دانشور
پزشکی

اثر عدم ثبات اجتماعی، محرومیت، تبعیض و بی‌عدالتی در دریافت غذا بر تغییرهای بافت‌شناسی نورون‌های هیپوکامپ خرگوش سفید نیوزلندی

نویسندگان: فاطمه مرادی[۱]، شهناز مجرب[۲]، محمدرضا واعظ مهدوی*[۳] ابوالحسن احمدیانی[۴]، مهرداد روغنی[۵]، علیرضا دلشاد[۶] و تقی الطریحی[۷]

۱. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. کارشناس ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. استاد ،گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، گروه پژوهشی عدالت در سلامت و مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی ایرانی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴. استاد گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۶. دانشیار گروه بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۷. استاد گروه بافت‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: vaezmahdavi@shaded.ac.ir

دریافت: ۹۰/۹/۲
آخرین اصلاح‌ها: ۹۰/۱۲/۱
پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۴

چکیده

مقدمه و هدف: طبق مطالعات در جوامع انسانی و نیز مدل‌های آزمایشگاهی، فقدان عدالت، بروز نابرابری‌ها و بی‌ثباتی اجتماعی، آثاری سوء در سلامت افراد و جوامع داشته‌اند، اما به‌خوبی نمی‌دانیم که «آیا عدم ثبات اجتماعی، فقر غذایی و بی‌عدالتی و نابرابری در دریافت غذا می‌تواند تسریع‌کننده مرگ نورون‌ها و پیری زودرس هم باشد یا نه؟» در پاسخ به این پرسش با طراحی مدلی آزمایشگاهی آثار فقر غذایی و نابرابری در دریافت غذا همراه با عدم ثبات اجتماعی بر و تغییرهای هیستوپاتولوژیک و نیز روند پیشرفت کهولت سلولی در نرون‌های هیپوکامپ خرگوش سفید نیوزلندی بررسی و ارزیابی‌شد.

مواد و روش کار: ۴۸ خرگوش نیوزلندی به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم‌شدند و شرایط متفاوت اجتماعی در گروه‌ها در طی هشت هفته اعمال‌شد. پس از طی دوران «تفاوت‌های اجتماعی»، تجمع لیپوفوشین و آپوپتوز به‌عنوان معیارهای مهم از کهولت سلولی توسط رنگ‌آمیزی اختصاصی long Ziehl- Nelseen و نیز روش TUNEL بررسی‌شدند تا سرعت تجمع لیپوفوشین و آپوپتوز در سلول‌های هرمی هیپوکامپ ارزیابی شود؛ سطح کورتیزول سرمی نیز اندازه‌گیری‌شد.

نتایج: به‌کارگیری هم‌زمان شرایط فقر غذایی، نابرابری در دریافت غذا و عدم ثبات اجتماعی، ایجاد تغییرهایی آشکار را در تجمع لیپوفوشین در سلول‌های هرمی در مقایسه با گروه کنترل سبب‌شد ($p<0.005$)؛ نتایج، همچنین نشانگر افزایشی معنی‌دار در میزان سلول‌های آپوپتوتیک نسبت‌به سلول‌های سالم در تمام گروه‌های تحت استرس نسبت‌به گروه کنترل بود ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های بالا نشان‌می‌دهند که فقر غذایی، بی‌عدالتی در دریافت غذا و عدم ثبات اجتماعی به افزایش تجمع لیپوفوشین (به‌عنوان شاخصی از بروز استرس اکسیداتیو و پیری زودرس) در سلول‌های هرمی هیپوکامپ منجرشده، از این طریق، احتمال مرگ آپوپتوتیک آنها را افزایش‌می‌دهد.

واژگان کلیدی: عدالت، نابرابری اجتماعی، محرومیت غذایی، عدم ثبات اجتماعی، لیپوفوشین، هیپوکامپ، آپوپتوز

