

تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر آپوپتوز میوکارد

دکتر افشار جعفری^۱، حسن پوررضی^۲، دکتر سعید نیکوخصلت^۱، دکتر بهزاد برادران^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: محدودیت غذایی یا کالریک، یکی از مداخلات کاربردی برای کاهش وزن و افزایش طول عمر می‌باشد. با این حال، ابهاماتی در رابطه با فرایندهای پیام‌رسانی مربوط به تأثیر محدودیت غذایی بر پیر شدگی سلولی و آپوپتوز در بافت‌های پیکری حساس مانند میوکارد وجود دارد. بنا بر این، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز در میوکارد موش‌های صحرایی انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه در قالب یک طرح تجربی دو گروهی (مدل حیوانی) به مدت سه ماه روی ۱۶ سر موش صحرایی نر ویستار ۱۴۸۴۸ سه ماهه انجام شد. آزمودنی‌ها به شکل تصادفی در دو گروه همگن شاهد (تعداد = ۸، وزن = $29/61 \pm 385/25$ گرم) و مورد (محدودیت غذایی) (تعداد = ۸، وزن = $21/01 \pm 231/25$ گرم) جایگزین شدند. آزمودنی‌های شاهد به صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت) دسترسی داشتند (۰ درصد محدودیت غذایی)، $23 \pm 2/16$ گرم در روز، در حالی که غذای آزمودنی‌های گروه تجربی تا حد ۵۰ درصد گروه شاهد محدود شد (۵۰- درصد محدودیت غذایی)، $11/5 \pm 1/8$ گرم در روز. پس از سه ماه، قلب آزمودنی‌ها استخراج و ژن‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز ۳ میوکارد به عنوان پروتئین‌های کلیدی در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) بررسی شد. داده‌های حاصل با استفاده از آزمون Independent t و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵۰ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 میوکارد گروه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) به طور غیر معنی‌داری به ترتیب ۲۷/۷ و ۲۷/۹ درصد بیشتر از گروه شاهد بود. در حالی که بیان ژن کاسپاز-۳ و نسبت Bax/Bcl2 میوکارد گروه شاهد به طور غیر معنی‌داری به ترتیب ۳۹/۴ و ۶/۹ درصد بیشتر از گروه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بود.

نتیجه‌گیری: در کل، سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد)، آپوپتوز میوکارد را چندان تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. هر چند، این احتمال وجود دارد که محدودیت غذایی، روند آپوپتوز میوکارد را از طریق افزایش Bcl-2 و کاهش کاسپاز ۳، کند نماید.

واژگان کلیدی: محدودیت غذایی، میوکارد، آپوپتوز

ارجاع: جعفری افشار، پوررضی حسن، نیکوخصلت سعید، برادران بهزاد. تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر آپوپتوز میوکارد. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۷۰-۱۷۵۸

سراسر دنیا هستند؛ به طوری که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰، بیش از ۴۰ درصد مرگ و میرها ناشی از بیماری‌های قلبی-عروقی باشد. عوامل متعددی در

مقدمه

بیماری‌های قلبی-عروقی همچنان به عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامتی و دلایل مرگ و میر در

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

است. به هر حال، رخدادهای مولکولی آپوپتوز، به طور اساسی به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند.

تحقیقات نشان داده است که پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری، می‌تواند منتج به رهائش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم C از فضای بین غشایی شود. این در حالی است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌کند و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود. در این بین، فصل مشترک همه‌ی مسیرهای آپوپتوزی، در نهایت فعال‌سازی کاسپاز ۳ و تجزیه‌ی پروتئین‌های حیاتی سلول است (۵، ۳-۱).

بنا بر این، پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از میوکارد در مقابل آپوپتوز و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. در این بین، محدودیت غذایی یا کالریک، به عنوان یکی از مهم‌ترین مداخلات کاربردی، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. در دهه‌های اخیر، نتایج برخی از مطالعات اشاره دارد که محدودیت غذایی یا کالریک پایین تا حد متوسط (بدون سوء تغذیه) ممکن است به عنوان یک رویکرد ضد آپوپتوزی عمل کند. Niemann و همکاران گزارش کردند که شش ماه محدودیت کالریک (۴۰- درصد) موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA و بیان پروتئین Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی سالخورده می‌شود. آن‌ها معتقد بودند که کاهش فعالیت کمپلکس I میتوکندری

سطح سلولی برای بروز بیماری‌های قلبی-عروقی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به مسیرهای پیام‌رسانی استرس اکسایشی و اختلالات میتوکندریایی، عوامل التهابی-ایمنی و آپوپتوز اشاره کرد. در این بین، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری قلبی-عروقی به ویژه ناتوانی قلبی است. این فرایند که در تنظیم تعادل بین زایش و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف به ویژه بافت‌های سوماتیک مانند میوکارد نقش اساسی دارد، با فشردگی و تکه تکه کردن کروماتین‌ها و چگال نمودن سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز می‌نماید و با مچاله شدن هسته و غشاهای سلولی و تولید واکنش‌های محتوی ذرات آپوپتوتیک خاتمه می‌یابد (۳-۱).

