

## Effect of high intensity interval training on cardiomyocytes HSP70 and Caspase-3 gene expression levels in myocardial infarction male rat model

Jabraeel Pouzesh Jadidi<sup>1</sup>, Farnaz Seifi-Skishahr<sup>2</sup>, Lotfali Bolboli<sup>2</sup>, Ameneh Pourrahim Ghoroughchi<sup>3</sup>

Receive 2021 November 16; Accepted 2022 January 11

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effect of high intensity interval training on cardiomyocytes HSP70 and Caspase-3 gene expression levels in myocardial infarction (MI) male rat model.

**Methods:** Thirty male Wistar rats (age: 16 wks, weight: 200 to 250 grams) were randomly divided into three groups of healthy control, MI control and MI training following induction of MI (verified by CK, LDH and CTnI as cardiac injury indices) via intraperitoneal injection of isoproterenol (100 mg/kg.day) within two consecutive days. HIIT was included on eight weeks (5 sessions per week), each session was consisted of 10 bouts of running occasions (each for 4 min) at 85 - 90% of vVo2max with 2 min rest intervals at 50 to 60% of vVO2max. The gene expression levels of HSP70 and Caspase-3 were evaluated using Real-Time PCR method and the data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey post hoc test at the significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** Cardiomyocytes HSP70 expression levels was lower in MI control than healthy control counterparts ( $p=0.001$ ); However, in the HIIT group the expression levels of HSP70 and caspase-3 genes were respectively higher and lower compared to both of healthy control and MI control groups ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$  respectively).

**Conclusions:** It seems that HIIT could be efficient for inhibition of MI induced cardiac apoptosis. However further research is needed in this area because of study limitations and lack of similar evidence.

**Keywords:** High Intensity Interval Training, HSP70, Myocardial Infarction, Caspase-3



Scan this QR code to see the accompanying video, or visit [jahssp.azaruniv.ac.ir](http://jahssp.azaruniv.ac.ir)

1. PhD Student of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Assistant Professor of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Corresponding Author):  
Email: [f.seify@uma.ac.ir](mailto:f.seify@uma.ac.ir)

3. Associate Professor of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

*Cite as:* Jabraeel Pouzesh Jadidi, Farnaz Seifi-Skishahr, Lotfali Bolboli, Ameneh Pourrahim Ghoroughchi. Effect of high intensity interval training on cardiomyocytes HSP70 and Caspase-3 gene expression levels in myocardial infarction male rat model. Applied Health Studies in Sport Physiology. 2022; 9(2): 1-11.

**Owner and Publisher:** Azarbaijan Shahid Madani University

**Journal ISSN (online):** 2676-6507

**Access Type:** Open Access

**DOI:** 10.22049/JAHSSP.2021.27521.1407

**DOR:** 20.1001.1.26766507.1401.9.2.1.4



## Extended abstract

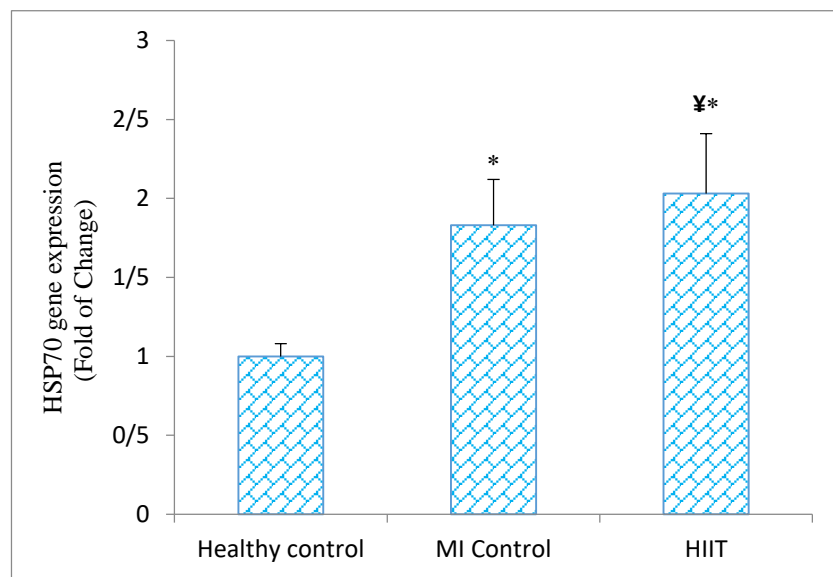
### Background

Myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury is a common and complicated pathophysiological phenomenon that leads to arrhythmias, myocardial stunning, and heart failure (1). Recent studies have investigated cardioprotective therapies in the animal models of I/R-induced myocardial injury (2, 3). Despite recent progress, preventing and treating myocardial I/R injury remains an unsolved problem in the clinical settings. The 70 kDa heat shock protein (Hsp70), a member of the HSP family, is a highly conserved protein widely expressed in all living organisms. Hsp70 plays an important role in protecting cellular homeostasis from stress via its molecular chaperone functions. Indeed, intracellular and extracellular HSP70 play different roles in regulating cardiac regeneration. Extracellular HSP70 released from the injured heart can act as a damage-associated molecular pattern (DAMP) to stimulate myocardial inflammation, thus, it is a potential therapeutic target in the treatment of cardiac hypertrophy and fibrosis. Also, it has been reported that increasing its expression can prevent apoptotic cell death (4). In this regard, the expression of cardiac HSP70 and caspase-3 gene in response to exercise training has been investigated in some studies. One study showed that HSP70 increased after 12 weeks of intense interval training. Also, a study showed that 8 weeks of HIIT training reduces the expression of caspase-3. In a study, performing aerobic exercises increased cardiac Hsp70 in mice. However, in another study, researchers saw a decrease in circulating Hsp70 after 12 weeks of resistance training. Liu et al also reported that no significant change in Hsp70 levels and recovery was observed after intense training in professional rowers (5). However, the exact role and mechanism of HSP70 in the development of AMI is controversial and largely unknown. Therefore, aim of this study was to investigate the effect of high intensity interval training on cardiomyocytes HSP70 and Caspase-3 gene expression levels in myocardial infarction (MI) male rat model.