مقدمه

مطالعات متعدد نشان‌داده‌اند که افراد متعلق به طبقات اجتماعی پایین‌تر از سلامت ذهنی و جسمی‌کمتری نسبت‌به افراد مشابه در سطوح اجتماعی بالاتر، بهره‌مندند؛ بر این اساس، عدالت در سلامت، مهم‌ترین چالش امروز سلامت به‌شمارمی‌رود ساختارهایی متعدد برای توضیح ارتباط میان وضعیت اجتماعی – اقتصادی افراد و سلامتی آنها پیشنهادشده‌اند. یکی از این ساختارها که در سال‌های اخیر مورد توجهی ویژه قرار‌گرفته‌است، آثار بیولوژیک استرس‌های مزمن اجتماعی است. شرایط متفاوت اقتصادی–اجتماعی، احساس نابرابری و فقدان عدالت و بی‌ثباتی در موقعیت اجتماعی، سطح پایداری از استرس مزمن را در بدن ایجادمی‌کند. استرس مزمن برخلاف استرس‌های حاد که با خاتمه شرایط استرس‌زا و متابولیزه‌شدن مدیاتورهای ترشح‌شده، آثار بیولوژیک آنها نیز ازمیان‌می‌رود، ارگانیسم را با سطوح درازمدتی از هورمون‌ها و مدیاتورهای استرسی مواجه‌می‌سازد که متعاقب آن، آثار بیولوژیک پایداری نیز از خود برجامی‌گذارد؛ بر همین اساس، جستجوی آثار بیولوژیک طولانی‌مدت استرس مزمن بر اعضا و اندام‌های بدن به‌عنوان حلقه واسط میان وضعیت اقتصادی– اجتماعی و سلامتی، موضوع پژوهش‌هایی نوین قرارگرفته‌است. افراد دارای وضعیت اجتماعی -اقتصادی پایین‌تر مواجهه بیشتری با حوادث پراسترس زندگی را گزارش‌کرده‌اند و به دلیل نداشتن قدرت و منابع کافی برای پاسخ‌گویی به استرس‌ها و تطابق با آنها، در مقایسه با افراد بهره‌مند از وضعیت مطلوب‌تر اجتماعی – اقتصادی نشانه‌های بزرگ‌تری از این حوادث پر استرس را در زندگی خود بروزداده‌اند (۱). در برخی مطالعات، شواهدی از تغییرهای فیزیولوژیک، همانند پیدایش پیری در حیوانات جوانی که تحت استرس قرارگرفته‌اند، گزارش‌شده‌است (۲). پیری سلولی با افزایش پیشرونده موادی در داخل سلول شامل ارگانل‌های ناکارآمد و غیرقابل تجزیه و ساختارهای مولکولی (که با عنوان زباله‌های بیولوژیک خوانده‌می‌شود)، همراه است (۳)؛ نمونه‌ای از این زباله‌ها ماده‌ای پلیمری و غیرقابل تجزیه به نام «لیپوفوشین» است؛ این ماده که رنگدانه کهولت و پیری نیز نامیده‌شده‌است، در نتیجهٔ تجزیه ناکافی و ناکارآمد مواد بلعیده‌شده در درون لیزوزوم‌ها تجمع‌می‌یابد (۴و۵)؛ همچنین تصورمی‌شود لیزوزوم‌های فاقد کارایی که حاوی آنزیم‌های پروتئولیتیک ناکارآمد هستند در سیتوزول به‌صورت فاگولیزوزوم‌های حاوی لیپوفوشین تجمع‌می‌کنند. ذخیره‌شدن و تجمع بیش از اندازه لیپوفوشین در سلول، ناشی از حضور رادیکال‌های آزاد نیز دانسته‌شده‌است که عمده‌ترین عوامل القاکننده آسیب و درنهایت مرگ سلولی بر اثر استرس اکسیداتیو به‌شمارمی‌روند (۶). نتایج مطالعات حیوانی گذشته نشان‌داده‌اند که احساس نابرابری در دریافت غذا و محرومیت غذایی می‌تواند تجمع رنگدانه لیپوفوشین را در سلول‌های میوکارد افزایش‌داده، فرایند پیری زودرس سلول را القاکند؛ بی‌ثباتی اجتماعی نیز تجمع چشمگیر این پیگمان در سلول‌های میوکارد سبب‌شده‌است (۷)؛ همچنین محرومیت غذایی، کاهش چشمگیر در توانایی تثبیت حافظه و یادآوری اطلاعات را (با احتمال درگیری هیپوکامپ) نشان‌داده‌است (۸). استرس‌های روانی–اجتماعی ساخت و تولید اکسیژن فعال را القامی‌کند و پیدایش استرس اکسیداتیو را سبب‌می‌شود (۹)؛ به‌عبارت‌دیگر، شرایط روحی و روانی نامناسب با افزایش متابولیسم، به‌عنوان عاملی برای ایجاد رادیکال‌های آزاد در موجودات زنده عمل‌می‌کند؛ تاریخچه مطالعه روی استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد با تحقیق درباره پدیده «aging» و بیولوژی وقوع آن در سلول نیز مرتبط است (۱۰). استرس و تغییرهای سطح گلوکوکورتیکوئیدهای سرم بر ساختار نورونی و فعالیت حیاتی سلولی در نواحی مختلف هیپوکامپ تأثیردارد. شواهدی بسیار مبنی‌بر تأثیرپذیری بارز هیپوکامپ در حیوانات تحت استرس وجوددارند (۱۱). استرس‌های روانی– اجتماعی از مسیر سیستم سمپاتیک– مدولای فوق‌کلیه و نیز از طریق محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–

آدرنال، میزان فشار خون، سطح گلوکوکورتیکوئیدها و کاتکول آمین‌های خون را بالامی‌برند (۱۲)؛ لذا بررسی حاضر به دنبال مطالعات گذشته دربارهٔ تأثیرهای استرس‌های مزمن روانی- اجتماعی بر بافت قلب و کبد برای پاسخ به این پرسش که «آیا عدم ثبات اجتماعی و محرومیت و نابرابری در دریافت غذا می‌توانند پیری زودرس و مرگ نورون‌های هیپوکامپ را القاکنند؟» [آزمایشی] روی خرگوش سفید نیوزلندی انجام‌گرفت؛ برای ارزیابی پیری و استرس اکسیداتیو میزان تجمع رنگدانه لیپوفوشین و به‌منظور ارزیابی میزان مرگ سلولی، ایجاد آپوپتوز (به‌عنوان دو معیار مهم استرس اکسیداتیو) در سلول‌های هیپوکامپ بررسی‌شدند؛ برای ارزیابی شدت استرس، سطح کورتیزول سرمی خرگوش‌های مورد آزمایش نیز اندازه‌گیری‌شد.

مواد و روش‌ها

حیوان‌های مورد مطالعه، ۴۸ سر خرگوش نر سفید نیوزلندی با سن ۸ تا ۱۰ ماه بودند که همه در موقعیت مشابه قرارگرفتند. در مدت زمانی قبل از مطالعه، خوراک روزانه آنها وزن می‌شد و از لحاظ دریافت غذا و آب محدودیتی نداشتند. کار با حیوانات، طبق قوانین و ملاحظات اخلاقی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام-گرفت و استرس‌های مختلف به شرح زیر به مدت هشت هفته در گروه‌های آزمایش اعمال‌شد:

محرومیت از غذای کامل روزانه که با اندازه‌گیری اولیه میزان غذای روزانه در حیوان و کاهش آن به میزان یک‌سوم (برای هر حیوان، ۵۰ گرم) درنظرگرفته‌شد و قرارگرفتن این حیوان‌های محروم از غذای کامل در محیط حیوان‌هایی که از غذای کامل بهره‌مند بودند.

تغییر در موقعیت اجتماعی از طریق «فقدان هم-خانهٔ ثابت» به‌طوری‌که هر دو هفته یک‌بار هم‌خانه حیوان تغییرمی‌کرد و حیوان مجبور بود خود را با شرایط سکونت جدید هماهنگ‌کند.

قرارگرفتن حیوان‌های محروم از غذای کامل در اتاقی جدا که غذاخوردن دیگران را نمی‌دیدند (گروه ایزوله) (۱۳و۱۴).

شرایط گروه‌ها

گروه اول: به‌عنوان گروه شاهد درنظرگرفته‌شد هیچ-گونه استرسی به این گروه اعمال‌نمی‌شد و در تمام طول دوره مطالعه از غذای کامل بهره‌مند بوده، هم‌خانه ثابت داشتند. گروه شاهد در کنار سایر گروه‌ها در یک اتاق قرارداشت و هر حیوان به میزان ۱۵۰ گرم در روز غذا دریافت‌می‌کرد (بدون محدودیت).

گروه دوم: از غذای کامل محروم بود. هر حیوان در روز ۵۰ گرم غذا دریافت‌می‌کرد ولی هم‌خانه او ثابت بود و در کنار سایر گروه‌ها قرارداشتند (محرومیت از غذا + مواجهه با گروه‌های بهره‌مند).