مطالعات موجود حاکی از آن است که میزان اندک آپوپتوز میوکارد (در حدود ۰/۰۰۲-۰/۰۰۱ درصد) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی/خون‌رسانی مجدد، داروهای مختلف، سال‌خوردگی و فشارهای جسمانی (مکانیکی-متابولیکی) تشدید پیدا کند و از این طریق، مقدمات بروز انواع بیماری‌های قلبی-عروقی را فراهم نماید (۲-۱).

این فرایند فیزیولوژیک، اغلب از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNF α (Tumor necrosis factor alpha) و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده‌ی مرگ راه‌اندازی می‌شود (۲-۱). در حالی که، مسیر داخلی به عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذ پذیری میتوکندری و رهائش عوامل آپوپتوزی همراه

هر چند بر اساس اطلاعات و دانش ما، تا زمان انجام مطالعه‌ی حاضر، پژوهشی در داخل کشور در این زمینه انجام نشده بود و در سایر مطالعات قبلی نیز بافت میوکارد کمتر در طی محدودیت‌های غذایی یا کالریک طولانی مدت و بالای ۴۰ درصد مورد بررسی قرار گرفته بود که نتایج متناقضی نیز از این مطالعات در دسترس است. به علاوه، هنوز فرایندهای مولکولی و پروتئین‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی آپوپتوز به دنبال محدودیت‌های غذایی، به طور دقیق و کامل مشخص نشده بود. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بر بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز ۳ در میوکارد موش‌های صحرایی انجام شد.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه در قالب یک طرح تجربی دو گروهی و در دانشگاه تبریز انجام شد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه‌ی حاضر، ۱۶ موش صحرایی نر دو ماهه‌ی ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید شامل دما (22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (50 ± 5 درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی آزمودنی‌های به صورت آزادانه از غذای استاندارد حیوانی (پلت) و آب استفاده می‌کردند و میزان غذای مصرفی روزانه‌ی آن‌ها به صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت می‌شد.

ترکیب غذای مصرفی عبارت از ۵-۴ درصد

و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا Reactive oxygen species) که همراه با تغییرات عملکرد میتوکندریایی است، مهم‌ترین دلیل افزایش فرایند آپوپتوز در سلول‌های قلبی می‌باشد و احتمال می‌رود، محدودیت غذایی با کاهش تولید ROS قادر به ممانعت از افزایش بی‌رویه‌ی فرایند آپوپتوز در این بافت حیاتی باشد (۶).

این در حالی است که نتایج برخی از مطالعات از این رویکرد حمایت نمی‌کند. در این راستا، نتایج Patel و همکاران حاکی است که یک دوره‌ی محدودیت کالری طولانی مدت ۴۰- درصدی موجب افزایش آپوپتوز در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) می‌شود. بر این اساس، محدودیت کالریک طولانی مدت با افزایش فشار اکسایشی و کاهش محتوی Hsp70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز شد (۷).

همچنین، Tejero-Taldo و همکاران اشاره داشتند که اگر محدودیت غذایی با کمبود طولانی مدت برخی از ریز مغذی‌ها مانند منیزیم همراه شود، می‌تواند زمینه‌ی بروز آپوپتوز قلبی را از طریق افزایش پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و فعالیت کاسپاز ۳ فراهم نماید (۸). به هر حال، با توجه به محدودیت‌های غذایی طولانی مدت و اغلب شدیدی که بیشتر افراد برای کاهش وزن یا پیش‌گیری از چاقی مورد استفاده قرار می‌دهند و با توجه به نقش حساس و کلیدی بافت میوکارد در سلامتی و عملکرد، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران و حتی اغلب افراد جامعه را به خود جلب کند.

چربی، حدود ۲۰ درصد پروتئین، ۵۵-۵۰ درصد کربوهیدرات، ۸-۵ درصد فیبر و ۱۲-۱۰ درصد رطوبت و خاکستر بود. موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه شاهد ($n = 8$) و محدودیت غذایی ($n = 8$) جایگزین شدند.

