فقر غذایی، محیط ایزوله و فقدان ثبات اجتماعی سبب افزایش تجمع لیپوفشین و القای مرگ سلولی در سلول‌های کبدی می‌گردد

فاطمه مرادی [۱،۲](M.Sc)، محمدرضا واعظ‌مهدوی [*۱](Ph.D)، ابوالحسن احمدیانی [۲](Ph.D)، مهرداد روغنی [۱](Ph.D)، تقی الطریحی [۳](Ph.D)، علیرضا دلشاد [۴](Ph.D)، شهناز مجرب [۵](M.Sc)

۱- *دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فارماکولوژی*

۳- *دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، بخش آناتومی*

۴- *دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، بخش آناتومی*

۵- *دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، بخش فیزیولوژی*

چکیده

سابقه و هدف: بر طبق مطالعات انسانی، نابرابری و بی‌عدالتی اجتماعی، آثار نامطلوبی بر سطح سلامت افراد و جامعه به‌جا می‌گذارد. اما به خوبی نمی‌دانیم که آیا عدم ثبات اجتماعی و نابرابری غذایی بر پیری زودرس و مرگ سلول‌های کبدی تاثیر دارد یا نه؟ جهت پاسخ به این سوال در مطالعه حاضر، اثرات نابرابری در دریافت مواد غذایی به همراه و یا عدم همراه با پایداری در شرایط اجتماعی بررسی شد و در آن تغییرات بافت‌شناسی در سلول‌های کبد و روند پیری سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۴۸ سر خرگوش در شش گروه مختلف با وضعیت‌های اجتماعی متفاوت مورد استفاده قرار گرفت. در پایان مطالعه بافت کبد جدا شد. پس از مراحل پاساژ بافتی، رنگ‌آمیزی اختصاصی لیپوفوشین برای مشاهده میزان تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین و نیز تکنیک تانل جهت مشاهده میزان مرگ سلولی توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت. سطح کورتیزول سرمی نیز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: با اعمال انواع استرس‌ها شامل: محرومیت غذایی در شرایط ایزوله، محرومیت غذایی در حال مشاهده برخورداری سایرین، و عدم ثبات محیط زندگی ناشی از تغییر هم‌خانه، تجمع لیپوفوشین و میزان مرگ سلولی در بافت کبد تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<0/05$). ناپایداری در شرایط اجتماعی چنان چه با محرومیت از غذا همراه گردد، نسبت به شرایطی که صرفاً محرومیت غذایی وجود دارد تجمع بیش‌تری از لیپوفوشین ایجاد می‌کند ($P<0/001$). ناپایداری در شرایط اجتماعی و نیز ایزوله شدن اجتماعی همراه با محرومیت غذایی سبب پیش‌برد آپوپتوز هم می‌گردد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: محرومیت، نابرابری اجتماعی، و عدم ثبات وضعیت اجتماعی باعث تجمع لیپوفوشین به عنوان نشان‌گری از استرس اکسیداتیو و پیری زودرس و نیز افزایش آپوپتوز در سلول‌های کبد خرگوش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: عدالت اجتماعی، محرومیت غذایی، عوامل اجتماعی اقتصادی، لیپوفوشین، پیری، خرگوش ها

مقدمه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۷۷۹۱۱۶ نمابر: ۸۸۹۶۴۷۹۲ - ۰۲۱