گروه سوم: از غذای کامل محروم بودند و هم‌خانه آنها نیز ثابت نبود. هر حیوان در روز ۵۰ گرم غذا دریافت‌کرده، هر دو هفته، یک‌بار مکان حیوان تغییرمی-کرد و در کنار حیوانی جدید از گروه خود قرارمی-گرفت؛ این گروه نیز در کنار سایر گروه‌ها در اتاق قرار-داشتند (محرومیت از غذا + مواجهه + تغییر در موقعیت اجتماعی).

گروه چهارم: شرایطی مانند گروه سوم داشتند با این تفاوت که هر سه استرس گفته‌شده یعنی محرومیت از غذای کامل، نداشتن هم‌خانهٔ ثابت و قرارگرفتن در کنار گروه‌های بهره‌مند از غذا تنها در طول نیمی‌از دوره مورد مطالعه اعمال‌شد (محرومیت از غذا + مواجهه + تغییر در موقعیت اجتماعی به مدت چهار هفته).

گروه پنجم: از غذای کامل محروم بودند؛ یعنی ۵۰ گرم غذا برای هر حیوان؛ هم‌خانه حیوان در گروه ثابت نبود و هر دو هفته یک‌بار تغییرمی‌کرد. حیوان‌های این گروه در اتاق ایزوله قرارداشتند و درب اتاق بسته بود. به‌طوری‌که غذاخوردن دیگران را مشاهده‌نکنند و بوی غذای گروه‌های بهره‌مند از غذا نیز به درون اتاق راه‌نیابد (محرومیت از غذا + تغییر در موقعیت اجتماعی؛ بدون مواجهه).

گروه ششم: از غذای کامل بهره‌مند بودند، ولی هم-خانهٔ آنها مرتب تغییرمی‌کرد (هر دو هفته یک‌بار) و در کنار چهار گروه دیگر قرارداشتند (تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت از غذا).

پس از پایان هشت هفته، روی حیوانات مورد مطالعه، بیهوشی عمیق به‌منظور کاهش هرگونه درد با اتر انجام-شد، خون‌گیری برای بررسی میزان کورتیزول سرمی‌از تمامی‌حیوانات در فاصله زمانی ۸ تا ۱۰ صبح صورت-گرفت. در ادامه، حیوانات تحت پرفیوژن بافتی قرار-گرفتند به این ترتیب که با واردکردن کتتر به بطن چپ حیوان ابتدا با محلول سالین ۹ درصد بافت‌ها را شستشوداده، سپس با محلول فیکساتیو ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار بافت‌ها فیکس شدند؛ پس از آن، مغز حیوان را به‌طور کامل خارج‌کرده، مراحل پردازش بافتی به‌منظور آب‌گیری انجام و سپس بلوک پارافینی تهیه‌شد. به‌منظور انجام روش رنگ‌آمیزی اختصاصی long Ziehl-Neelsen برای مشاهده لیپوفوشین، حداقل ۵ تا ۶ حیوان از هر گروه انتخاب‌شدند و از هر حیوان، حداقل پنج برش بافتی در وضعیت کرونال از ناحیه هیپوکامپ به ضخامت ۴ تا ۵ میکرون آماده‌شد. پس از اینکه نمونه-های بافتی رنگ‌آمیزی شدند در هر برش منطقه CA3 ، CA2وCA1 توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفت. در بررسی و تعیین میزان لیپوفوشین، به‌منظور جلوگیری از هرگونه قضاوت شخصی، اعداد تصادفی از جدول اعداد تصادفی به محور Xو Y میکروسکوپ تعلق‌گرفت و فیلدهای مشاهده انتخاب‌شدند و سپس تعداد رنگدانه قابل مشاهده در این میدان میکروسکوپی شمرده‌شد. در ادامه از اعداد به‌دست‌آمده، یک میانگین برای هر حیوان حاصل و درنهایت، میانگین هر گروه محاسبه‌شد.

بررسی آپوپتوز: به‌منظور بررسی‌های میزان تجمع، هسته‌های آپوپتوتیک ایمونوهیستو شیمیTUNEL مورد استفاده قرارگرفت؛ بدین منظور حداقل ۴ حیوان از هر گروه انتخاب‌شدند و از هر حیوان حداقل چهار برش کرونال از بافت هیپوکامپ به ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم تهیه‌شد؛ پس از زدودن پارافین و آبدهی با الکل‌های نزولی از محلول هیدروژن پراکسیداز ۳ درصد برای مهار آنزیم هیدروژن پراکسیداز اندوژن استفاده‌شد و سپس به‌منظور افزایش نفوذپذیری غشا proteinase k به غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده‌شد؛ در این مرحله از محلول حاوی آنزیم نوکلئوتید ترانسفراز کیت TUNEL برای پیداکردن نقاط آپوپتوتیک کمک‌گرفته، نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی به‌ترتیب با محلول-های حاوی DNase1 و محلول حاوی حلال آنزیم نوکلئوتید ترانسفراز تست‌شدند؛ در ادامه، پس از استفاده از محلول convertor و ترکیب DAB، آب‌گیری بافتی با الکل‌های صعودی و زایلول با استفاده از چسب انتلان، لامل‌گذاری صورت‌گرفت و پس از خشک‌شدن، «لام‌ها» آماده بررسی با میکروسکوپ نوری شدند. در محاسبه درصد سلول‌های آپوپتوتیک، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و نیز تعداد سلول‌های سالم در شش منطقه میکروسکوپی مجاور هم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X در مناطق CA1, CA2 و CA3 شمارش‌شده، سپس درصد سلول‌های آپوپتوتیک به‌دست‌آمد؛ در ادامه میانگین هر حیوان و سپس هر گروه محاسبه‌شد.

در انتهای دوره مطالعه از نمونه خون تهیه‌شده برای بررسی سطح کورتیزول سرم استفاده‌شد به‌نحوی‌که نمونه خون به مدت ۵ دقیقه و با دور ۵۰۰۰ دور در دستگاه سانترفیوژ قرارگرفته، پس از جداسازی سرم نمونه‌ها، اندازه‌گیری سطح کورتیزول سرمی‌با استفاده از کیت کورتیزول از شرکت Cobas و روش الکتروکمولمینوسانس توسط دستگاه الکسیس ۲۰۱۰ انجام‌شد.

بررسی آماری

داده‌ها به‌صورت Mean+ SEM نشان‌داده‌شده‌اند. اطلاعات آماری با نرم‌افزار SPSS/16 تحلیل و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن تست LSD انجام‌شد. تغییرها در گروه‌ها با $p\ value < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی‌شدند.