پروتکل رژیم غذایی: آزمودنی‌های گروه شاهد به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول سه ماه دوره‌ی پژوهش (فصل پاییز) استفاده کردند. در طول این دوره، میزان غذای مصرفی آزمودنی‌های گروه شاهد برای تعیین مقدار غذای گروه محدودیت غذایی، به صورت روزانه و دقیق اندازه‌گیری می‌شد. میانگین غذای مصرفی این آزمودنی‌ها در طول این دوره حدود $2/16 \pm 23/00$ گرم در روز بود. بدین ترتیب، گروه دارای محدودیت غذایی تنها ۵۰ درصد مقدار غذای مصرفی گروه شامل را دریافت می‌کرد (حدود $1/8 \pm 11/5$ گرم در روز) که این مقدار نیز به صورت دو وعده‌ای و طی دوره‌ی ۱۲ ساعته‌ی تاریکی به موش‌های دارای محدودیت غذایی داده می‌شد.

جراحی و استخراج نمونه: تمامی موش‌های صحرائی پس از اتمام سه ماه دوره‌ی پژوهش، با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند و پس از آن، بخش اعظم خون (حدود ۵-۴ سی‌سی) از قسمت سینوس چشمی و به وسیله‌ی لوله‌های موئینه جمع‌آوری شد. سپس، موش‌ها بلافاصله توسط متخصصین کارآموده جراحی و قلب آن‌ها استخراج و در مایع فیزیولوژیک انداخته شد. پس از تخلیه‌ی خون قلب و وزن‌کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شد و بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها در کرایوتیوب در

نیترژن مایع قرار داده شد و برای بررسی‌های بعدی در دمای -70°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج RNA: برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (ThermoK0731، آمریکا) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت بطن چپ در حضور ۱ میلی‌لیتر RNXTM-PLUS (سیناژن، ایران) هم‌وزنه شد و سپس، به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. آن‌گاه، به هر میکروتیوب $0/2$ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید؛ در ادامه، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه‌ی سانتی‌گراد و 13700 برابر جاذبه (g) سانتریفیوژ شد.

سپس، به دقت و بدون تکان دادن تیوب، بخش رویی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شد و به محلول جدا شده، حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه، در دمای -20°C درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از آن، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد و 13700 g سانتریفیوژ و مایع رویی بیرون ریخته شد.

آن‌گاه، ۱ میلی‌لیتر اتانول 80% درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد و 13700 g سانتریفیوژ و مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

سپس بار دیگر، در آب تیمار شده با دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC یا Diethylpyrocarbonate)

حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad، آمریکا) بررسی شد. همچنین، RNA تام به روش الکتروفورز روی ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید و مشاهده ی دو بانده مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریپوزومی کنترل شد. RNA استخراج شده برای استفاده ی بعدی در دمای ۷۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

ساخت cDNA: با استفاده از کیت RevertAID First Standard cDNA synthesis (Fermentas)™ (کانادا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر انجام شد: ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر (Deoxyribonuclease) به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوط به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. تیوب مربوط به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه ی سانتی گراد و ۱۴۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد؛ پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

انجام Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR): برای اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین های Bax، Bcl2 و کاسپاز ۳، از دستگاه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett Research، استرالیا) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شد و با به کارگیری بایونیر (Bioneer، آلمان) سنتز و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ nM استفاده گردید.

پرایمرها: واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام شد. رنگ Syber green I واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته ای متصل می شود و نور فلورسنت ساطع می کند. در جدول ۱، توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک، از تیوبی که حاوی همه ی مواد موجود در واکنش به جز cDNA (Complementary DNA) بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوط DEPC water افزوده شد.

ساخت cDNA: با استفاده از کیت RevertAID First Standard cDNA synthesis (Fermentas)™ (کانادا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر انجام شد: ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر (Deoxyribonuclease) به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوط به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. تیوب مربوط به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه ی سانتی گراد و ۱۴۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد؛ پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

به تیوب مربوط، ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه ی سانتی گراد بر روی Dry block، انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر Reaction buffer 5X، ۲ میکرولیتر mix 10mM dNTP و ۱ میکرولیتر (Deoxynucleotide triphosphate)

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

طول محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن
۱۳۶	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3' R: 5'GGGCAGGTTTGTGCGACCTCA3'	Bcl2
۱۵۰	F: 5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3' R: 5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	Bax
۱۱۸	F: 5'GGAGCTTGAACGGTACGCT3' R: 5'AGTCCACTGACTTGCTCCCA3'	Caspase3
۱۳۸	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R: 5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3'	β -actin

بودند و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض شد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی داری بین گروه شاهد و محدودیت غذایی در رابطه با وزن بدن و قلب مشاهده شد ($P < 0/010$)؛ به طوری که گروه شاهد دارای وزن بدنی (۶۶/۷۷ درصد) و قلبی (۵۲/۸۶ درصد) بزرگتری نسبت به گروه محدودیت غذایی بود.