Email: mh_mahdavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۷

Archive of SID

www.SID.ir

جامعه به خوبی شناخته شده است اما ارتباط بیولوژیک آن به خوبی توصیف نشده است. نابرابری‌ها و بی‌عدالتی اجتماعی از طریق تأثیر بر فاکتورهای اجتماعی، فیزیولوژیک و محیط روانی که فرد در آن به سر می‌برد بر بیولوژی فرد موثرند [۱]. باور بر این است که افراد متعلق به سطوح اجتماعی بالاتر از سلامت ذهنی و جسمی بهتری نسبت به افراد مشابه در سطوح اجتماعی پایین‌تر، برخوردارند. مکانیسم‌های متعددی جهت توضیح ارتباط بین وضعیت اجتماعی– اقتصادی افراد و سلامتی آن‌ها در نظر گرفته شده است. یکی از این مکانیسم‌ها که در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است، پیدایش استرس اکسیداتیو در اثر شرایط نامساعد طولانی‌مدت اجتماعی است. آسیب‌پذیری نسبت به استرس مزمن با فاکتورهای ژنتیکی، روانی و محیطی در ارتباط است و تداخل این فاکتورها در طی عمر به‌ویژه از طریق مسیرهای نوروبیولوژیک بر آسیب‌پذیری افراد تاثیر می‌گذارد [۲]. فرایندهای استرسی موثر بر سلامتی بسته به توانایی و قدرت کنترل و تطابق افراد و نیز وجود سیستم‌های جبرانی می‌توانند "حمایت‌کننده" و یا "آسیب‌رسان" باشند، بر همین اساس جستجوی اثرات استرس‌های اجتماعی بر روی سلامتی موضوع پژوهش‌های متعددی قرار گرفته است [۳،۲]. تحلیل مکانیسم‌های مرتبط با استرس اجتماعی برای درک این‌که چگونه ناملایمات اجتماعی سبب کاهش سلامتی می‌گردد، ضروری است، محققان معتقدند که فقر و محرومیت، یک استرس مزمن محسوب می‌شود. احساس بی‌عدالتی و نابرابری‌ها و بی‌ثباتی اجتماعی نیز با تعدادی از عوامل ایجادکننده استرس در ارتباط است. سطح پایین اقتصادی اجتماعی نه تنها افراد را در معرض استرس‌های حاد بزرگ‌تری قرار می‌دهد بلکه شانس مواجهه با استرس‌های مزمن را نیز بالا می‌برد [۳].

استرس‌های اجتماعی، باعث ایجاد سطح پایداری از تغییرات سیستم‌های مختلف، از جمله سیستم‌های متابولیکی در بدن می‌شوند. در بین اعضاء و اندام‌های مختلف دخیل در فرایندهای متابولیکی، به نظر می‌رسد ارتباط منفی بین استرس و شیوع بیماری‌های کبدی وجود دارد [۴]. به عنوان مثال افراد مبتلا به هپاتیت C اغلب اظهار می‌کنند که تجربه یک دوره استرس معمولاً به آشکار شدن ناگهانی علائم بیماری‌شان انجامیده است [۵]. مطالعات مربوط به ارتباط طبقه اجتماعی و سلامتی بیان می‌کنند که حیوانات متعلق به طبقات متفاوت اجتماعی، الگوهای متفاوتی از استرس را تجربه می‌کنند [۶]. هم‌چنین با به کارگیری چندین مدل حیوانی ارتباطی بین استرس و بیماری کبدی توسط محققان علوم پایه پیشنهاد شده است [۷]. استرس‌های روانی– اجتماعی ساخت و تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد را القا می‌کند که سبب استرس اکسیداتیو می‌شود. یکی از مهم‌ترین فراورده‌های افزایش رادیکال‌های آزاد، رنگ‌دانه لیپوفوشین است که از عمده‌ترین عوامل القاکننده آسیب و نهایتاً مرگ سلولی در اثر استرس اکسیداتیو است [۸]. مطالعات متعدد به‌خوبی افزایش تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین را در بافت‌های تحت روند پیر شدن نشان داده‌اند [۱۰،۹]. تجمع هم‌راه با افزایش سن این رنگ‌دانه، در سیتوپلاسم برخی دیگر از بافت‌ها از قبیل سیستم عصبی مرکزی، شبکیه، عضلات اسکلتی، کبد و قلب مشاهده شده و لذا به عنوان یک معیار مهم از روند پیری در نظر گرفته شده است [۱۳–۱۱] بر این اساس مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بیولوژیک بین استرس و تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجادکننده روند پیری و نیز ارزیابی اثرات ناشی از تفاوت سطح اجتماعی و فقر و نابرابری دریافت مواد غذایی بر بافت‌ها طراحی شد و پاسخ به این سوال مهم که "آیا فعال شدن مزمن استرس‌ها به ویژه استرس‌های روانی– اجتماعی در افراد می‌تواند باعث تسریع روند پیری شود؟" به عنوان محور عمده پژوهش قرار گرفت. در این راستا به‌دنبال مطالعات گذشته در مورد اثرات استرس‌های مزمن– اجتماعی بر روی بافت قلب و مغز در خرگوش سفید نیوزلندی در مطالعه حاضر مدل حیوانی جدیدی از بی‌ثباتی اجتماعی نیز اعمال شد، سپس تجمع لیپوفوشین و میزان آپوپتوز (به عنوان دو معیار مهم استرس اکسیداتیو و کهولت سلولی) در