نتایج

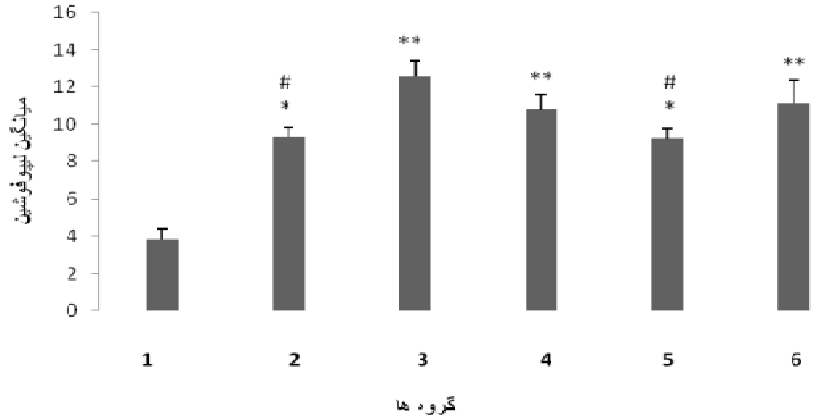
گروه اول (کنترل): نمونه‌های تهیه‌شده از حیوانات این گروه به دلیل بهره‌مندی از غذای کافی و عدم اعمال هرگونه استرسی، دارای حداقل یا حتی بدون هیچ اثری از لیپوفوشین و آپوپتوز بافتی بودند (تصاویر ۱و۲ A).

گروه دوم: محرومیت غذایی و مواجهه : در این گروه که از غذای کافی محروم بودند به‌نحوی‌که یک‌سوم غذای گروه کنترل را دریافت‌می‌کرد و نیز شاهد نابرابری در دریافت غذا بود، زیرا بهره‌مندی سایر گروه‌ها را مشاهده‌می‌کرد، تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین در مقایسه با گروه کنترل افزایش‌یافته‌بود ($p<0.05$; نمودار ۱)؛ نیز میزان آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$؛ نمودار ۲ و تصاویر ۱و۲ B).

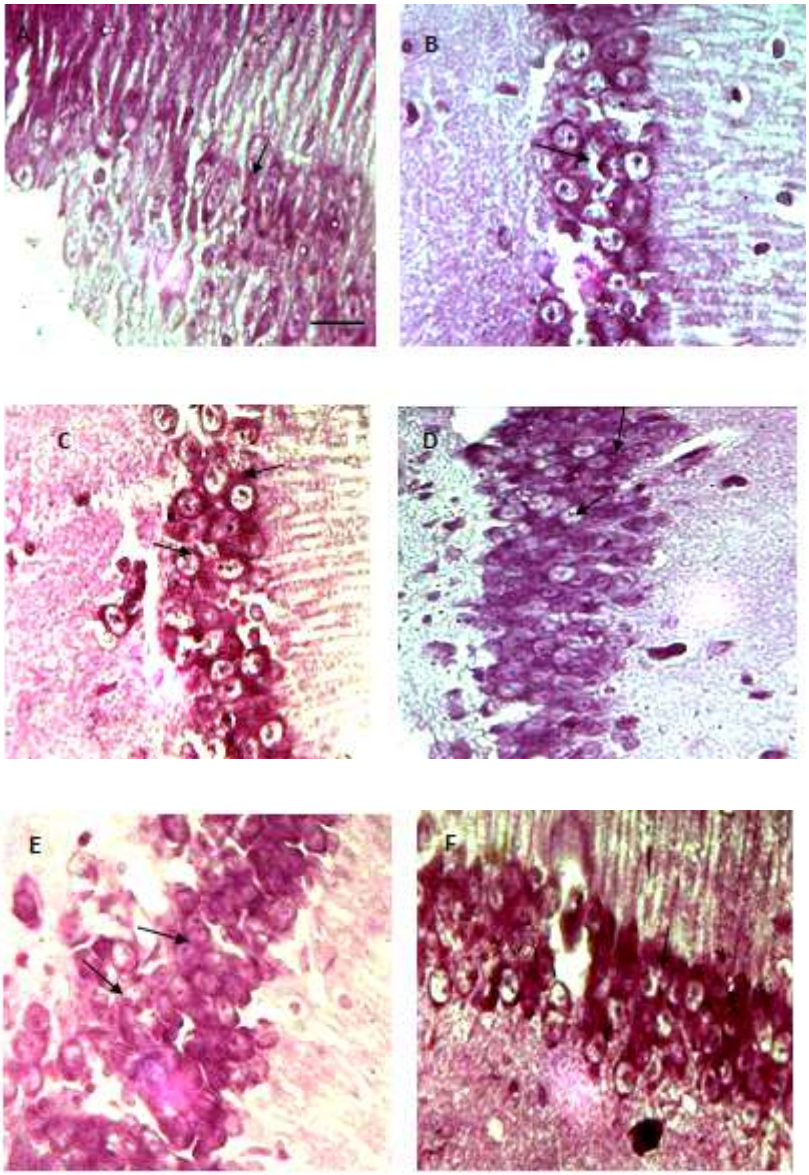
گروه سوم: محرومیت غذایی؛ مواجهه؛ هم‌خانهٔ ناثابت: در این گروه که شرایطی مشابه با گروه دوم داشت با این تفاوت که علاوه‌بر محرومیت غذایی و احساس نابرابری در دریافت غذا، از عدم ثبات اجتماعی به دلیل تغییر هم‌خانه هر دو هفته یک‌بار نیز رنج‌می‌برد؛ در این گروه، تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین به میزان بسیار زیاد وجودداشت ($P<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و $p<0.05$ در مقایسه با گروه۲؛ (نمودار ۱)؛ همچنین میزان آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل افزایشی قابل‌توجه را نشان‌داد ($P<0.005$ ؛ نمودار ۲ و تصاویر ۱ و ۲ C).

گروه چهارم: محرومیت غذایی؛ مواجهه؛ هم‌خانه ناثابت؛ نصف دوره: در این گروه که شرایطی مشابه گروه سوم به مدت چهار هفته بر آن اعمال‌شده‌بود نیز تجمع قابل‌توجه گرانول لیپوفوشین مشاهده‌شد ($P<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، نمودار ۱)؛ همچنین میزان آپوپتوز در این گروه در مقایسه با گروه سوم که به مدت هشت هفته در شرایط استرسی بود، کاهشی معنی‌دار را نشان‌داد (نمودار۲ و تصاویر ۱ و ۲ D).