با این حال، زمانی که نسبت وزن قلب به وزن بدن مورد بررسی قرار گرفت، گروه محدودیت غذایی به طور معنی داری ($P < 0/050$) دارای نسبت بزرگتری (وزن قلب/وزن بدن = ۸/۵ درصد) بود (جدول ۲).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه شاهد و مورد در بیان ژن‌های Bcl2، Bax، کاسپاز ۳ و نیز نسبت Bax/Bcl2 وجود ندارد ($P > 0/050$). با این حال، میزان بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در گروه مورد نسبت به شاهد، به ترتیب ۲۷/۷ و ۲۷/۹ درصد بیشتر بود (شکل‌های ۱ و ۲). این در حالی است که نسبت Bax/Bcl2 در گروه شاهد، در مقایسه با گروه مورد، ۶/۹ درصد بزرگتر بود (شکل ۳). همچنین، میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه شاهد نسبت به گروه مورد، ۳۹/۳۷ درصد بالاتر بود (شکل ۴).

در پایان، قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوط و β -actin به عنوان مرجع محاسبه شد.

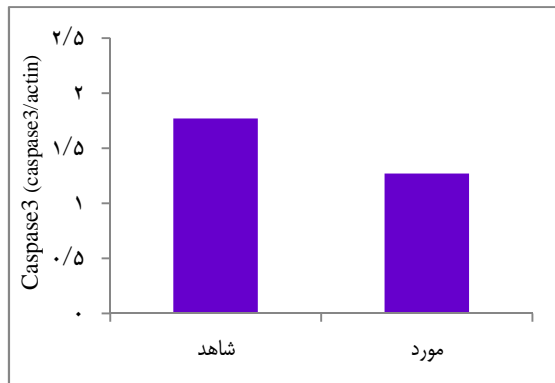
تجزیه و تحلیل آماری: در بخش تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توزیع توأم و به‌هنگام با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصل، با استفاده از آزمون Independent t برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه شاهد و مورد، بررسی شد. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گردید.

یافته‌ها

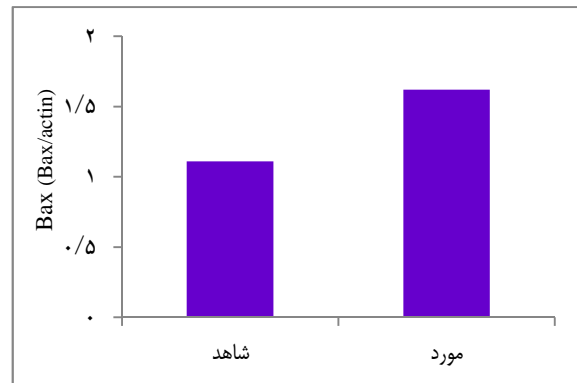
بر اساس نتایج حاصل از آزمون Kolmogorov-Smirnov، اختلاف معنی داری بین نمونه‌ی در دسترس با جامعه‌ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنا بر این، داده‌های جمع‌آوری شده همگن

جدول ۲. مشخصات موش‌های صحرایی در دو گروه شاهد و مورد

متغیر	شاهد میانگین \pm انحراف معیار	مورد میانگین \pm انحراف معیار
وزن بدن (گرم)	۳۸۵/۲۵ \pm ۲۹/۶۰	۲۳۱/۲۵ \pm ۲۱/۰۱
وزن قلب (گرم)	۱/۰۶ \pm ۰/۱۳	۰/۶۹ \pm ۰/۰۸
وزن قلب/وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	۲/۷۷ \pm ۰/۲۲	۲/۹۸ \pm ۰/۲۱



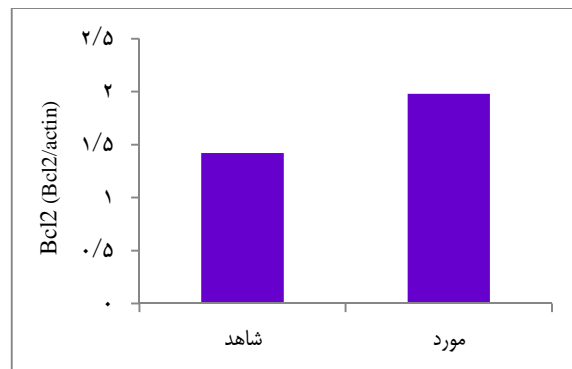
شکل ۴. میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در دو گروه شاهد و مورد



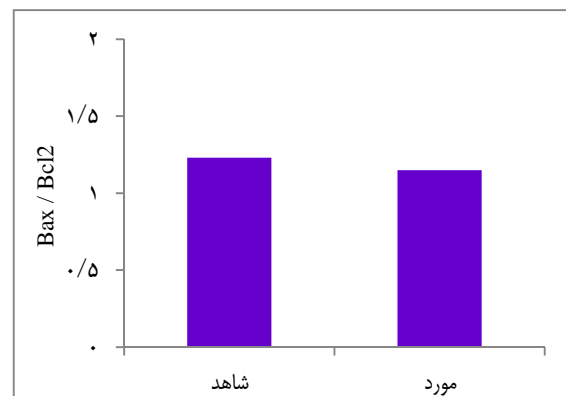
شکل ۱. میزان بیان ژن Bax در دو گروه شاهد و مورد

