و مقدار حجم اولیه نمونه صورت گرفت. در این روش تغییرات بیان ژن موردنظر به تغییرات بیان ژن کنترل

شدند. برای حذف اثر تداخلی چربی نمونه‌ها در فرایند استخراج، ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و با شتاب ۱۲۰۰۰ جی سانتریفیوژ شدند. با انتقال ماده رویی به ویال‌های جدید، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به ازای هر ۱ میلی‌لیتر محلول ترايزول به هر ویال اضافه شد. ۱۵ ثانیه به آرامی مخلوط و به مدت ۷ دقیقه روی یخ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ویال‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با شتاب ۲۰۰۰ جی سانتریفیوژ شدند. در این مرحله به ترتیب ۳ بخش RNA، DNA و پروتئین از بالا به پایین قابل مشاهده است که بخش بالایی حاوی RNA کل، جدا و به ویال جدید منتقل شدند. ۴۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد به هر ویال اضافه و ۱۰ بار به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه نگهداری شد. ویال‌ها در دمای ۴ درجه با شتاب ۱۲۰۰۰ جی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله سوپرناتانت حذف و

پلت در دمای اتاق خشک شد. در این مرحله دقت شد تا اتانول کاملاً از داخل ویال‌ها تبخیر شود. پلت RNA در ۲۵ میکرولیتر DEPC-WATER حل شد. نمونه‌های استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه قرار داده شدند. به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer شرکت USA Thermo scientific غلظت سنجی شد. پیش از ساخت cDNA، به منظور حذف آلودگی احتمالی RNA با DNaseI ژنومی، RAN استخراج شده توسط آنزیم DNaseI شرکت Fermentas تیمار شد. براساس دستورالعمل شرکت، مواد، مقادیر و زمان هر کدام از مراحل در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. دستورالعمل حذف آلودگی ژنومی از RNA کل توسط آنزیم DNaseI

مقدار (حجم کل ۱۱ میکرو لیتر)	به ازای
RNA	۱ میکروگرم
10X reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>	۱ میکرو لیتر
DNaseI	۱ میکرو لیتر
DEPC Water	To 10 µl
به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای مورد نیاز برای فعالیت آنزیم DNaseI)	
EDTA 50 Mm	۱ میکرو لیتر
به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (دمای بالا برای غیرفعال کردن آنزیم)	

میکرو لیتر آگارز Oligo Dt (مخلوط A) و حرارت دادن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، افزودن بافر واکنش (حاوی ۱۰ میلی‌مول مخلوط dNTP) ۴ میکرو لیتر، DTT (۸ میلی‌مولار) ۱ میکرو لیتر، آنزیم Diastar RTase، ۱ میکرو لیتر به مخلوط A و در نهایت تنظیم حجم آب عاری از RTase تا حصول ۲۰ میکرو لیتر حجم نهایی. مخلوط به دست آمده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیرفعال کردن آنزیم منتقل شد. پس از به پایان رسیدن واکنش، نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند. با رعایت شرایط زیر برای ژن‌های زیر آگارزهای رفت و برگشتی، به کمک نرم‌افزار (Primer 3) و براساس توالی

برای تأیید عدم خردشدگی RNA پس از تیمار با DNaseI، مقدار ۴۰۰ نانوگرم از RNA های تیمار داده شده با آنزیم، بر روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی شدند. همچنین به منظور کمیت‌سنجی با روش UV اسپکتروفتومتری، نمونه‌ها توسط دستگاه Epoch mi - volume spectrophotometer System شرکت BioTek و همچنین اسپکتروفتومتر نانو طیف‌سنجی شدند. برای ساخت cDNA، نمونه‌هایی براساس کم‌غلظت‌ترین RNAها، رقیق‌سازی شدند، به طوری که مقدار نهایی RNA در واکنش تقریباً ۸۸۰ نانوگرم بود. ساخت cDNA First Standard cDNA با استفاده از کیت Synthesis (ساخت شرکت MXcell RNA) و به این شرح انجام گرفت: مخلوط کردن RNA (۸۸۰ نانوگرم) با یک