**Materials and Methods:** Thirty male Wistar rats (age: 16 wks, weight: 200 to 250 grams) were randomly divided into three groups of healthy control, MI control and MI training following induction of MI (verified by CK, LDH and CTnI as cardiac injury indices) via intraperitoneal injection of isoproterenol (100 mg/kg.day) within two consecutive days. HIIT was included on eight weeks (5 sessions per week), each session was consisted of 10 bouts of running occasions (each for 4 min) at 85 - 90% of  $v\text{Vo}_2\text{max}$  with 2 min rest intervals at 50 to 60% of  $v\text{VO}_2\text{max}$ . The gene expression levels of HSP70 and Caspase-3 were evaluated using Real-Time PCR method and the data were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey post hoc test at the significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** Cardiomyocytes HSP70 expression levels was lower in MI control than healthy control counterparts ( $p=0.001$ ); However, in the HIIT group the expression levels of HSP70 and caspase-3 genes were respectively higher and lower compared to both of healthy control and MI control groups ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$  respectively).





**Fig 1.** Cardiomyocytes HSP70 Expression

\*, ¥: P<0.05 versus Healthy control and MI control groups respectively

**Conclusions:** It seems that HIIT could be efficient for inhibition of MI induced cardiac apoptosis. However further research is needed in this area because of study limitations and lack of similar evidence.

**Keywords:** High Intensity Interval Training, HSP70, Myocardial Infarction, Caspase-3

## مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال نهم، شماره دوم؛

پاییز و زمستان ۱۴۰۱؛ صفحات ۱-۱۱

Open Access

مقاله پژوهشی

## تاثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن پروتئین شوک گرمایی ۷۰ و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر مدل سکته قلبی

جبریل پوزش جدیدی<sup>۱</sup>، فرناز سیفی\*<sup>۲</sup>، لطفعلی بلبلی<sup>۳</sup>، آمنه پوررحیم<sup>۲</sup>  
 تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱

## چکیده

**هدف:** هدف پژوهش بررسی تاثیر تمرین هوازی تناوبی شدید بر بیان ژن پروتئین شوک گرمایی ۷۰ و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر مدل سکته قلبی بود. **روش شناسی:** تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر ۱۶ هفته‌ای با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم نژاد ویستار با تزریق درون صفاقی ایزوپروتونول (با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی) دچار آنفارکتوس میوکارد (تایید از طریق شاخص‌های آسیب قلبی: CK، LDH و CTnI) شدند و به طور تصادفی در سه گروه (۱۰ سر موش در هر گروه) کنترل سالم، کنترل سکته، سکته + تمرین (HIIT+MI) تقسیم شدند. تمرین HIIT به مدت ۸ هفته (۵ روز در هفته) شامل ۶۰ دقیقه دویدن تناوبی (۴ دقیقه دویدن با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO2max و ۲ دقیقه ریکاوری فعال با شدت ۶۰-۵۰ درصد) انجام شد. بیان ژن‌های HSP70 و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌ها با استفاده از روش Real-Time PCR انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  تحلیل شدند. **یافته‌ها:** بیان HSP70 کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های کنترل مدل MI (سکته کنترل) نسبت به گروه سالم کنترل کمتر بود ( $p=0.001$ )؛ با این حال، بیان HSP70 در گروه تمرین HIIT به طور معنی‌داری بیشتر از گروه سکته کنترل و کنترل سالم بود (به ترتیب  $p=0.001$ ،  $p=0.001$ ). همچنین، بیان کاسپاز ۳ در گروه تمرین HIIT به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های کنترل سالم و کنترل سکته بود (به ترتیب  $p=0.001$ ،  $p=0.001$ ). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید در مهار آپوپتوز قلبی ناشی ناشی از سکته موثر باشد. اما، به دلیل محدودیت‌های تحقیق و کمبود شواهد، هنوز نیاز به تحقیقات بیشتر باقی است.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی شدید، پروتئین شوک گرمایی ۷۰، سکته قلبی، کاسپاز ۳



با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت [www.jahssp.azaruniv.ac.ir/](http://www.jahssp.azaruniv.ac.ir/) مشاهده کنید.

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، اردبیل، ایران
۲. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.  
 Email: (نویسنده مسئول): f.seify@uma.ac.ir
۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

**نحوه ارجاع:** جبریل پوزش جدیدی، فرناز سیفی، لطفعلی بلبلی، آمنه پور رحیم. "تاثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن پروتئین شوک گرمایی ۷۰ و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر مدل سکته قلبی". مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش. ۱۴۰۱؛ ۹(۲): ۱-۱۱.