بحث

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، سه ماه محدودیت غذایی (۵۰ درصد) موجب کاهش معنی دار وزن بدن و وزن قلب در موش‌های صحرایی نر شد. این موضوع، با توجه به کاهش دریافت مواد غذایی در گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه شاهد با دسترسی آزاد به غذا، آن هم برای مدت سه ماه دور از انتظار نبود. چنان که در تمام مطالعات قبلی نیز حتی با دوره‌های محدودیت کوتاه مدت نیز کاهش وزن بدن و قلب مشاهده شده است. با این حال، زمانی که نسبت وزن قلب به وزن بدن مورد بررسی قرار گرفت، گروه مورد به طور معنی داری دارای نسبت بزرگ‌تری بود؛ به طوری که این نسبت در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد، حدود ۹ درصد بزرگ‌تر بود. این موضوع، در برخی از مطالعات قبلی به ویژه در بین موش‌های صحرایی جوان اشاره شده



شکل ۲. میزان بیان ژن Bcl-2 در دو گروه شاهد و مورد



شکل ۳. میزان نسبت Bax/Bcl-2 در دو گروه شاهد و مورد

آپوپتوزی یک دوره‌ی ۶ ماهه محدودیت کالریک ۴۰ درصد، تنها در موش‌های سالخورده مشهود بود و در موش‌های جوان با محدودیت غذایی، تغییرات جزئی در قطعه قطعه شدن DNA میتوکندریایی، بیان پروتئین Bax و Bcl2، رهایش سیتوکروم c و فعالیت کاسپاز ۹ مشاهده شد (۶).

در تأیید نتایج Niemann و همکاران (۶)، Gredilla و همکاران گزارش کردند که محدودیت کالریکی (۴۰- درصد) طولانی مدت (یک سال) موجب کاهش ۴۵ درصدی تولید H_2O_2 میتوکندریایی و کاهش ۳۰ درصدی آسیب اکسایشی DNA میتوکندریایی تنها در میوکارد موش‌های صحرایی سالخورده (۲۴ ماهه) می‌شود و تغییرات معنی‌داری در موش‌های جوان مشاهده نشد (۱۰). به نظر می‌رسد که افزایش سن، یکی از مهم‌ترین عوامل بروز و تشدید آپوپتوز در بافت میوکارد باشد و با پیشرفت سن، میزان مرگ سلول‌های قلبی افزایش یابد (۱۱-۱۲).

یکی از مهم‌ترین فرضیات در این زمینه، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش دفاع ضد اکسایشی و افزایش آسیب‌های میتوکندریایی است (۱۱-۱۴)؛ به طوری که Li و همکاران (۱۵) و نیز Tsujita و همکاران (۱۶) عنوان داشتند که علت افزایش سلول‌های آپوپتوتیک در موش‌های مسن، کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی است که گاهی اوقات دلیل آن تغییر در تحت واحدهای پروتئین‌های P47 Phox و P91 Phox وابسته به NADPH OXIDASE سلول‌های قلبی می‌باشد. به عبارتی، زمانی که احتمال بروز آپوپتوز در این بافت سوماتیک افزایش و تشدید یابد، تأثیرات محدودیت غذایی و کالریک متوسط و بدون سوء تغذیه بر شاخص‌های آپوپتوز میوکارد

است. در این راستا، Niemann و همکاران اشاره داشتند که موش‌های جوان دارای محدودیت کالریک ۴۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد، دارای نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن بزرگ‌تری بودند (۶).

همچنین، Selman و همکاران نشان دادند که دو ماه محدودیت کالریکی ۴۰ درصد موجب افزایش نسبت وزن قلب و عضله‌ی اسکلتی به وزن بدن در مقایسه با گروه شاهد می‌شود (۹). با این وجود، بدون بررسی وضعیت ترکیب بدنی آزمودنی‌ها به ویژه تعیین تغییرات بافت چربی و بافت بدون چربی به دنبال دوره‌های محدودیت غذایی و با در نظر گرفتن آتروفی ایجاد شده در قلب، اظهار نظر در رابطه با افزایش نسبت وزن قلب به بدن و بهبود کارایی سیستم قلبی-عروقی در موش‌های دارای محدودیت غذایی دشوار است.

بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و مورد در بیان ژن‌های Bax، Bcl2، کاسپاز ۳ و نیز نسبت Bax/Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی وجود ندارد. اگر چه اغلب مطالعات به تأثیرات ضد آپوپتوزی و ضد پیری محدودیت غذایی و کالریک اشاره داشتند، اما در پژوهش حاضر، این اثر به شکل معنی‌داری مشاهده نشد.