گروه پنجم: محرومیت غذایی؛ هم‌خانه ناثابت؛ بدون مواجهه (ایزوله): در این گروه با اعمال محرومیت غذایی در هشت هفته، عدم وجود ثبات اجتماعی به دلیل تغییر هم‌خانه و نیز بودن در محیط ایزوله تجمع افزایش‌یافته لیپوفوشین مشاهده‌شد ($P<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل؛ نمودار۱)؛ در بررسی میزان آپوپتوز سلولی نیز افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک را مشاهده‌کردیم ($p<0.05$ نمودار۲ و تصاویر ۱ و ۲ E).



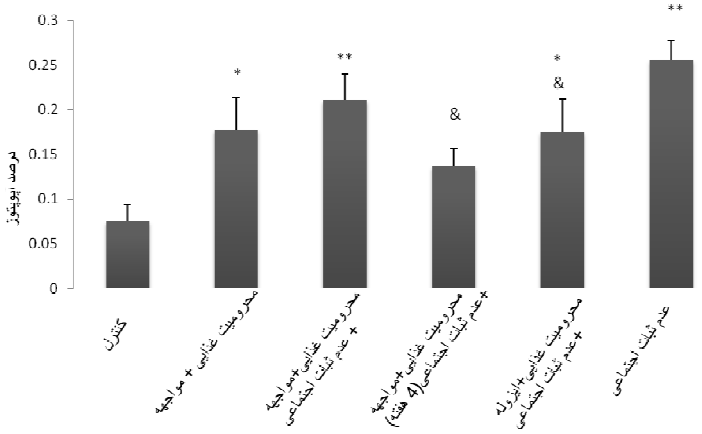
نمودار ۱. مقایسه میزان پیدایش رنگدانه لیپو فوشین به‌عنوان شاخصی از پیری زودرس سلولی در گروه های مورد آزمایش: قرارگرفتن خرگوش‌ها در محیط نابرابر اجتماعی یا مواجهه با استرس، تجمع بیشتر رنگدانه لیپوفوشین در تمامی‌گروه‌های مورد آزمایش نسبت‌به گروه کنترل را درپی‌داشت که در گروه های دوم، سوم، چهارم، پنجم و ششم از لحاظ آماری معنی‌دار بود. (**: $p<0.001$ و*: $p<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل ؛ و #: $p<0.05$ در مقایسه با گروه سوم . مقادیر به‌صورت Mean ± SEM ارائه‌شده‌است). گروه اول: کنترل : n=6 گروه دوم: محرومیت غذایی همراه با مواجهه: n=6 ؛ گروه سوم: محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات در موقعیت اجتماعی n=6 ؛ گروه چهارم : محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات در موقعیت اجتماعی در نیم دوره : n=5 گروه پنجم : محرومیت غذایی همراه با عدم ثبات در موقعیت اجتماعی در محیط ایزوله و بدون مواجهه : n=6 و گروه ششم : تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت غذایی :n=5)



تصویر ۱. مقطع عرضی از ناحیه هیپوکامپ در گروه کنترل (A)، گروه محرومیت غذایی (B)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی (C)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت چهار هفته (D)، گروه محرومیت غذایی و ایزوله (E) و گروه عدم ثبات اجتماعی (F). نوک پیکان، نشان‌دهنده تجمع لیپوفوشین بوده، با رنگ قرمز تیره نمایان است (رنگ‌آمیزی long Ziehl Neelsen). بار: 40µm).

گروه ششم: هم‌خانه ناثابت؛ بدون محرومیت غذایی: در این گروه به‌رغم بهره‌مندی از غذای کافی با اعمال استرس عدم ثبات اجتماعی به‌صورت تغییر هم‌خانه، تغییرهای بافتی مشاهده‌شدند؛ این تغییرها شامل گرانول-های لیپوفوشین به میزان زیاد نسبت‌به گروه کنترل؛ (P<0.001 نمودار۱) و نیز بیشترین افزایش میزان آپوپتوز سلولی در مقایسه با سایر گروه‌ها بود (p<0.001؛ نمودار۲ و تصاویر ۱ و ۲ F).

مطابق جدول ۱، مقدار کورتیزول در گروه ششم که از عدم ثبات اجتماعی رنج‌می‌برد، بالاتر از گروه کنترل و نیز بالاتر از سایر گروه‌ها بود، گروه چهارم، رتبه دوم را داشته، لکن در سایر گروه‌های تحت استرس که از محرومیت غذایی رنج‌می‌بردند، میزان کورتیزول بیشتر از گروه کنترل نبود.



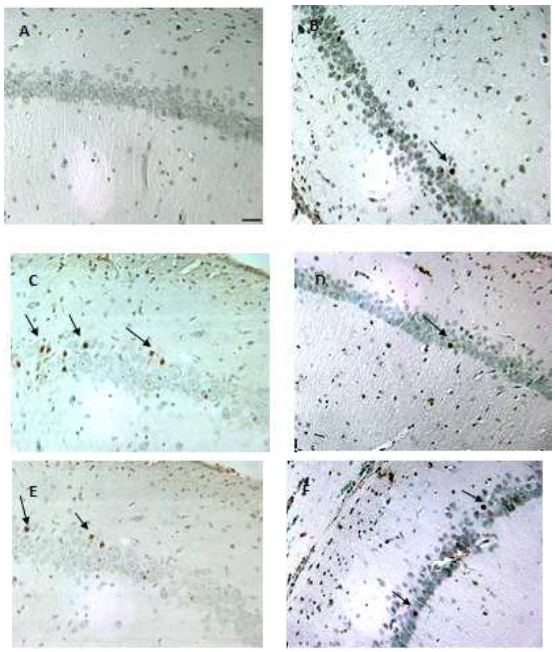
نمودار۲. مقایسه میزان تجمع هسته‌های آپوپتوتیک به‌عنوان شاخصی از پیری زودرس سلولی در گروه های مورد آزمایش : قرارگرفتن خرگوش‌ها در محیط نابرابر اجتماعی یا مواجهه با استرس، را درپی‌داشت تجمع بیشتر هسته‌های آپوپتوتیک در تمامی‌گروه‌های مورد آزمایش نسبت‌به گروه نرمال (کنترل) که در گروه‌های ۲،۳، ۵و ۶ از لحاظ آماری معنی‌دار بود. (: $p<0.005$ و* : $p<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل ؛ و & : $p<0.05$ در مقایسه با گروه ششم . مقادیر به‌صورت Mean ± SEM ارائه‌شده‌است. گروه اول: کنترل : n=4 گروه دوم: محروميت غذایی همراه با مواجهه: n=4 ؛ گروه سوم: محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات در موقعیت اجتماعی n=4 ؛ گروه چهارم : محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات درموقعیت اجتماعی در نیم دوره : n=4 گروه پنجم : محرومیت غذایی همراه با عدم ثبات در موقعیت اجتماعی در محیط ایزوله و بدون مواجهه : n=4 و گروه ششم :تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت غذایی :n=4)**