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

شاپای الکترونیکی: ۶۵۰۷-۲۶۷۶

نوع دسترسی: آزاد

DOI: 10.22049/JAHSSP.2021.27521.1407

DOR: 20.1001.1.26766507.1401.9.2.1.4



Copyright ©The authors

Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

به کاهش آپوپتوز سلول کمک کند (۱۳، ۱۴). علاوه بر این، Hsp70 به طور مستقیم در مسیرهای آپوپتوز برای محافظت از سلول‌ها نقش دارد (۱۵-۱۷). مکانیسم‌های حفاظتی متنوع Hsp70 به عنوان مقاومت در برابر برخی از اشکال مرگ سلولی ناشی از استرس شناخته شده است (۱۵). چندین پروتئین پرو آپوپتوتیک که مستقیماً توسط Hsp70 مهار می‌شوند گزارش شده است. فاکتور ۱ فعال کننده پروتاز آپوپتوز (Apaf-1)، یک جزء تنظیمی کلیدی مسیر آپوپتوز وابسته به کاسپاز می‌باشد که مستقیماً با Hsp70 در ارتباط است (۱۶، ۱۸، ۱۹). این برهمکنش از الیگومریزاسیون Apaf-1 با پروکاسپاز-۹ جلوگیری می‌کند و در نتیجه تشکیل آپوپتوزوم را مهار می‌کند (۲۰). همچنین گزارش شده است HSP70 از فعال شدن کاسپاز-۳ و SAPK/JNK در شوک گرمایی یا آپوپتوز ناشی از سرامید جلوگیری می‌کند (۲۱). همچنین، HSP70 در تمام مراحل پیشرفت پاتوفیزیولوژیک HF شرکت می‌کند و ممکن است به عنوان یک نشانگر بالینی برای تشخیص زودهنگام عمل کند (۲۲).

در این راستا، بیان ژن HSP70 و کاسپاز-۳ قلبی در پاسخ به تمرینات ورزشی در برخی مطالعات بررسی شده است. یک مطالعه نشان داد HSP70 پس از ۱۲ هفته تمرین تناوبی شدید افزایش یافت (۲۳). همچنین، مطالعه‌ای نشان داد ۸ هفته تمرین HIIT موجب کاهش بیان کاسپاز-۳ می‌شود (۲۴). در تحقیقی انجام تمرینات هوازی سبب افزایش Hsp70 قلبی موش‌ها شد (۲۵). لیکن محققان در پژوهشی دیگر پس از ۱۲ هفته تمرین مقاومتی شاهد کاهش Hsp70 گردش خون بودند (۲۶). لیو و همکاران هم گزارش کردند به دنبال تمرینات شدید در قایقرانان حرفه‌ای تغییر معنی‌داری در سطوح Hsp70 و ریکآوری بعد از آن مشاهده نگردید (۵). والش و همکاران (2001) نشان دادند تمرین ورزشی می‌تواند باعث رهاسازی HSP70 به گردش خون محیطی شود (۲۷). از سویی، گزارش شده است تأثیر شدت تمرین ورزشی نسبت به مدت آن در رهاسازی HSP70 موثرتر می‌باشد (۵).

از سویی، امروزه به خوبی روشن است که فعالیت ورزشی منظم دارای اثرات مثبتی بر اکثر سیستم‌های بدن و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن مانند دیابت نوع دو، سرطان و بیماری‌های قلبی - عروقی می‌باشد. این مهم موجب تجویز تمرینات ورزشی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی گردیده است (۲۸، ۲۹). به علاوه، تمرینات تناوبی شدید (HIIT) به دلیل دارا بودن فواصل استراحت مناسب، توجه زیادی به خود جلب کرده‌اند و حجم کمتر و بهره‌وری زمانی بهتر این تمرینات سبب شده است که چه در درمان‌های بالینی و چه در برنامه‌های بازتوانی قلبی، به تمرینات تداومی سنتی ترجیح داده شوند (۳۰). البته در برخی تحقیقات، تمرینات HIIT خیلی زودهنگام و فقط یک روز بعد از القای سکنه قلبی در موش‌ها شروع شده است که بدون افزایش مرگ و میر

## مقدمه

آسیب ایسکمی/خون‌رسانی مجدد میوکارد (I/R) یک پدیده پاتوفیزیولوژیک شایع و پیچیده است که منجر به آریتمی، آسیب میوکارد و نارسای قلبی می‌شود (۱، ۲). مطالعات اخیر رویکردهای متعدد درمانی محافظ قلبی را در مدل‌های حیوانی آسیب میوکارد ناشی از I/R بررسی کرده‌اند (۳، ۶). با وجود پیشرفت اخیر، پیشگیری و درمان آسیب I/R میوکارد یک مشکل حل نشده در مطالعات بالینی باقی مانده است. پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتون (Hsp70)، عضوی از خانواده HSP، یک پروتئین بسیار حفاظت شده می‌باشد که نقش مهمی در محافظت از هموستاز سلولی در برابر استرس از طریق عملکرد مولکولی چارپونی دارد (۱). بیان HSP70 به طور چشمگیری در پاسخ به انواع محرک‌های استرس از جمله ایسکمی، هایپرترمی، استرس اکسیداتیو و التهاب افزایش می‌یابد (۷). افزایش سطح سرمی HSP70 در بیماران مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد گزارش شده است و با کسر جهشی بطن چپ (LV) همبستگی منفی دارد (۸). در واقع، HSP70 درون سلولی و خارج سلولی نقش‌های متفاوتی در تنظیم بازسازی قلب ایفا می‌کند. HSP70 خارج سلولی که از قلب آسیب دیده آزاد می‌شود، می‌تواند به عنوان یک الگوی مولکولی مرتبط با آسیب (DAMP) برای تحریک التهاب میوکارد عمل کند، بنابراین، یک هدف درمانی بالقوه در درمان هیپرتروفی و فیبروز قلب می‌باشد. همچنین، گزارش شده است افزایش بیان آن می‌تواند مانع مرگ سلولی آپوپتوزی شود (۴). با این حال، نقش و مکانیسم دقیق HSP70 در ایجاد AMI بحث برانگیز و تا حد زیادی ناشناخته است.