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های کبد و نیز میزان کورتیزول سرمی خرگوش‌های تحت استرس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوان‌های مورد مطالعه ۴۸ سر خرگوش نر سفید نیوزلندی با میانگین وزنی ۲ تا ۳ کیلوگرم و با سن ۸ الی ۱۰ ماه بودند. حیوانات در دمای ۲۱°C و با دوره روشنایی ۱۲ ساعته در قفس‌هایی از جنس پلکسی‌گلاس قرار گرفتند. در مدتی به میزان دو هفته قبل از مطالعه خوراک روزانه آن‌ها وزن می‌شد و محدودیتی به لحاظ دریافت غذا و آب نداشتند. کار با حیوانات بر طبق قوانین و ملاحظات اخلاقی مصوب دانشگاه شاهد و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت و چهار استرس مختلف به شرح زیر به مدت هشت هفته در گروه‌های آزمایش اعمال شد:

محرومیت از غذای کامل روزانه که با اندازه‌گیری اولیه میزان غذای روزانه در حیوان و کاهش آن به میزان یک سوم (برای هر حیوان ۵۰ گرم) در نظر گرفته شد.

تغییر در موقعیت اجتماعی از طریق «فقدان هم‌خانه ثابت» به طوری که هر دو هفته یک بار هم خانه حیوان تغییر می‌کرد و حیوان مجبور بود خود را با شرایط سکونت جدید هماهنگ کند.

قرار گرفتن حیوان‌های محروم از غذای کامل هم‌راه با بی‌ثباتی اجتماعی در اتاقی جدا که غذا خوردن دیگران را نمی‌دیدند (گروه ایزوله) [۱۴،۱۳].

محرومیت از غذای کامل هم‌راه با تغییر هم‌خانه (محرومیت غذایی هم‌راه با بی‌ثباتی اجتماعی.

گروه‌های آزمایشی:

گروه ۱، گروه کنترل. هیچ‌گونه استرسی به این گروه اعمال نمی‌شد و در تمام طول دوره مطالعه از غذای کامل برخوردار بوده و هم‌خانه ثابت داشتند. گروه شاهد در کنار سایر گروه‌ها در یک اتاق قرار داشت. هر حیوان بدون محدودیت (به میزان ۱۵۰ گرم در روز) غذا دریافت می‌کرد.

گروه ۲. گروه محرومیت از غذا + مواجهه: محروم از غذای کامل بود. هر حیوان در روز ۵۰ گرم (معادل یک سوم) گروه کنترل غذا دریافت می‌کرد ولی هم‌خانه آن‌ها ثابت بود. و در کنار سایر گروه‌ها قرار داشتند.

گروه ۳. گروه محرومیت از غذا + مواجهه + تغییر در موقعیت اجتماعی: محروم از غذای کامل بودند. هر حیوان در روز ۵۰ گرم غذا دریافت می‌کرد. هم‌خانه آن‌ها ثابت نبود و هر دو هفته یک بار مکان حیوان تغییر می‌کرد و در کنار حیوان جدید از گروه خود قرار می‌گرفت. این گروه نیز در کنار سایر گروه‌ها در اتاق قرار داشتند.

گروه ۴. اعمال استرس‌ها در نصف دوره: شرایطی مانند گروه سوم داشتند با این تفاوت که هر سه استرس گفته شده یعنی محرومیت از غذای کامل، نداشتن هم‌خانه ثابت و قرار گرفتن در کنار گروه‌های برخوردار از غذا تنها در نصف دوره مطالعه اعمال شد.

گروه ۵. گروه محرومیت از غذا + تغییر در موقعیت اجتماعی؛ بدون مواجهه: محروم از غذای کامل بودند یعنی ۵۰ گرم غذا برای هر حیوان، هم‌خانه حیوان در گروه ثابت نبود و هر دو هفته یک بار تغییر می‌کرد. حیوان‌های این گروه در اتاق ایزوله قرار داشتند درب اتاق بسته بود. به طوری که بوی غذای گروه‌های برخوردار از غذا به درون اتاق راه پیدا نکند.