بحث

مقایسه میان گروه‌ها در دو فاکتور پاتولوژیک رنگدانه لیپوفوشین و نیز میزان آپوپتوز سلولی به‌وسیله آزمون ANOVA و تست LSD نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در میان گروه‌های مورد مطالعه بود ($p<0.05$). در این مطالعه، مقایسه گروه‌های تحت استرس با گروه کنترل، گواه بر این بود که هر سه نوع استرس اعمال‌شده، شامل محرومیت غذایی، احساس نابرابری، بی‌عدالتی و تبعیض و عدم ثبات اجتماعی، ایجاد تفاوتی معنی‌دار را در تجمع لیپوفوشین در سلول‌های هیپوکامپ گروه‌های مورد بررسی سبب‌شد؛ به‌نحوی‌که حتی اعمال موقت شرایط مذکور به مدت چهار هفته و زدوده‌شدن شرایط استرسی پس از آن نتوانستند آثار رسوب لیپوفوشین ایجادشده در همان دوره موقت را بزدایند. (مقایسه گروه چهارم با گروه کنترل $p<0.001$) در تأیید نتایج حاصل از این تحقیق، مطالعه (تلفظ فارسی بیاید)[1] و همکارانش نیز نشان‌داده‌است که موش‌هایی که به مدت سه ماه تحت استرس بودند در مقایسه با موش‌های پیری که تحت استرس نبودند یافته‌های آناتومیکی یکسانی داشتند که شامل ازدست‌رفتن مقادیر قابل‌توجهی از نورون‌های مناطق مختلف هیپوکامپ و افزایش تراکم میکروگلیاها بوده‌است. وی از این یافته نتیجه‌گیری‌می‌کند که استرس مزمن فرایند پیری را در مغز موش‌های جوان تسریع‌کرده‌است (۲)؛ همچنین مطالعات گذشته، پیدایش گرانول لیپوفوشین در شرایط وجود محرومیت در دریافت مواد غذایی در سلول‌های میوکارد را نشان‌داده‌است؛ این موضوع در گروهی که تبعیض را احساس‌می‌کرده از گروهی که فقط محرومیت غذایی داشته، بارزتر بوده‌است (۱۵). بی‌ثباتی در شرایط اجتماعی و تغییر هم‌خانه هم، تسریع در پیدایش گرانول لیپوفوشین را نشان‌داده‌است (۷). محرومیت غذایی، احساس نابرابری و بی‌ثباتی در موقعیت اجتماعی، همچنین افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) در سلول‌های هیپوکامپ را سبب‌شد. ازآنجاکه حتی گروه فاقد محرومیت غذایی (گروه ششم) میزان آپوپتوز افزایش‌یافته‌ای را در مقایسه با گروه کنترل نشان-

1. Sapolsky

دادند، به‌احتمال، نقش استرس بی‌ثباتی اجتماعی در آپوپتوز از سایر استرس‌ها بارزتر است اگرچه استرس محرومیت غذایی نیز به‌طور مستقل به افزایش مرگ سلول-های هیپوکامپ منجرشده‌است. مهم‌ترین یافته ما در این مطالعه این است که تحت شرایط نابرابری و بی‌ثباتی اجتماعی، شکل‌گیری گرانول‌های لیپوفوشین و نیز آپوپتوز در سلول‌های هیپو کامپ تسریع شده‌است و به‌خصوص در شرایط فقدان ثبات اجتماعی، ایجاد این تغییرها حتی از فقر و محرومیت غذایی نیز بیشتر بوده‌است. جالب‌تر اینکه ناپایداری اجتماعی حتی در صورت عدم محرومیت از غذا سبب هر دو نوع ضایعات بافتی شد.



تصویر ۲. مقطع عرضی از ناحیه هیپوکامپ در گروه کنترل (A)، گروه محرومیت غذایی (B)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی (C)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت چهار هفته (D)، گروه محرومیت غذایی و ایزوله (E) و گروه عدم ثبات اجتماعی (F). نوک پیکان به هسته‌های آپوپتوتیک اشاره‌دارد. (روش TUNEL Assay).بار: 40µm

جدول شماره ۱. مقادیر میانگین کورتیزول سرمی(mg/dl). گروه کنترل (A)، گروه محرومیت غذایی (B)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی (C)، گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت چهار هفته (D)، گروه محرومیت غذایی و ایزوله (E) و گروه عدم ثبات اجتماعی(F).

گروه ها	A	B	C	D	E	F
میانگین(mg/dl)	۱/۷۱	۱/۴	۲/۳	۱/۷	۰/۸۵	۲/۳

اولین هدف ما در این مطالعه، مقایسه میان تجمع گرانول‌های لیپوفوشین و نیز افزایش آپوپتوز به‌عنوان یک نشان‌گر مهم بافتی از حضور استرس اکسیداتیو مداوم در دو موقعیت مختلف از استرس اجتماعی بوده‌است. مقایسه گروهی که محرومیت غذایی به همراه ناپایداری در شرایط اجتماعی داشتند، اما حیوان، این استرس‌ها را در محیطی تحمل‌می‌کرد که سایر حیوان‌های بهره‌مند از رفاه و آرامش نیز وجودداشتند (گروه سوم) با گروهی که در همین شرایط ولی در محیط ایزوله قرارداشتند (گروه پنجم) نشان‌داد که میان این دو گروه (سوم و پنجم) تجمع لیپوفوشین در گروه سوم بیشتر است ($P<0.05$ در مقایسه گروه پنجم با گروه سوم)؛ مطلب مهم این است که با وجود آنکه این دو گروه از نظر محرومیت غذایی و موقعیت اجتماعی در شرایطی مشابه بوده‌اند، تفاوت در احساس نابرابری و تبعیض است. به-نحوی‌که در گروهی که بهره‌مندی سایر حیوان‌های غیر-