مطالعات قلبی نشان داده‌اند که سطح گردش خون HSP70 با شروع AMI افزایش یافته و در ۴ ساعت به اوج خود رسیده و به تدریج در چند روز آینده کاهش می‌یابد (۹). در حالی که دیدال و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که HSP70 در بیماران مبتلا به AMI بیشتر از آنزین است و با cTnT همبستگی مثبت دارد (۱۰). بوشاتون و همکاران نشان دادند که HSP70 با حوادث نامطلوب قلبی و پیش‌آگهی وضعیت بدتر MI در ۱۸ ماهگی پس از سکنه قلبی ارتباط بسیار نزدیکی دارد و ممکن است این موضوع در درازمدت دلیل مضر بودن HSP70 باشد. بنابراین، اینکه آیا HSP70 ممکن است یک معیار در مراحل اولیه MI یا یک اختلال در پیش‌آگهی طولانی مدت باشد، نیازمند بررسی بیشتر است. با این حال، سطوح HSP70 ممکن است به تشخیص درد حاد قفسه سینه کمک کند (۱۱).

در این راستا، پنگ و همکاران نشان دادند که Hsp70 در سیگنال‌دهی بقای سلول در طول استرس اکسیداتیو و آسیب I/R کاردیومیوسیت‌های موش صحرایی نقش دارد (۱۲). مطالعات دیگر نشان دادند که بیان Hsp70 در آسیب میوکارد ناشی از I/R افزایش می‌یابد، که احتمال دارد

متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درجه مرحله گرم کردن را سپری کرد. سپس آزمون فزاینده ورزشی آغاز شد که در آن شیب نوارگردان ثابت و ۲۵ درجه بود و هر دو دقیقه، سرعت نوارگردان ۰/۰۳ متر بر ثانیه (حدود ۲-۱/۸ متر بر دقیقه) افزایش یافت تا زمانی که موش صحرایی قادر به ادامه فعالیت ورزشی نباشد (ملاک ۳ بار افتادن روی شوک یا خروج از نوار نوارگردان بود). سرعت رسیدن به واماندگی عنوان سرعت  $v_{O2}$  peak ثبت شد (۳۴).

پروتکل HIIT مورد استفاده در این پژوهش، به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان اجرا شد، به گونه ای که در هر جلسه ۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵ - ۹۰ درصد  $v_{O2max}$  و با دوره‌های استراحتی فعال دو دقیقه‌ای با شدت ۵۰ - ۶۰ درصد  $v_{O2max}$  بود که اجرا گردید. شدت تمرین به صورت پیش‌رونده تا هفته هشتم (با تغییر سرعت نوارگردان به میزان ۰/۰۲ متر بر ثانیه) افزایش یافت، اما شیب نوارگردان در تمام طول دوره تمرینی بدون تغییر (صفر) باقی ماند (۳۵). در هر جلسه قبل از شروع فاز تمرین اصلی، به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۵ متر در دقیقه، گرم کردن انجام شد.

حیوانات با کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین (۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش و سپس کشته شدند و قلب آن‌ها پس از تزریق سالیین سرد، از خون پاکسازی و توزین گردید. در ادامه، بطن چپ جداسازی و با فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و برای آنالیز بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفت.

مقدار بیان ژن‌های HSP70 و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های ساخت شرکت سانتاکروز (Santa Cruz Biotechnology, CA) به روش وسترن بلات انجام شد. چگالی باندها، با استفاده از نرم‌افزار Image J ساخت مریلند آمریکا تعیین گردید و بر حسب مقدار بتا اکتین، نرمال سازی شد.

**روش آماری:** برای استخراج نتایج، ابتدا از طبیعی بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون شاپیرو - ویلک اطمینان حاصل شد. در بخش آمار توصیفی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. در ادامه، برای مقایسه بین گروهی داده‌ها، از روش تحلیل واریانس تک راهه انجام شد، در ادامه برای مقایسه دو به دو گروه‌ها، از آزمون تعقیبی توکی و یا جیمز هاول (بسته به نتایج آزمون لون) بهره برداری گردید. در تمام آزمون‌ها، سطح اطمینان آماری برابر با ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