گروه ۶. گروه تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت از غذا: برخوردار از غذای کامل بودند. ولی هم‌خانه آن‌ها مرتب تغییر می‌کرد (هر دو هفته یک بار) و در کنار چهار گروه دیگر قرار داشتند.

آماده‌سازی بافت‌ها و بررسی نمونه‌ها. پس از پایان هشت هفته دوره آزمایش، در حیوانات تحت بی‌هوشی با اتر پرفیوژن بافتی انجام گرفت به این ترتیب که با وارد کردن کتتر به بطن چپ حیوان ابتدا با محلول سالین ۹ درصد بافت‌ها را شستشو داده و سپس با محلول فیکساتیو ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار بافت‌ها فیکس شدند. پس از آن کبد حیوان را به طور کامل بیرون آورده توزین گردید. مراحل پردازش بافتی جهت آب‌گیری انجام شد سپس بلوک پارافینی

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه شد. به منظور انجام تکنیک رنگ‌آمیزی اختصاصی Long Ziehl- Neelsen جهت مشاهده لیپوفوشین، از هر حیوان حداقل ۵ برش عرضی به ضخامت چهار تا پنج میکرون آماده شد. تفاوت بارزی در تجمع رنگ‌دانه‌های لیپوفوشین در نمونه‌ها مشاهده گردید و بر حسب شدت تجمع رنگ‌دانه‌های لیپوفوشین بین صفر تا ۴ نمره‌دهی شدند. نمره‌دهنده از نحوه گروه‌بندی حیوانات اطلاعی نداشت. در ادامه از اعداد به‌دست آمده یک میانگین برای هر حیوان حاصل شد و در نهایت میانگین هر گروه محاسبه شد.

بررسی آپوپتوز. جهت بررسی‌های میزان تجمع هسته‌های آپوپتوتیک آزمایش ایمونوهیستو شیمی با روش TUNEL مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور برش‌های عرضی از بافت کبد به ضخامت پنج میکرون توسط میکروتوم تهیه شد. پس از زدودن پارافین و آب‌دهی با الکل‌های نزولی از محلول هیدروژن پراکسیداز ۳ درصد جهت مهار آنزیم هیدروژن پراکسیداز آندوژن استفاده شد. سپس جهت افزایش نفوذپذیری غشا proteinase k به غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. در این مرحله از محلول حاوی آنزیم نوکلئوتید ترانسفراز کیت TUNEL جهت پیدا کردن نقاط آپوپتوتیک کمک گرفته و نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی به ترتیب با محلول‌های حاوی DNase1 و محلول حاوی حلال آنزیم نوکلئوتید ترانسفراز تست شدند. در ادامه، پس از استفاده از محلول convertor و ترکیب DAB، آب‌گیری بافتی با الکل‌های صعودی و زایلول، با استفاده از چسب انتلان، لامل‌گذاری صورت گرفت و پس از خشک شدن 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 X ۱۰۰ شمارش شده و سپس درصد سلول‌های آپوپتوتیک به‌دست آمد در ادامه میانگین هر حیوان و سپس هر گروه به‌دست آمد و مبنای محاسبات قرار گرفت.

اندازه گیری کورتیزول. جهت بررسی میزان کورتیزول سرم نمونه خون از تمامی حیوانات مورد مطالعه بین ساعات ۱۰-۱۱ صبح از قلب حیوانات قبل از پرفیوژن تهیه شد. سپس نمونه تهیه شده، به مدت ۵ دقیقه و با دور ۵۰۰۰ دور در دستگاه سانترفیوژ قرار گرفت. پس از جداسازی سرم نمونه‌ها، اندازه‌گیری سطح کورتیزول سرمی با استفاده از کیت کورتیزول از شرکتCobas و تکنیک الکتروکمولمینوسانس توسط دستگاه الکسیس ۲۰۱۰ انجام شد.

بررسی آماری. داده‌ها به صورت Mean+SEM نشان داده شده‌اند. اطلاعات آماری توسط نرم‌افزار SPSS/16 تحلیل گردید و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن با تست LSD انجام شد. تغییرات در گروه‌ها با p value<0.05 به لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

۱- لیپوفوشین:

گروه اول (کنترل). نمونه‌های تهیه شده از حیوانات این گروه دارای حداقل و یا حتی بدون هیچ اثری از لیپوفوشین بود (شکل A۱).