محروم را مشاهده‌می‌کرده‌است در مقایسه با گروهی که در محیط ایزوله قرارداشته‌است، پیدایش بارزتر گرانول-های لیپوفوشین و نیز افزایش میزان آپوپتوز، نشان‌دهنده آسیب بیشتر مرتبط با استرس اکسیداتیو و پیدایش روندی زودرس از کهولت در سلول‌های هیپوکامپ گروه مذکور است؛ این نتیجه تا حدودی می‌تواند اثر بارز «شاهد نابرابری‌بودن» را در این گروه توجیه‌کند (نمودارهای ۱و۲). مطالعه *مجرب و همکاران* نیز در تأیید مطالعه حاضر نشان‌می‌دهد که احساس نابرابری در دریافت مواد غذایی در ایجاد تغییرهای بافتی و افزایش رسوب لیپوفوشین در سلول‌های قلب خرگوش مؤثر بوده‌است (۷)؛ همچنین تفاوت حافظه و یادگیری در موش‌های تحت استرس‌های مزمن روانی و تأثیر احساس نابرابری اجتماعی در مقایسه با موش‌های بهره-مند از ثبات وضعیت اجتماعی نشان‌داده‌شده‌است (۸).

مقایسه گروه دوم با سوم نشان‌داد در گروه سوم تجمع گرانول لیپوفوشین بیشتر و از نظر آماری معنی‌دار ($p<0.05$) است؛ هر دو این گروه‌ها از محرومیت غذایی رنج‌می‌برده و درعین‌حال در کنار سایر گروه‌ها بوده و نابرابری را نیز شاهد بوده‌اند ولی در ثبات موقعیت اجتماعی (یعنی تغییر هم‌خانه؛ در گروه دوم در سرتاسر دوره هم‌خانه ثابت داشتند و درگیری‌های درون‌گروهی آنها در پایین‌ترین سطح بود برخلاف گروه سوم که هم-خانه‌ها هر دو هفته یک‌بار تغییرمی‌کردند) تفاوت‌داشته-اند. تفاوت مشاهده‌شده در میزان تجمع لیپوفوشین، این احتمال را مطرح‌می‌کند که ثبات موقعیت اجتماعی و آرامش درون‌گروهی در گروه دوم توانسته‌است اثر تنش ناشی ار محرومیت غذایی را به حداقل برساند (نمودار ۱). افزایش معنی‌دار تجمع گرانول‌های لیپوفوشین در گروه سوم در مقایسه با گروه دوم که فاقد استرس‌های درون‌گروهی بوده‌اند ($p<0.05$) نشان‌می‌دهد که عدم پایداری در شرایط اجتماعی حتی بدون محرومیت غذایی توانسته‌است در مقام منبعی استرس‌زا در تجمع لیپوفوشین‌ها عمل‌کند و به این ترتیب، زمینه را برای پیری زودرس سلولی فراهم‌آورد؛ این مطلب، نتیجه‌ای مهم در این مطالعه محسوب می‌شود (تصویر ۱). مقایسه دو گروه دوم و ششم و همچنین گروه ششم با گروه اول (کنترل) نیز این مطلب را تأییدمی‌کند. گروه ششم هیچ-گونه محرومیت غذایی نداشت (تفاوت با گروه دوم) اما هم‌خانه آنها هر دو هفته یک‌بار عوض می‌شد (تفاوت با گروه کنترل). تجمع لیپوفوشین بسیار بالا در این گروه مشهود و نیز میزان آپوپتوز آن بیش از سایر گروه‌هاست ($p<0.005$ در مقایسه با کنترل)؛ مطلب یادشده، بیانگر این است که «عدم پایداری در شرایط اجتماعی» عاملی مهم در تجمع گرانول پیگمنتی لیپوفوشین و نیز عاملی مهم‌تر در جهت پیشبرد آپوپتوز درون بافت است (تصاویر ۱ و ۲ F و نمودار ۲)؛ در بررسی میزان کورتیزول سرم نیز تفاوت‌هایی در میان گروه‌ها مشاهده-شد که به‌رغم اینکه از نظر آماری معنی‌دار تلقی‌نمی-شود، واجد اهمیت به‌نظرمی‌رسد. سطح کورتیزول سرمی‌در گروه ششم با میانگین ۲/۳۴ میکروگروم در دسی‌لیتر، بالاترین میزان نشان‌داده‌شد. سطح کورتیزول سرم در گروه ۶ با گروه شاهد و گروه‌های محروم از غذا نیز متفاوت است؛ به‌احتمال می‌توان چنین نتیجه‌گرفت که در اثر عدم ثبات اجتماعی، در مکانیسم فیدبک منفی تنظیم ترشح کورتیزول اختلال رخ‌داده و فیدبک منفی تنظیم ترشح در آن به‌خوبی اتفاق‌نمی‌افتد (جدول ۱).

در گروه چهارم استرس‌های مذکور در نصف دوره اعمال‌شد؛ در این گروه، تجمع بیشتر لیپوفوشین در مقایسه با گروه کنترل ($p<0.001$) مشاهده‌شد و این مطلب تأییدکننده اثر مداخلات مزبور، حتی در همان مدت کوتاه است به‌نحوی‌که حذف این استرس‌ها در مدت چهار هفته (حیات پس از دوره استرس) نتوانسته لیپوفوشین انبارشده در سیتوزول را بزداید (نمودار ۱).

به‌طورکلی، محرومیت غذایی، احساس تبعیض و نابرابری در دریافت مواد غذایی، ایزوله‌شدن و نیز عدم ثبات در موقعیت اجتماعی هریک به درجاتی، افزایش شدت تجمع پیگمانت لیپوفوشین و تسریع روند آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ حیوان‌های تحت استرس مزمن روانی–اجتماعی را سبب‌شده‌اند؛ این موضوع در گروهی

که تبعیض را احساس‌می‌کرده نسبت‌به گروهی که فقط محرومیت غذایی داشته، بارزتر بوده‌است.