آن چه که در این رابطه در مطالعات قبلی مشهود است، استفاده از نمونه‌های حیوانی پیر و سالخورده - اغلب بالای ۱۸ ماه سن - می‌باشد. در حالی که سن تقریبی موش‌های مورد استفاده در این مطالعه در شروع دوره در حدود سه ماه و در پایان دوره‌ی پژوهش شش ماه بود که به عنوان موش صحرایی جوان و بالغ محسوب می‌شوند. در این راستا، Niemann و همکاران دریافتند که اثرات ضد

مشهودتر است.

Kwak در مقاله‌ی مروری خود در رابطه با تأثیرات پیری روی آپوپتوز قلب، عنوان داشت که هنوز ابهامات زیادی در مورد تغییرات وابسته به سن در بیان پروتئین‌های Bax و Bcl2 وجود دارد؛ به طوری که در برخی از مطالعات، بروز و تشدید آپوپتوز بدون تغییرات قابل ملاحظه در بیان پروتئین Bax نیز مشاهده شده است (۲). از این رو، با توجه به این که در پژوهش حاضر با عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گروه، بیان پروتئین Bax به دنبال سه ماه محدودیت غذایی، حدود ۲۸ درصد افزایش یافته است و امکان بررسی سایر شاخص‌های آپوپتوزی مانند سیتوکروم c، AIF (Apoptosis-inducing factor)، Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1)، تکه شدن کروماتینی و ... میسر نبود، بایستی با احتیاط بیشتری در مورد محدودیت غذایی و آپوپتوز قلبی اظهار نظر کرد.

به عبارتی، با افزایش طول دوره‌ی محدودیت غذایی -شش ماه و بیشتر- و در محدودیت‌های شدید و بالای متوسط (بالای ۴۰ درصد)، احتمال تغییرات شاخص‌ها در بافت قلبی که به تغییرات کاهش انرژی بسیار حساس می‌باشد، وجود دارد. در این راستا، Marzetti و همکاران در مقاله‌ای مروری اشاره داشتند که تنها محدودیت کالریک ملایم (۴۰-۸ درصد) با کاهش فشار اکسایشی، عملکرد نامطلوب میتوکندری، التهاب و نیز تعدیل مناسب آپوپتوز می‌تواند موجبات حفاظت از میوکارد را فراهم سازد. محدودیت کالریک این عملکرد حفاظتی را در برابر آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 و پایداری غشای میتوکندریایی

انجام می‌دهد (۱۷).

از طرفی، اگر چه در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و مورد مشاهده نشد، با این حال نسبت Bax/Bcl2 در گروه شاهد در مقایسه با گروه مورد، ۶/۹ درصد بزرگ‌تر بود. همچنین، میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه شاهد نسبت به گروه مورد، ۳۹/۳۷ درصد بالاتر بود. رخدادهای مولکولی آپوپتوز به طور اساسی به واسطه‌ی تعادل بین پروتئین‌های ویژه‌ی تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند که افزایش Bcl2 و به دنبال آن کاهش نسبت Bax/Bcl2 یکی از مهم‌ترین عوامل برای جلوگیری از آسیب غشای میتوکندریایی و ممانعت از بروز و تشدید آپوپتوز می‌باشد.

برخی از مطالعات اشاره دارند که محدودیت غذایی از طریق تغییر بیان برخی از ژن‌ها به ویژه ژن‌های تنظیم‌گر متابولیسم اسیدهای چرب و در پی آن، کاهش فشار اکسایشی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 می‌شود و از طرفی، با کاهش انتقال پروتئین Bax به سمت غشای میتوکندری و افزایش پایداری غشا، موجبات حمایت از میوکارد را در برابر آپوپتوز فراهم می‌کند (۱۸-۱۹).

همچنین، این فرایند اغلب با کاهش بیان و فعالیت کاسپاز ۳ که یک مرحله‌ی اساسی در بروز آپوپتوز می‌باشد، همراه است. با این حال و بر خلاف نتایج پژوهش حاضر و برخی از مطالعات قبلی، نتایج مطالعه‌ی اخیر Patel و همکاران حاکی از آن است که

افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز شده است.

از طرفی، James و همکاران بر این باورند که محدودیت غذایی طولانی مدت بدون توجه به سن، می تواند فرایند آپوپتوز را به ویژه در بافت کبدی افزایش دهد. این پژوهشگران، عنوان داشتند که محدودیت غذایی طولانی مدت، موجب کاهش سطوح گردش خون IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) و نیز IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) می شود (۲۲). به نظر می رسد که این کاهش مستمر و طولانی سطوح گردش خون IGF-1 و تنظیم کاهشی IGF-1R موجب غیر فعال شدن مسیر پیام رسانی PI3K/Akt شده، از این طریق، زمینه برای فعال شدن GSK3 (Glycogen synthase kinase3) و تجزیه هر چه بیشتر β -کاتین فراهم می شود. این کاهش پروتئین β -کاتین و افزایش GSK3- β ممکن است موجب افزایش بیان و جابه جایی عوامل پیش آپوپتوزی مانند پروتئین های Bax و Bim و تسریع آپوپتوز شود (۲۳-۲۵).