گروه دوم. دراین گروه تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) (شکل B۱ و ۲).

گروه سوم: در این گروه تجمع رنگ‌دانه لیپوفوشین به میزان بسیار زیاد وجود داشت (P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، و p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲) (شکل C۱ و۲).

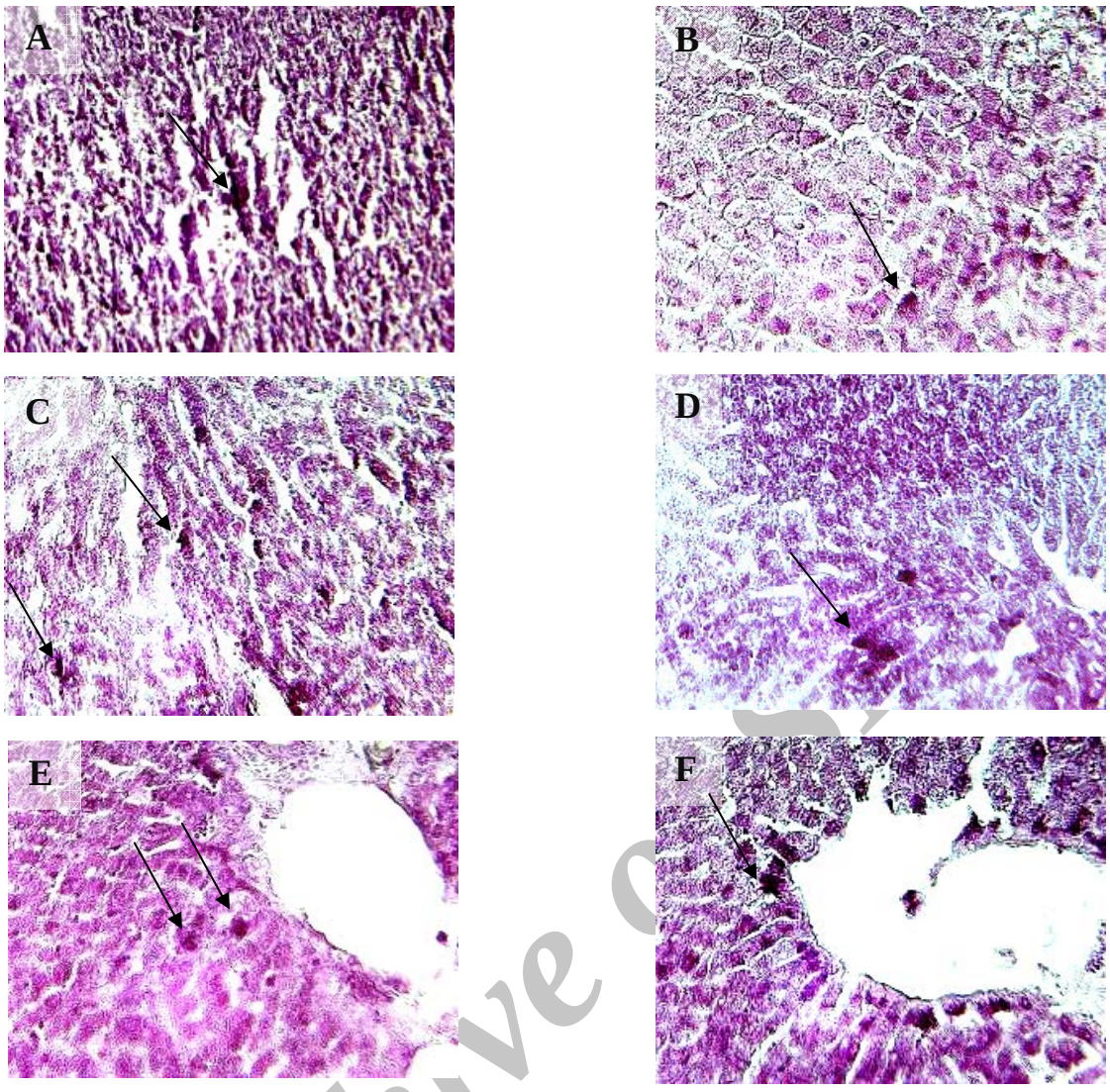
گروه چهارم. در این گروه نیز ما شاهد تجمع زیاد گرانول لیپوفوشین بودیم (P<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل، p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲ و ۳) (شکل D۱ و ۲).