با کاهش قابل ملاحظه وسعت ناحیه دچار سکتته و افزایش آنژیوژنیزس<sup>۳</sup> در ناحیه مجاور بخش سکتته کرده همراه بوده است (۳۱). در یک تحقیق دیگر نیز تاثیر محافظتی زود هنگام تمرین HIIT بر ساختار و عملکرد قلب به دنبال یک هفته پس از سکتته تایید شده است (۳۰) که حاکی از ایمن بودن این نوع تمرینات برای موش‌های مدل سکتته قلبی می‌باشد. از سوی دیگر، در حالی که در یک مطالعه تمرینات HIIT در بیماران نارسایی قلبی به طور قابل توجهی اوج حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_{2peak}$ ) و اختلال عملکرد دیاستولیک بطن چپ را بهبود بخشید (۳۲)، در مطالعه دیگری تاثیر تمرینات HIIT در تغییر بازسازی LV و ظرفیت هوازی تایید نشده است (۳۰) که حاکی از وجود ناهمسانی در این زمینه می‌باشد و عموماً دال بر محدود بودن و شناخت ناکافی (موجود) از مکانیسم‌های زیربنایی تمرین HIIT بر ساختار و عملکرد قلب می‌باشد (۳۳). با این حال، مطالعاتی بسیار محدودی در این زمینه صورت گرفته که نیازمند تحقیق بیشتری می‌باشد؛ بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به تناقض ادبیات تحقیق (۵، ۲۳-۲۵) این موضوع ضمن دارا بودن نوآوری، می‌تواند زمینه ساز انجام تحقیقات بیشتر آینده با هدف شناسایی بهترین جزئیات مربوط به تمرینات HIIT باشد. بدین ترتیب، هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن پروتئین شوک گرمایی ۷۰ و کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر مدل سکتته قلبی بود.

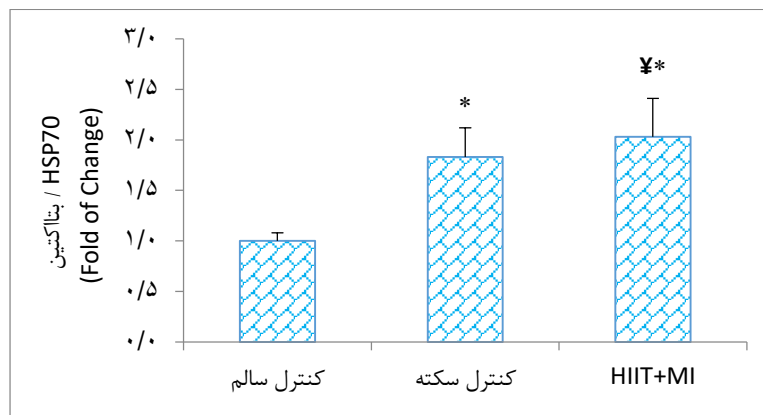
### روش پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تبریز با شناسه اخلاق IR.TABRIZU.REC.1399.054 مصوب و اجرا گردید. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۶ هفته‌ای با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مرکز انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. در مدت اجرای مداخله-های تمرینی و جراحی، تعداد سه سر موش صحرایی در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و بسته‌های غذایی و طبق چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری نگاه‌داری شدند. موش‌ها ابتدا تحت تزریق ایزوپروتونول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی در طی دو روز متوالی قرار گرفتند و دو هفته بعد از تزریق، بروز انفارکتوس میوکارد در موش‌ها تایید شد. بدین منظور از ارزیابی شاخص‌های زیستی قلبی کراتین کیناز-MB (CK-MB)، تروپونین I قلبی (CTnI) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) با روش اسپکتروفتومتری و کیت‌های تشخیصی مربوطه استفاده شد. سپس، موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل سالم، کنترل سکتته و HIIT تقسیم شدند.

ابتدا آزمون ظرفیت ورزشی برای برآورد  $VO_{2max}$  انجام شد. بدین منظور، هر موش صحرایی ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰

جدول ۱. پروتکل تمرین تناوبی شدید (HIIT)

هفته	مدت گرم کردن (دقیقه)	تعداد تکرار	نسبت کار به استراحت	شدت فعالیت زمان تمرین (VO2max)	سرعت نوارگردان (m/min)	شدت فعالیت زمان استراحت (VO2max)	سرعت نوارگردان (m/min)	مدت سرد کردن	مدت کل
اول	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۱۷	۵۰-۶۰	۸	۵	۶۰
دوم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۱۸	۵۰-۶۰	۹	۵	۶۰
سوم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۱۹	۵۰-۶۰	۹	۵	۶۰
چهارم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۲۰	۵۰-۶۰	۱۰	۵	۶۰
پنجم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۲۱	۵۰-۶۰	۱۰	۵	۶۰
ششم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۲۲	۵۰-۶۰	۱۱	۵	۶۰
هفتم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۲۳	۵۰-۶۰	۱۱	۵	۶۰
هشتم	۱۰	۱۰	۴:۲	۹۰-۸۵	۲۴	۵۰-۶۰	۱۲	۵	۶۰



شکل ۱. مقایسه بیان ژن HSP70 کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرائی پس از مداخله

\*: نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم در سطح  $p=0/001$

\*\* : نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سگته در سطح  $p=0/001$

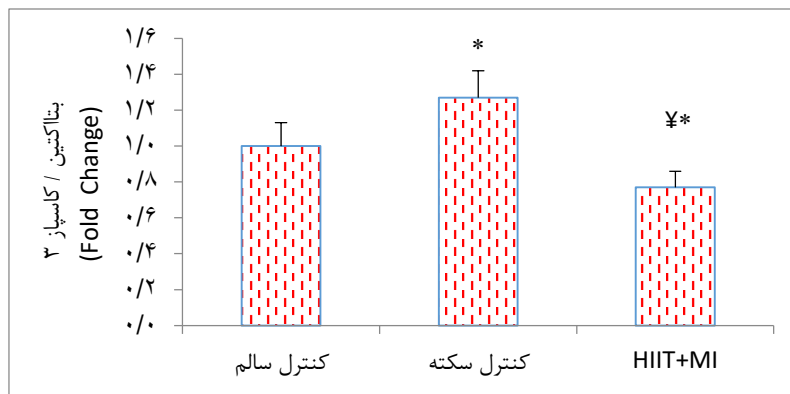
تفاوت کاردیومیوسیت‌ها نشان داد که تفاوت

های معنی‌داری در بین گروه‌ها وجود دارد (شکل‌های ۱ تا ۲).