همچنین، افزایش هورمون های استرسی و فعال شدن برخی از سایتوکین ها در پاسخ به فشار متابولیکی حاصل از محدودیت غذایی شدید و طولانی مدت، می تواند زمینه را برای بروز آپوپتوز قلبی فراهم کند. بر اساس گزارش Whelan و همکاران، فعال شدن مسیر Gαq و افزایش بیان آن در بافت میوکارد از طریق تحریک گیرنده های آلفا-آدرنژیک و آنژیوتانسین II، موجب افزایش بیان Nix/Bnip3L - پروتئین شبه BH3- و ایجاد آپوپتوز میوکارد می شود (۲۶).

با این حال، در مطالعه ی حاضر نیز به دلیل

یک دوره محدودیت کالریک طولانی مدت (۴۰- درصد) به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و التهاب، موجب افزایش آپوپتوز در عضله ی اسکلتی موش های مبتلا به ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) می شود. این پژوهشگران عنوان داشتند مطالعه ی آنها، اولین پژوهشی است که اشاره به زیان آور بودن محدودیت غذایی دارد. بر این اساس، محدودیت کالریک طولانی مدت با افزایش MDA (Methylenedioxyamphetamine) و فشار اکسایشی و کاهش محتوای Hsp70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز می شود. با این حال، آنها اشاره داشتند که مکانیسم های مولکولی این فرایند هنوز نامشخص است (۷).

دلیل تناقض نتایج پژوهش Patel و همکاران (۷) با مطالعه ی حاضر، به طور عمده ناشی از مدل حیوانی و بافت مورد استفاده، مدت دوره و مقدار محدودیت می باشد. Patel و همکاران (۷)، برای مطالعه از موش های مبتلا به ALS استفاده کردند. بیماری ALS، یک عارضه ی عصبی است که با تخریب واحدهای حرکتی در مغز و نخاع، سفت شدن عضلات اسکلتی و افزایش فشار اکسایشی همراه است؛ به طوری که دریافت انرژی پایین در این بیماران، می تواند منجر به مرگ نیز شود (۲۱-۲۰).

از طرفی، Patel و همکاران (۷) از یک دوره ی محدودیت کالریک طولانی مدت ۴۰ درصدی استفاده کرده بود. به همین دلیل، این فشار متابولیکی بالا و طولانی مدت در این نوع از گونه ی حیوانی شاید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش فشار اکسایشی، کاهش محتوای Hsp70 سلولی و نیز

غذایی روند آپوپتوز میوکارد را از طریق افزایش Bcl-2 و کاهش کاسپاز ۳، کند نماید. با این حال، با توجه به طول دوره ی محدودیت غذایی و مقدار آن در پژوهش حاضر و نیز محدودیت های موجود در آن، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه ی تأثیر پذیری شاخص های مربوط به آپوپتوز میوکارد از محدودیت کالریک یا غذایی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می باشد.

تشریح و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه ی دکترای تخصصی حسن پوررضی، مصوب دانشکده ی تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز می باشد. نویسندگان از جناب آقای دکتر فرزام شیخزاده به خاطر راهنمایی و همکاری صمیمانه، کمال تشکر را دارند. همچنین، از جناب آقای دکتر امیر منفردان مدیر عامل شرکت تخصصی آسان تشخیص آذربایجان قدردانی می گردد.

محدودیت های موجود امکان بررسی جامع و کامل شاخص ها و عوامل تحریک کننده ی آپوپتوز به دنبال محدودیت غذایی وجود نداشت. از این رو، اظهار نظر صحیح در این زمینه و شناسایی دقیق مکانیسم های مولکولی این فرایند، نیازمند بررسی بیشتر و گسترده تر است.

در نهایت، چنین به نظر می رسد که یک محدودیت غذایی (۵۰- درصد) سه ماهه، موجب کاهش وزن بدن و آتروفی قلب شود. همچنین، بدون بررسی تغییرات ترکیب بدنی به ویژه میزان بافت چربی و بدون چربی پس از محدودیت غذایی، نمی توان به جمع بندی دقیقی در مورد افزایش نسبت وزن قلب به وزن بدن و کارایی سیستم قلبی-عروقی رسید. به علاوه، بر اساس یافته های پژوهش حاضر، به نظر می رسد که سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بر آپوپتوز میوکارد تأثیر قابل توجهی ندارد. هر چند، این احتمال وجود دارد که محدودیت