گروه پنجم. در این گروه لیپوفوشین بیش‌تری نسبت به گروه کنترل و نیز گروه ۲ تجمع‌یافته (P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲ و ۳ (شکل E۱ و ۲).

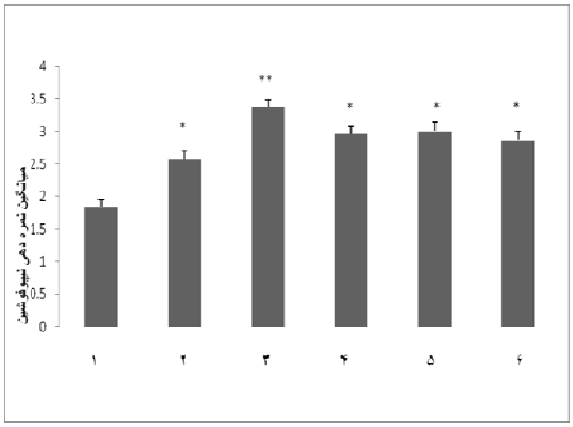
گروه ششم. تغییرات بافتی مشاهده شده در این گروه شامل گرانول‌های لیپوفوشین به میزان زیاد، (P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل؛ و p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۳) (شکل F۱ و ۲)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. مقطع عرضی از بافت کبد در گروه کنترل (A) و گروه محرومیت غذایی (B) گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی (C) گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت ۴ هفته (D) گروه محرومیت غذایی و ایزوله (E) گروه عدم ثبات اجتماعی(F). نوک پیکان نشان دهنده تجمع لیپوفوشین است که به رنگ قرمز تیره نمایان است. (رنگ آمیزی**long Zeihl Neelsen**،۴۰×)



شکل ۲. مقایسه میزان پیدایش رنگدانه لیپو فوشین به عنوان شاخصی ازپیری زودرس سلولی درسلول های کبدی گروه های مورد آزمایش : قرارگرفتن خرگوش ها در محیط نابرابر و فاقد ثبات اجتماعی ویا مواجهه با استرس محرومیت غذایی، باعث تجمع بیشتر رنگدانه لیپوفوشین در تمامی گروه های مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل گردید.

(❊❊ : $p<0.001$ و* : $p<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل. . مقادیر به صورت Mean ± SEM ارائه گردیده است. گروه ۱: کنترل :n=8 گروه ۲: محروميیت غذایی همراه با مواجهه: n=8 ؛ گروه۳: محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات در موقعیت اجتماعی n=8 ؛ گروه ۴ : محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات درموقعیت اجتماعی درنیم دوره : n=8 گروه ۵ : محرومیت غذایی همراه با عدم ثبات در موقعیت اجتماعی در محیط ایزوله و بدون مواجهه: n=8 ؛ گروه۶ :تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت غذایی n=8)