کدکننده ژن ها (CDS)، آغازگرهای انتخابی طراحی شد. براساس طول آغازگر، شاخص‌های طراحی آغازگر بین ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید، نقطه ذوب آغازگر بین ۵۸ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد، درصد GC بین ۴۰ تا ۶۰ و طول قطعه قابل

## جدول ۲. طراحی پرایمرهای ژن موردنظر

Gene name	Accession NO	Primers	Sequence from 5, to 3	TM (C <sup>0</sup> )	Amplicon size (bp)
ATF3	NM-012912	Forward	AAAGAAGGAACATTGCAGAGCTAAG	59/82	77
		Revers	TGGAAAAGGAGGATTCAGTAAGGAC	60/28	

بررسی فرض یکنواختی واریانس‌ها انجام شدند. لگاریتم در مبنای ۲ داده‌های بیان محاسبه شد. از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  برای محاسبه میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل استفاده شد. از آزمون فیشرف (F-test) و M-ANOVA با سطح معناداری  $P \leq 0.05$  برای تعیین معناداری فرض صفر استفاده شد. این آزمون برای ارزیابی یکسان یا یکسان نبودن دو جامعه یا چند جامعه به کار می‌رود. در این آزمون واریانس، کل جامعه به عوامل اولیه آن تجزیه می‌شود.

## نتایج

میزان تغییرات قند خون: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات گلوکز خون، پیش و پس از ۱۸ ساعت ناشتایی در جدول ۳ آمده است. داده‌های این جدول نشان داد که نوع تمرین، تفاوتی در تغییرات قند خون قبل و بعد از ناشتایی ایجاد کرده است که این امر بیانگر اهمیت نقش گلوکز، تأثیرات و سازگاری بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و کاردیومیوپاتی است. در پژوهش حاضر نتایج تغییرات قند خون به‌عنوان متغیر مؤثر و بهبودیافته از تمرین نشان داده شده است.

کمیت سنجی بیان ژن در آزمون QRT-PCR به صورت Relative انجام گرفت. نکته بسیار مهم در کمیت سنجی نسبی، ارزیابی میزان بازده PCR است. پس از اندازه‌گیری میزان Ct، برای ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تحت بررسی، کارایی PCR با استفاده از نرم‌افزار (۲۰۰۹) Ruijter et al) LinRegPCR، تعیین شده، سپس با استفاده از برنامه excell میزان نسبت بیان (FC) یا طبق فرمول pfaffl محاسبه شد:

$$FC = Ratio = \frac{(E_{ref})^{Ct_{sample}}}{(E_{target})^{Ct_{sample}}} \div \frac{(E_{ref})^{Ct_{calibrator}}}{(E_{target})^{Ct_{calibrator}}}$$

**تحلیل آماری:** از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جدول‌ها و از برنامه‌های Microsoft Office Excel ویرایش ۲۰۱۰، MSTATC ویرایش ۲۰۱۸، SPSS ویرایش ۲۴ و Graph Pad Prism ویرایش ۸ برای تنظیم نمودارها و انجام محاسبات استفاده شد. پس از به‌دست آمدن نسبت بیان برای ژن‌های مورد مطالعه، به‌منظور بررسی صحت فرض‌های تجزیه و واریانس، آزمون طبیعی بودن توزیع خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون بارتلت برای