یافته‌ها

نتایج تحلیل واریانس تک‌راهه در مورد مقایسه بین گروهی مقدار بیان

HSP70 ( $F_{2, 27} = 64/06, p=0/001$ ) و مقدار بیان کاسپاز ۳



شکل ۲. مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرائی پس از مداخله

\*: نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم در سطح  $p=0/001$

\*\* : نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سگته در سطح  $p=0/001$

## بحث

مهم‌ترین یافته ما نشان داد که بیان HSP70 کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های کنترل مدل MI (سکته کنترل) نسبت به گروه سالم کنترل کمتر بود؛ با اینحال، در تحقیق حاضر بیان HSP70 در گروه تمرین HIIT به طور معنی‌داری بیشتر از گروه سکته کنترل و کنترل سالم بود. این یافته با نتایج علینزاده و همکاران (۲۰۱۹) که گزارش کردند ۱۲ هفته تمرین تناوبی شدید موجب افزایش سطوح HSP70 می‌شود (۲۳)، همخوانی دارد.

ورزش یک مداخله مهم در حفظ سلامت قلب و عروق است (۳۶، ۳۷). یکی از مکانیسم‌هایی که ممکن است تا حدی تأثیر پیشگیرانه ورزش را توضیح دهد، افزایش HSPs می‌کارد است (۳۸). به عنوان مثال، به دنبال ورزش شدید، افزایش HSP70 برای محافظت از میوکارد در برابر آسیب I/R گزارش شده است (۳۹). از سویی، افزایش قابل توجهی در سطوح HSP70 میوکارد حیوانات تمرین کرده مشاهده شده است (۴۰). در این راستا، سیگنالینگ گیرنده  $\beta$ -آدرنرژیک یک تنظیم کننده مهم القای Hsp70 پس از یک دوره تمرین شدید است (۴۱). به ویژه، کاهش پروتئین کیناز PKA به واسطه گیرنده  $\beta$ -آدرنرژیک، افزایش ناشی از ورزش را در Hsp70 mRNA از طریق فعال‌سازی HSF1 (۴۲) و فعال‌سازی HSF1 را از طریق مهار ERK1/2 تنظیم می‌کند (۴۳). پس از تمرین ورزشی، کاهش برون ده سمپاتیک به میوکارد، که با برادری کاردی ناشی از تمرین در حالت استراحت و در حین تمرین زیربیشینه مشاهده می‌شود، همراه است (۴۴). هرچند در این مطالعه سطح اپی نفرین پلاسما اندازه گیری نشد و یکی از محدودیت‌های تحقیق می‌باشد. با این حال، تصور می‌شود افزایش بیان HSP70 متعاقب تمرین تناوبی شدید کاهش برونده سمپاتیک به میوکارد باشد. همچنین، افزایش میل ترکیبی HSF1 DNA به  $\beta$  Hsp70 پس از تمرین ورزشی از دیگر مکانیسم‌های افزایش HSP70 می‌باشد. در این راستا، گزارش شده است حیوانات تمرین کرده افزایش قابل توجهی در تعاملات اتصال HSF1-HSE DNA در مقایسه با حیوانات کم تحرک پس از ورزش شدید نشان دادند. افزایش سطح پایه رونویسی  $\beta$  Hsp70 در نتیجه افزایش اتصال به HSF1-HSE DNA می‌تواند افزایش طبیعی Hsp70 mRNA را پس از ورزش شدید توجیه کند (۴۰، ۴۵).

همچنین، افزایش بیان  $\beta$  HSP70 ناشی از تمرین تناوبی شدید مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپاز را از طریق اتصال فاکتور فعال کننده پروتئاز آپوپتوز ۱ (Apaf-1) تعدیل می‌کند و از تشکیل آپوپتوزوم عملکردی، مجموعه فعال سازی Apaf-1/سیتوکروم c/caspase-9 جلوگیری می‌کند (۱۶). برهمکنش بین HSP70 و Apaf-1 از جذب کاسپاز-۹ به آپوپتوزوم جلوگیری می‌کند و در نتیجه از برش و فعال شدن پروکاسپاز-۹ و در نتیجه کاسپاز-۳ جلوگیری می‌کند (۱۶، ۴۶). به نظر می‌رسد HSP70 بر جنبه‌های متعدد مسیر درونی آپوپتوز تأثیر

می‌گذارد. HSP70 با اجزای بالادست (۴۷) و پایین دست رویدادهای میتوکندری ماشین آپوپتوزی تعامل دارد (۱۸). HSP70 با انتشار سیتوکروم c تداخل ایجاد می‌کند (۴۸) و انتقال AIF به هسته (۴۹) را کاهش می‌دهد و بدین طریق آسیب ناشی از ایسکمی را کاهش می‌دهد. HSP70 همچنین از آزاد شدن پروتئین پروآپوپتوز Smac/DIABLO از میتوکندری می‌وسیتی جلوگیری می‌کند (۵۰).