References

1. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(5): 330-49.
2. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil* 2013; 9(2): 212-9.
3. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(3): 397-405.
4. Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2005; 4(4): 429-37.
5. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 105(6): 1934-43.
6. Niemann B, Chen Y, Issa H, Silber RE, Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. *Cardiovasc Res* 2010; 88(2): 267-76.
7. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 2010; 5(2): e9386.
8. Tejero-Taldo MI, Chmielinska JJ, Weglicki WB. Chronic dietary Mg²⁺ deficiency induces cardiac apoptosis in the rat heart. *Magnes Res* 2007; 20(3): 208-12.
9. Selman C, Gredilla R, Phaneuf S, Kendaiah S, Barja G, Leeuwenburgh C. Short-term caloric restriction and regulatory proteins of apoptosis in heart, skeletal muscle and kidney of Fischer 344 rats. *Biogerontology* 2003; 4(3): 141-7.
10. Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers

- oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001; 15(9): 1589-91.
11. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res* 2009; 83(2): 247-61.
 12. Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, et al. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(5): 297-307.
 13. Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz* 2002; 27(7): 662-8.
 14. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem* 2006; 17(8): 501-8.
 15. Li SY, Du M, Dolence EK, Fang CX, Mayer GE, Ceylan-Isik AF, et al. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. *Aging Cell* 2005; 4(2): 57-64.
 16. Tsujita Y, Muraski J, Shiraishi I, Kato T, Kajstura J, Anversa P, et al. Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(32): 11946-51.
 17. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, Bernabei R, Carter CS, Leeuwenburgh C. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. *Clin Geriatr Med* 2009; 25(4): 715-32, ix.
 18. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011; 32(3): 159-221.
 19. Dhahbi JM, Tsuchiya T, Kim HJ, Mote PL, Spindler SR. Gene expression and physiologic responses of the heart to the initiation and withdrawal of caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61(3): 218-31.
 20. Desport JC, Preux PM, Truong TC, Vallat JM, Sautereau D, Couratier P. Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 1999; 53(5): 1059-63.
 21. Kasarskis EJ, Berryman S, Vanderleest JG, Schneider AR, McClain CJ. Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(1): 130-7.
 22. James SJ, Muskhelishvili L, Gaylor DW, Turturro A, Hart R. Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implications for carcinogenesis and aging. *Environ Health Perspect* 1998; 106(Suppl 1): 307-12.
 23. Dalla LL, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della BM, Angelini A, et al. Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(1): C138-C144.
 24. Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 2006; 79(4): 173-89.
 25. Pecina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int* 2010; 10: 22.
 26. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 19-44.

Effect of Long-Term Dietary Restriction on Myocardial Apoptosis

Afshar Jafari PhD¹, Hassan Pourrazi MSc², Saeid Nikookheslat PhD¹, Behzad Baradaran PhD³

Original Article

Abstract

Background: Caloric or dietary restriction (DR) is a practical intervention for weight loss and increasing lifespan. However, the effects of long-term dietary restriction and signaling process of it on cell aging and apoptosis remain unclear, especially in sensitive somatic tissues such as myocardial. Therefore, the purpose of this study was investigating the effect of long-term dietary restriction on some indices of myocardial apoptosis in rats.

Methods: This study was conducted with a two-group experimental design (animal model) for three months. Sixteen 3-month-old male Wistar₁₄₈₄₈ rats were selected and randomly divided into two groups of dietary restriction (n = 8; weight: 385.25 ± 29.6 g) and control (n = 8; weight: 231.25 ± 27.63 g). All animals in control group were fed ad libitum (0% of dietary restriction; 23.0 ± 2.16 g/day) and animals of dietary-restriction group had daily access to 50% of the intake of the ad libitum-fed control animals (-50% of dietary restriction; 11.5 ± 1.8 g/day). After 3 months, the hearts of rats were extracted and Bax, Bcl2 and caspase-3 mRNA, as important proteins in mitochondrial apoptosis pathway, were evaluated using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method. Independent t-test was applied for statistical analysis of the data at the significant level of P < 0.05.

Findings: The expressions of Bax and Bcl-2 genes in dietary-restriction group were insignificantly higher than the control group (27.7% and 27.9%, respectively). In addition, caspase-3 expression and Bax/Bcl2 ratio in control group were insignificantly higher than the dietary-restriction group (39.4% and 6.9%, respectively).

Conclusion: In general, 3-month dietary restriction (-50%) did not affect myocardial apoptosis. However, it likely seems that dietary restriction alleviates myocardial apoptosis via increasing Bcl-2 and decreasing caspase-3.

Keywords: Dietary restriction, Myocardial, Apoptosis

Citation: Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. **Effect of Long-Term Dietary Restriction on Myocardial apoptosis.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1758-70

1- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine AND Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Pourrazi Hassan MSc, Email: pourrazi.h@gmail.com