## جدول ۳. میزان تغییرات قند خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در گروه‌های پژوهش

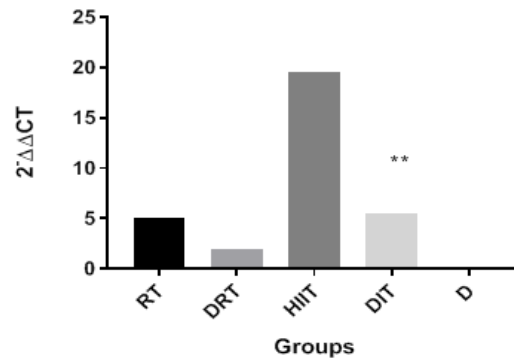
گروه	پیش از ناشتایی	پس از ناشتایی
دیابت	۲۸۳/۵ ± ۳۹/۸۵	۲۱۷/۶ ± ۴۲/۵۳
گروه تمرین HIIT	۱۱۸/۸۲ ± ۱۹/۲۴	۱۰۵/۲۹ ± ۵۲/۳۳
گروه دیابتی و تمرین HIIT	۴۲۳/۵ ± ۱۴۹/۱۱	۳۷۷/۹۲ ± ۱۳۱/۵۵
گروه تمرین مقاومتی	۱۰۴ ± ۱۰/۰۰	۷۸/۰۸ ± ۸/۳۹
گروه دیابتی و تمرین مقاومتی	۴۲۳/۲۳ ± ۱۴۳/۲۶	۳۷۸/۹۲ ± ۱۵۹/۹۰

میزان بیان ژن عامل رونویسی فعال شده<sup>۳</sup>: براساس نتایج پژوهش، بین گروه‌های تمرین مقاومتی فزاینده و تمرین تناوبی شدید، بیان ژن ATF3 گروه تناوبی شدید نسبت به گروه مقاومتی فزاینده افزایش معناداری داشته است ( $P=0/007$ ). بین گروه‌های دیابت-مقاومتی فزاینده و دیابت-تناوبی شدید افزایش معناداری مشاهده نشد ( $P=0/03$ ). در گروه دیابت و دیابت-تناوبی شدید، افزایش معنادار بیان ژن ATF3 در گروه دیابت-تناوبی شدید مشاهده شد ( $P<0/001$ ). بین دو گروه تناوبی شدید و دیابت-تناوبی شدید، میزان بیان ژن ATF3 در گروه تناوبی شدید افزایش بیشتری نسبت به گروه دیابت - تناوبی شدید داشته است ( $P=0/004$ ). بین گروه‌های دیابت و دیابت-مقاومتی فزاینده، افزایش معنادار بیان ژن ATF3 در گروه دیابت تمرین مقاومتی فزاینده نسبت به گروه دیابت مشاهده شد ( $P=0/001$ ). بین گروه‌های مقاومتی فزاینده و دیابت - مقاومتی فزاینده افزایش چشمگیر و معنادار بیان ژن ATF3 در گروه مقاومتی فزاینده نسبت به گروه دیابت-مقاومتی فزاینده وجود دارد ( $P<0/001$ ) (شکل ۱).