از سویی نشان داده شده است که بیان بیش از حد HSP70 باعث افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی میتوکندری در میوکارد می‌شود (۵۱). در مدل‌های حیوانی، افزایش بیان HSP70 از قلب در برابر اثرات مخرب ایسکمی محافظت می‌کند (۵۲). HSP70 علاوه بر شرایط حاد، در وضعیت ایسکمی و خونرسانی مجدد به دنبال پیوند بای پس کرونر نقش محافظتی دارد (۵۳)، از سویی، در بیماران مبتلا به "استرس" مزمن، مانند CHF، کاهش تولید HSP70 ممکن است نقش مهمی در کاهش عملکرد انقباضی در طول نارسایی قلبی داشته باشد (۱۹). افزایش بیان HSP70 می‌تواند نشان دهنده یک مکانیسم حفاظتی ذاتی باشد که به بازیابی شرایط فیزیولوژیکی کمک می‌کند (۵۴).

سایر یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد بیان کاسپاز سه پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید در مقایسه با گروه کنترل سالم و کنترل سکته به طور معنی‌داری کاهش یافت. این یافته، با نتیجه مطالعه زارعلی و همکاران (۲۰۲۰) که نشان دادند ۸ هفته تمرین تناوبی شدید موجب کاهش کاسپاز-۳ میوکارد موش‌های نر صحرایی می‌شود، همخوانی دارد. گزارش شده است که کاهش قابل توجه بیان پروتئین کاسپاز سه متعاقب تمرین با کاهش عوامل پیش آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت Bax به Bcl2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین در موش‌ها احتمالاً با کاهش رهائش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf1 در کاردیومیوسیتها همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز سه شده است (۲۴).

## نتیجه‌گیری

تمرین تناوبی شدید سازگاری‌های لازم برای آسیب ناشی تریق ایزوپروترونول را با افزایش بیان Hsp70 و کاهش بیان کاسپاز-۳ فراهم می‌کند. با این حال، به دلیل محدودیت‌های تحقیق و عدم بررسی سایر شاخص‌های عملکردی قلبی نیازمند بررسی بیشتر در این زمینه می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

## تضاد منافع





11. Wu R, Gao W, Dong Z, Su Y, Ji Y, Liao J, et al. Plasma Heat Shock Protein 70 Is Associated With the Onset of Acute Myocardial Infarction and Total Occlusion in Target Vessels. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;11:53.
12. Peng W, Zhang Y, Zheng M, Cheng H, Zhu W, Cao C-M, et al. Cardioprotection by CaMKII- $\delta$ B is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70. *Circulation research*. 2010;106(1):102-10.
13. Zhang C, Liu X, Miao J, Wang S, Wu L, Yan D, et al. Heat shock protein 70 protects cardiomyocytes through suppressing SUMOylation and nucleus translocation of phosphorylated eukaryotic elongation factor 2 during myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 2017;22(5):608.
14. Yao Y-w, Zhang G-h, Zhang Y-y, Li W-d, Wang C-h, Yin C-y, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects against ischemia/reperfusion injury via increase of HSP70 and inhibition of NF- $\kappa$ B. *Cell Stress and Chaperones*. 2011;16(3):287-96.
15. Park YH, Seo JH, Park J-H, Lee HS, Kim K-W. Hsp70 acetylation prevents caspase-dependent/independent apoptosis and autophagic cell death in cancer cells. *International journal of oncology*. 2017;51(2):573-8.
16. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature cell biology*. 2000;2(8):476-83.
17. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology*. 2000;2(8):469-75.
18. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology*. 2001;3(9):839-43.
19. Rahmani M, Sadeghi A, Pourrazi H, Ghiyami SH. The Effect of Eight-Week High Intensity Interval Training (HIIT) and Caffeine Intake On The p38 $\alpha$  and hsp70 Protein expression in liver in Diabetic rats induced streptozotocin. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2022;9(1):83-99. [In Persian].
20. Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84(2-3):215-22.
21. Li C-Y, Lee J-S, Ko Y-G, Kim J-I, Seo J-S. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream

نویسندگان این مقاله، هیچگونه تضاد منافی با انتشار این مقاله ندارند.

## References

1. Song N, Ma J, Meng X-w, Liu H, Wang H, Song S-y, et al. Heat shock protein 70 protects the heart from ischemia/reperfusion injury through inhibition of p38 MAPK signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020.
2. Rentrop KP, Feit F. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Concepts and controversies from inception to acceptance. *American Heart Journal*. 2015;170(5):971-80.
3. Huang K-y, Wang J-n, Zhou Y-y, Wu S-z, Tao L-y, Peng Y-p, et al. Antithrombin III alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in a phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent manner. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:516.
4. Kennedy D, Jäger R, Mosser DD, Samali A. Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB life*. 2014;66(5):327-38.
5. Liu Y, Lormes W, Wang L, Reissnecker S, Steinacker JM. Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *European journal of applied physiology*. 2004;91(2):330-5.
6. Zhou H, Hou SZ, Luo P, Zeng B, Wang JR, Wong YF, et al. Ginseng protects rodent hearts from acute myocardial ischemia-reperfusion injury through GR/ER-activated RISK pathway in an endothelial NOS-dependent mechanism. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;135(2):287-98.
7. Ranek MJ, Stachowski MJ, Kirk JA, Willis MS. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018;373(1738):20160530.
8. Zou N, Ao L, Cleveland Jr JC, Yang X, Su X, Cai G-Y, et al. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294(6):H2805-H13.
9. Bochaton T, Paccalet A, Jeantet P, Crola Da Silva C, Cartier R, Prieur C, et al. Heat shock protein 70 as a biomarker of clinical outcomes after STEMI. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;75(1):122-4.
10. Dybdahl B, Slørdahl S, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*. 2005;91(3):299-304.



33. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*. 2011;90(2):234-42.
34. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen M-C, De Angelis KJCD. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. 2007;6(1):38.
35. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *European heart journal*. 2014;35(39):2722-31.
36. Schnohr P, O'Keefe JH, Holtermann A, Lavie CJ, Lange P, Jensen GB, et al., editors. Various leisure-time physical activities associated with widely divergent life expectancies: the Copenhagen City Heart Study. *Mayo clinic proceedings*; 2018: Elsevier.
37. Cleven L, Krell-Roesch J, Nigg CR, Woll A. The association between physical activity with incident obesity, coronary heart disease, diabetes and hypertension in adults: a systematic review of longitudinal studies published after 2012. *BMC public health*. 2020;20:1-15.
38. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*. 1998;83(2):117-32.
39. Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circulation research*. 2002;90(8):911-7.
40. Melling CJ, Thorp DB, Milne KJ, Krause MP, Noble EG. Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(6):H3692-H8.
41. Paroo Z, Noble E. Isoproterenol potentiates exercise-induction of Hsp70 in cardiac and skeletal muscle. *Cell stress & chaperones*. 1999;4(3):199.
42. Melling CJ, Thorp DB, Noble EG. Regulation of myocardial heat shock protein 70 gene expression following exercise. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(4):847-55.
43. Melling CJ, Krause MP, Noble EG. PKA-mediated ERK1/2 inactivation and hsp70 gene expression following exercise. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;41(5):816-22.
44. Winzer EB, Woitek F, Linke A. Physical activity in the prevention and treatment of coronary artery disease. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7(4):e007725.
- of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(33):25665-71.
22. Li Z, Song Y, Xing R, Yu H, Zhang Y, Li Z, et al. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. *PLoS One*. 2013;8(7):e67964.
23. Alizadeh AM, Isanejad A, Sadighi S, Mardani M, Hassan ZM. High-intensity interval training can modulate the systemic inflammation and HSP70 in the breast cancer: a randomized control trial. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2019;145(10):2583-93. [In Persian].
24. Zarali M, Etemad Z, Azizbeigi K, Karimi P. Effect of 8 Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) With and Without Calorie Restriction on Gene Expression of Caspase-3 and Caspase-9 Proteins in Male Rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2020;23(3):300-13.
25. Rinaldi B, Corbi G, Boccuti S, Filippelli W, Rengo G, Leosco D, et al. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Experimental gerontology*. 2006;41(8):764-70.
26. Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M, Suzuki K. Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
27. Walsh R, Koukoulas I, Garnham A, Moseley P, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell stress & chaperones*. 2001;6(4):386.
28. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*. 2012;98(1):5-10.
29. Moeini M, Behpoor N, Tadibi V. The effect of 8 weeks high intensity interval training on the expression of PI3K in the left ventricle and insulin resistance of male Wistar rats with type 2 diabetes. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*. 2020;8(16):48-58. [In Persian].
30. Wang B, Zhou R, Wang Y, Liu X, Shou X, Yang Y, et al. Effect of high-intensity interval training on cardiac structure and function in rats with acute myocardial infarct. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110690.
31. Liao Z, Li D, Chen Y, Li Y, Huang R, Zhu K, et al. Early moderate exercise benefits myocardial infarction healing via improvement of inflammation and ventricular remodelling in rats. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2019;23(12):8328-42.
32. Zheng H, Xie N, Xu H, Huang J, Xie X, Luo M. Effects of 4 month exercise on left ventricular remodeling and autonomic nervous system in hypertensive patients. *Panminerva medica*. 2014;58(1):1-7.

45. Seo MS, Oh SY, Park MJ, Kim SM, Kim MY, Han SI, et al. Implication of reactive oxygen species, ERK1/2, and p38MAPK in sodium salicylate-induced heat shock protein 72 expression in C6 glioma cells. *International journal of molecular medicine*. 2005;16(5):841-9.
46. Sabirzhanov B, Stoica BA, Hanscom M, Piao CS, Faden AI. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *Journal of neurochemistry*. 2012;123(4):542-54.
47. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(46):38729-39.
48. Lee S-H, Kwon H-M, Kim Y-J, Lee K-M, Kim M, Yoon B-W. Effects of hsp70. 1 gene knockout on the mitochondrial apoptotic pathway after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35(9):2195-9.
49. Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon RA, et al. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*. 2005;25(7):899-910.
50. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *Journal of biological chemistry*. 2005;280(37):32317-25.
51. Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020;9(9).
52. Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA, Agard DA. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly reviews of biophysics*. 2011;44(2):229-55.
53. Howard M, Roux J, Lee H, Miyazawa B, Lee J-W, Gartland B, et al. Activation of the stress protein response inhibits the STAT1 signalling pathway and iNOS function in alveolar macrophages: role of Hsp90 and Hsp70. *Thorax*. 2010;65(4):346-53.
54. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2012;1823(3):624-35.