نتیجه‌گیری

از سال‌ها پیش، بافت‌شناسان گرانول‌های پیگمنتی لیپوفوشین را درون سلول‌های عصبی مشاهده‌کردند که به موازات افزایش سن در حیوان و انسان افزایش‌می‌یافتند. انباشتگی درون‌سلولی این پیگمنت‌ها درخصوص سن، ناشی از تغییرهای بارز در فیزیولوژی سلول و انحطاط و عدم توانایی سلول در پالایش این پیگمان، اساس پدیده پیری دانسته‌شداست؛ همچنین تجمع نورونی گرانول‌های لیپوفوشین در شرایط استرس پایدار در سلول‌های عصبی به‌وقوع‌می‌پیوندد؛ تفاوت در حضور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایه انباشتگی ضایعات و ترکیب‌های سلولی اکسیداتیو مانند لیپوفوشین است؛ بنابراین لیپوفوشین می‌تواند مارکری (معیاری) برای ارزیابی ضایعات مداوم اکسیداتیو در سلول تلقی‌شود؛ همچنین در این مطالعه نشان‌داده‌شد، «عدم پایداری در شرایط اجتماعی» عاملی مهم در تجمع گرانول پیگمنتی لیپوفوشین و نیز عاملی مهم‌تر در جهت پیشبرد آپوپتوز درون بافت است. عدم پایداری در شرایط اجتماعی حتی بدون محرومیت غذایی توانسته‌است به‌عنوان منبعی استرس‌زا در تجمع لیپوفوشین‌ها عمل‌کند و به این ترتیب، زمینه را برای پیری زودرس سلولی فراهم‌آورد؛ لذا استرس‌های طولانی‌مدت اجتماعی، نظیر محرومیت غذایی، احساس نابرابری و تبعیض، عدم ثبات در موقعیت اجتماعی و تغییر در مکان زندگی و هم‌خانه می‌تواند ایجاد استرس اکسیداتیو و بروز پیری زودرس در سلول‌های هیپوکامپ را زمینه‌سازی‌کند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، بخشی از یافته‌های پژوهشی طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. ضمن تشکر و قدردانی از مسئولان مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی از همکاری گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، جناب آقای دکتر *محسن خلیلی* و سرکار خانم *فریبا انصاری* همچنین بخش آناتومی‌این دانشکده که ما را در انجام مراحل عملی این پژوهش یاری‌کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی‌می‌کنیم.

منابع

1. Lupien SL, King, Meaney MJ, McEwen BS. Can poverty get under your skin? Basal cortisol levels and cognitive function in children from low and high SES .Development and psychopatology.2001; 13:653-76.
2. Sapolsky R. Timing stress .Sci Am.2003; 289:87-95.
3. Terman A, Brunk UT., 2006.Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage' and aging. Antioxid Redox Signal 8, 197–204.
4. Terman A, Brunk UT, 2004.Aging as a catabolic malfunction. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 36, 2365-2375.
5. Terman A. 2007.Autophagy, organelles and aging. Journal of Pathology 211,134-1435.
6. Kurz T, Terman A, Brunk U. Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. Archives of Biochemistry and Biophysics.2007; 462:220-230.
7. Mojarab SH, Vaez Mahdavi MR, Roghani M ,Safarpour AR, Tiraihi T, Faghihzadeh S. Effect of food inequality and unstable social status on myocardial cells of male rabbits. World applied sciences.2010; 8:680-686.
8. Vaez Mahdavi MR, Rogani M, Kallili M, Dalir R, 2009.The effect of food restriction on learning and memory of male Wister rat. Behavioral Analysis. Iranian Journal of Neuroscience 1, 29-33.
9. Zhang L, Zhou R, Ursano RJ, Li H. 2006. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling. Medical Hypotheses 66, 1205-1208.
10. Roffe C. Ageing of heart. Br. J.Biomed. Sci. 1998; 55: 136-148.
11. Lucassen PJ, Vollmann Honsdorf, GK, Gleisberg M. 2001. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree. European Journal of Neuroscience 14, 161-166.
12. Brosnan S, Waal F. Monkeys Reject Unequal Pay. Nature 2003; 425: 297-299.
13. Kaplan JR, Manuck SB, Clarkson TB, Lusso FM, Taub DM. Social Status, Environment, and Atherosclerosis in Cynomonglus Monkeys. Arteriosclerosis 1982; 2: 359-368.
14. Philip M, et al. Social Environment Influences the Progression of Arthrosclerosis in the Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit. Circulation 2002; 105: 354-359.
15. Heidary F, Vaez Mahdavi M.R. et al. Food Inequality Negatively Impacts Cardiac Health in Rabbits. Plos One 2008; 3: 11: e3705.

Daneshvar

Medicine

The effect of unstable social status, deprivation and inequality in food intake on histopathological changes of hippocampal neurons of Newzealand rabbits

Fatemeh Moradi[1], Shahnaz Mojarab[2], Mohammad Reza Vaez Mahdavi[3*], Abolhassan Ahmadiani[4], Mehrdad Roghani[5], Ali Reza Delshad[6], Taghi Altiraihi[7]

1.Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. School of Basic Sciences,Shahed University,Tehran,Iran
3. Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, and Equity and Health Research Department, Shahed University, Tehran, Iran,
4. Department of pharmacology, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, , Shahed University, Tehran, Iran
6. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
7. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E-mail: vaezmahdavi@shaded.ac.ir

Received: 22/11/2011
Last revised: 19/2/2012
Accepted: 4/3/2012

Abstract

Background and Objective: Based on both laboratory animal and human society studies, inequality in food intake and social instability has adverse effects on individuals and community health. However, it is not known whether social instability, food deprivation and food inequality affect neuronal death and premature aging in young animals. To address this question, the effect of food deprivation, food intake inequality with or without unstable social status was evaluated and histopathological changes in hippocampal pyramidal cells and aging process were investigated .

Materials and Methods: Forty eight Newzealand white male rabbits were divided into six groups and different social situations were applied to some groups during eight weeks. After the end of the period of the experiment, lipofuscin accumulation and apoptosis as main markers of aging were studied by long Ziehl Nelseen staining and the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay in the hippocampal pyramidal cells, respectively. Serum cortisol level was also measured.

Results: The simultaneous application of the mentioned situations (i.e. food deprivation, social inequality and instability) caused a significant change in lipofuscin accumulation in the hippocampal pyramidal cells in comparison with the control group ($p<0.005$). The results also showed a significant increase in ratio of apoptotic to normal cells in all of the stressed groups compared with control ($p<0.05$).

Conclusion: These findings suggest that food deprivation, inequality in food intake and social instability can enhance the apoptosis rate of hippocampal pyramidal cells through increasing lipofuscin accumulation.

Key words: Social instability, Food inequality, Food deprivation, Lipofuscin, Hippocampus, Apoptosis