که رژیم غذایی پرچرب داشتند و میزان عوامل ATF3 در بدن آنها کاهش داده شده بود، عوامل التهابی و آپوپتوزی (مانند اینترلوکین ۶ و  $TNF-\alpha$ ) بیشتری در سرم آنها یافت شد. همچنین میزان فیبروز قلبی، انسولین و گلوکز سرمی آنها بیشتر از سایر گروه‌ها بود که پژوهش حاضر تنها از این نظر با این مطالعه همسوست (۱۶). هنگ لین و همکاران (۲۰۱۴) نیز با القای سکتة قلبی و حذف ژن ATF3 در گروهی از موش‌های صحرایی به بررسی تغییرات به وجود آمده پرداختند. در موش‌های صحرایی سکتة‌ای که ATF3 حذف شده بود، میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ و در نتیجه آن میزان آپوپتوز بیشتری مشاهده شد (۶). ATF3 به‌عنوان یک حسگر بحرانی استرس متابولیکی مرتبط با دیابت نوع ۲ در سلول‌های قلبی است و وجود آن برای محافظت قلب در برابر تغییر شکل قلبی ناشی از دیابت نوع ۲ و اختلال آن ضروری است، زیرا حساسیت انسولین محیطی را کنترل می‌کند (۱۷). پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که ATF3 سازگاری قلبی به انواع مختلف استرس را تنظیم و عملکردهای سازگارانه و ناسازگارانه را اعمال می‌کند. کمبود ATF3، هایپرتروفی عضله قلب، فیبروزیس و اختلال قلبی در پاسخ به گروه‌های آنورتی را توسعه می‌دهد (۱۸). افزون بر این مطالعات روی موش‌های صحرایی نشان می‌دهد، فعالیت طولانی‌مدت ATF3، تأثیرات مضر دارد. بیان بیش از حد ATF3 هایپرتروفی عضله قلب، فیبروز، اختلال قلبی و هدایت غیرطبیعی را توسعه می‌دهد. پاسخ‌های سازگارانه یا غیرسازگارانه واسطه‌شده توسط ATF3 به شرایط استرس بستگی دارد. سطح و مدت فعالیت برای تعیین اینکه آیا عوامل رونویسی مفید است یا مضر، مهم و بحرانی است (۱۹). ATF3 می‌تواند در پاسخ به سندروم متابولیک فعال شود (۶). ATF3 می‌تواند به‌طور موقتی پیام‌رسانی مسیر اسیدهای چرب اشباع‌نشده /  $TLR4/NFKB$  در آزمودنی‌های چاق را سرکوب کرده و از فعال شدن  $TNF-\alpha$  جلوگیری کند (۱۹). کالفون و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند ATF3 افزون بر تأثیرات مفید در محافظت از قلب، در کنترل حساسیت انسولینی یا ارگان‌های محیطی نیز نقش دارد (۲۰). ATF3 نیز بر هایپرتروفی از طریق محدود کردن مسیر  $ERK1/2$  و  $JNK$  اثرگذار است. در نهایت، ATF3 با دخالت بر پیام‌رسانی  $NFKB$  را سرکوب می‌کند. عدم فعالیت ژنتیکی  $NFKB$  قادر به جلوگیری

میزان بیان ژن عامل رونویسی فعال شده<sup>۳</sup>: براساس نتایج پژوهش، بین گروه‌های تمرین مقاومتی فزاینده و تمرین تناوبی شدید، بیان ژن ATF3 گروه تناوبی شدید نسبت به گروه مقاومتی فزاینده افزایش معناداری داشته است ( $P=0/007$ ). بین گروه‌های دیابت-مقاومتی فزاینده و دیابت-تناوبی شدید افزایش معناداری مشاهده نشد ( $P=0/03$ ). در گروه دیابت و دیابت-تناوبی شدید، افزایش معنادار بیان ژن ATF3 در گروه دیابت-تناوبی شدید مشاهده شد ( $P<0/001$ ). بین دو گروه تناوبی شدید و دیابت-تناوبی شدید، میزان بیان ژن ATF3 در گروه تناوبی شدید افزایش بیشتری نسبت به گروه دیابت - تناوبی شدید داشته است ( $P=0/004$ ). بین گروه‌های دیابت و دیابت-مقاومتی فزاینده، افزایش معنادار بیان ژن ATF3 در گروه دیابت تمرین مقاومتی فزاینده نسبت به گروه دیابت مشاهده شد ( $P=0/001$ ). بین گروه‌های مقاومتی فزاینده و دیابت - مقاومتی فزاینده افزایش چشمگیر و معنادار بیان ژن ATF3 در گروه مقاومتی فزاینده نسبت به گروه دیابت-مقاومتی فزاینده وجود دارد ( $P<0/001$ ) (شکل ۱).

ATF3 Gene Expression Levels



شکل ۱. تغییرات بیان ژن ATF3 بین گروه‌های دیابت (D)، گروه دیابت - مقاومتی فزاینده (DRT)، گروه مقاومتی فزاینده (RT)، گروه دیابت-تناوبی شدید (DIT)، گروه تناوبی شدید (HIIT)

### بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثر تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر بیان ژن ATF3 عضله قلبی موش‌های صحرایی دیابتی نر به اجرا درآمد. روی کالفون و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر یک دوره ۱۵ هفته‌ای رژیم غذایی پرچرب را بر بیان ژن ATF3 موش‌های صحرایی دیابتی شده نشان دادند. در این پژوهش موش‌هایی



آزمودنی‌ها، پیشنهاد می‌شود با مطالعه‌ی ژن‌های بیشتر در آبشار پیام‌رسانی و تعمیم پژوهش روی نمونه‌های انسانی این محدودیت‌ها برطرف شوند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله‌ی دکتری با موضوع بررسی اثر یک دوره تمرین مقاومتی فزاینده و تناوبی شدید بر تغییرات سرمی پروتئین  $\text{TNF-}\alpha$  و بیان ژن  $\text{TLR4}$  عضله قلبی موش‌های صحرایی دیابتی چاق نر است که تحت حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه خوارزمی قرار گرفت. پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی و سپاس خود را بیان کنند.

### بی‌نوشت‌ها

- 1 Activated Transcription Factor 3
- 2 Basic Leucine Zipper
- 3 Cyclic AMP response element
- 4 One-Repetition Maximum
- 5 Livak
- 6 Trisol
- 7 Fisher
- 8 Extracellular signal-regulated kinases

### منابع

1. Demmer RT, Allison MA, Cai J, Kaplan RC, Desai AA, Hurwitz BE, et al. Association of Impaired Glucose Regulation and Insulin Resistance With Cardiac Structure and Function. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation: Cardiovascular Imaging.* 2016;9(10):e005032.
2. Brownrigg JR, Hughes CO, Burleigh D, Karthikesalingam A, Patterson BO, Holt PJ, et al. Microvascular disease and risk of cardiovascular events among individuals with type 2 diabetes: a population-level cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* 2016;4(7):588-97.
3. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia.* 2014;57(4):660-71.
4. Hölscher ME, Bode C, Bugger H. Diabetic Cardiomyopathy: Does the Type of Diabetes Matter? *International Journal of Molecular Sciences.* 2016;17(12):2136.
5. Ghigo A, Frati G, Sciarretta S. A novel protective role for activating transcription factor 3 in the cardiac response to metabolic stress. *The Oxford University Press;* 2017.
6. Lin H, Li H-F, Chen H-H, Lai P-F, Juan S-H, Chen J-J, et al. ATF3 Protects Against Pressure

از کاردیومیوپاتی دیابتی است (۱۸). مایکل و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تأثیرات فعالیت بدنی حاد بر بیان ژن قلب پرداختند. نتایج نشان داد همان ۳۰ دقیقه تمرین شنای حاد سبب افزایش ATF3 شد (۲۱). این پژوهش نشان داد که تمرین تناوبی شدید در مقایسه با تمرین مقاومتی فزاینده سازوکارهای سلولی مولکولی مختلف را به طور مؤثرتری فعال می‌کند و موجب کاهش چشمگیر تأثیرات منفی ناشی از بیماری دیابت بر دستگاه قلبی-عروقی می‌شود. با توجه به داده‌های به دست آمده بین گروه‌های دیابت و دیابت-تناوبی شدید افزایش معنادار بیان ATF3 در دیابت-تناوبی شدید نسبت به دیابت مشاهده شد که این امر می‌تواند تأثیر انجام تمرین تناوبی شدید بر گروه دیابت-تناوبی شدید را نشان دهد. از طرفی با مقایسه دو گروه تناوبی شدید و دیابت-تناوبی شدید می‌توان اثر مثبت و منفی تمرین تناوبی شدید و بیماری دیابت بر بیان ژن ATF3 را درک کرد که این نیز می‌تواند شاهی بر تأثیر احتمالی تمرین تناوبی شدید بر کاهش تأثیرات و عوامل التهابی، آپوپتوزی دیابت و همچنین افزایش عوامل محافظتی و ضدآپوپتوزی آن باشد. بین دو گروه دیابت و دیابت-مقاومتی فزاینده افزایش معنادار بیان ATF3 در دیابت-مقاومتی فزاینده نسبت به دیابت وجود داشت که اثرگذاری تمرین مقاومتی را از سمتی دیگر بر کاهش عوامل التهابی ذکر شده متعاقب تمرین تناوبی، تأیید می‌کند. با بررسی تغییرات گلوکز خون، پیش و پس از ۱۸ ساعت ناشتایی مشاهده شد که شیوه تمرینی در تغییرات قند خون پیش و پس از ناشتایی تفاوت ایجاد می‌کند که این امر بیانگر اهمیت نقش گلوکز، تأثیرات و سازگاری بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و کاردیومیوپاتی است. با توجه به توضیحات بالا می‌توان سازوکارهای احتمالی اثر معنادار تمرین HIIT و تمرین مقاومتی بر بیان ژن ATF3 را بیان کرد. بیماری دیابت به اختلال عملکرد قلب منجر می‌شود. عامل ATF3 به عنوان یک عامل محافظتی که در شرایط فشار متابولیک، اکسایشی و التهابی دیابت فعال می‌شود، می‌تواند تأثیرات تخریبی این بیماری را کنترل کند. از طرفی با توجه به نتایج این پژوهش انجام تمرینات تناوبی شدید در مقایسه با مقاومتی فزاینده اثرگذاری بیشتری بر بیان ژن ATF3 را نشان داد. با توجه به تأثیر احتمالی ماده بی‌هوشی بر نمونه‌ها و متعاقب آن عدم نمونه برداری همزمان از بافت تمام

15. Ali Gaeini A, Khaledi N, Fayazmilani R, Ravasi A, Sedghroohi G, Arabkari V. Changes in ACTN3 gene expression and fiber type composition in flexor hallucis longus muscle after eight weeks progressive resistance training in Sprague-Dawley rats. *Tehran University Medical Journal*. 2013;71(1).
16. Kalfon R, Koren L, Aviram S, Schwartz O, Hai T, Aronheim A. ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance. *Cardiovascular Research*. 2016;cvw228.
17. Feng J, Sun Q, Wu T, Lu J, Qu L, Sun Y, et al. Upregulation of ATF-3 is correlated with prognosis and proliferation of laryngeal cancer by regulating Cyclin D1 expression. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(10):2064.
18. Ghigo A, Frati G, Sciarretta S. A novel protective role for activating transcription factor 3 in the cardiac response to metabolic stress. *Oxford University Press*; 2016.
19. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, et al. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circulation research*. 2009;105(1):25-32.
20. Kalfon R, Koren L, Aviram S, Schwartz O, Hai T, Aronheim A. ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance. *Cardiovascular research*. 2016;113(2):134-46.
21. Simonsen ML, Alessio HM, White P, Newsom DL, Hagerman AE. Acute physical activity effects on cardiac gene expression. *Experimental physiology*. 2010;95(11):1071-80.
- Overload Heart Failure Via Autophagy Molecule Beclin-1 Pathway. *Molecular pharmacology*. 2014;mol. 113.090092.
7. Zmuda EJ, Qi L, Zhu MX, Mirmira RG, Montminy MR, Hai T. The roles of ATF3, an adaptive-response gene, in high-fat-diet-induced diabetes and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Molecular Endocrinology*. 2010;24(7):1423-33.
8. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadriatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PloS one*. 2015;10(3):e0121138.
9. Goodwin ML. Blood glucose regulation during prolonged, submaximal, continuous exercise: a guide for clinicians. *Journal of diabetes science and technology*. 2010;4(3):694-705.
10. Suh S-H, Paik I-Y, Jacobs K. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged. *Mol cells*. 2007;23:272-9.
11. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;92:163-73.
12. Chrysohoou C, Tsitsinakis G, Vogiatzis I, Cherouveim E, Antoniou C, Tsiantilas A, et al. High intensity, interval exercise improves quality of life of patients with chronic heart failure: a randomized controlled trial. *QJM*. 2014;107(1):25-32.
13. Cañaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, Walsmith J, Foldvari M, et al. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2002;25(12):2335-41.
14. Songstad NT KK-H, Hafstad AD, Basnet P, Ytrehus K, Acharya G. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. *PloS one*. 2015;10(11).