Archive of SID
www.SID.ir

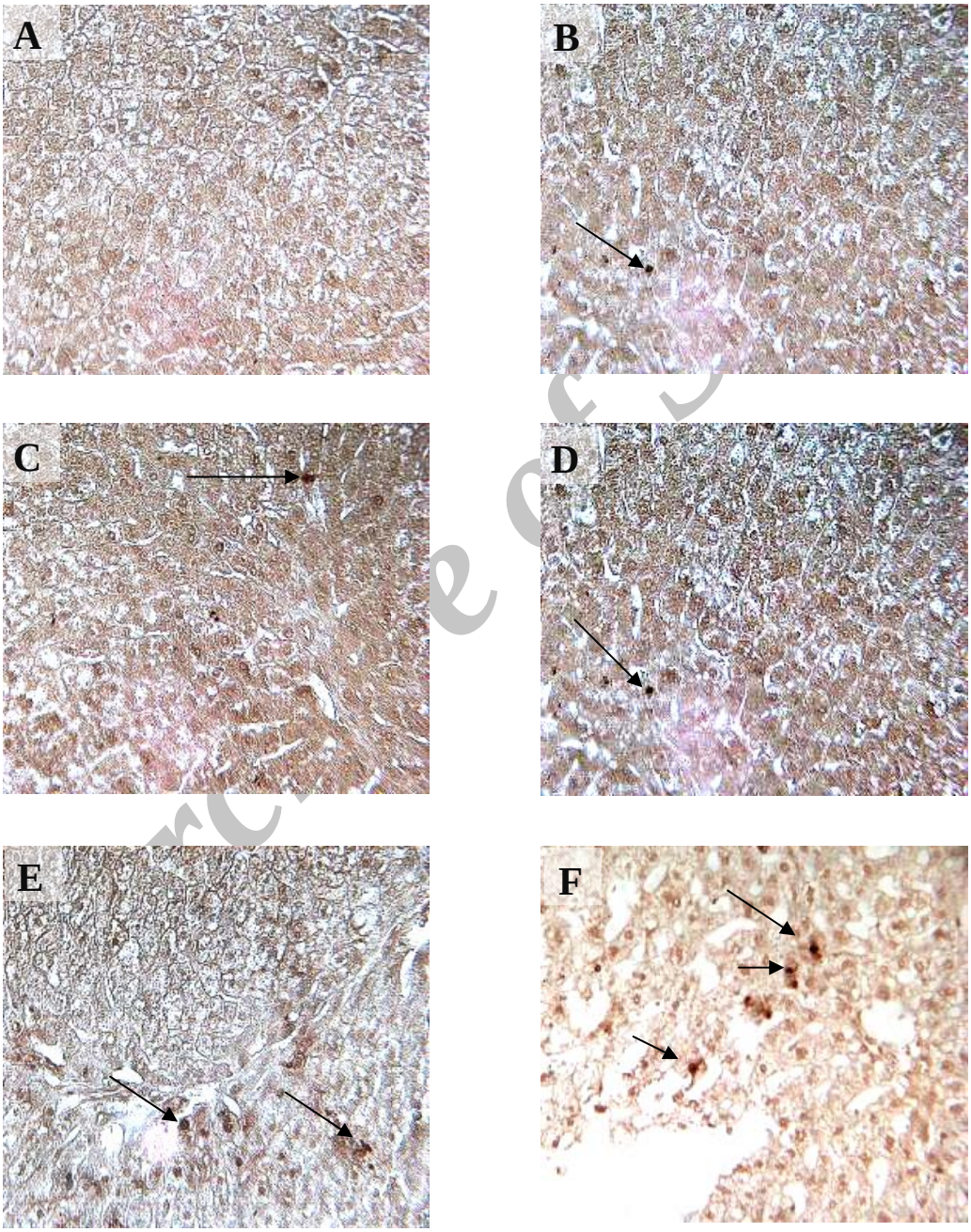
۲- آپوپتوز:

گروه اول (کنترل): نمونه‌های تهیه شده از حیوانات این گروه دارای حداقل و یا حتی بدون هیچ اثری از آپوپتوز بافتی بود. (شکلA۳).

گروه دوم: در این گروه نیز حالی که میزان آپوپتوز بافتی بسیار کمی مشاهده شد(شکلB۳).

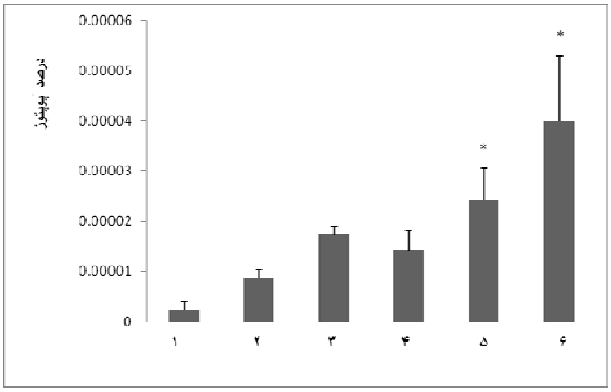
گروه سوم: در این گروه میزان آپوپتوز بافتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نداشته اما نسبت به گروه ۶ به لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (شکلC۳ و ۴).

گروه چهارم: در این گروه نیز ما شاهد میزانی از آپوپتوز بافتی بودیم که با گروه ۶ به لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (شکلD۳ و ۴).



شکل ۳. مقطع عرضی از بافت کبد در گروه کنترل (A) و گروه محرومیت غذایی (B) گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی (C) گروه محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت ۴ هفته (D) گروه محرومیت غذایی و ایزوله (E) گروه عدم ثبات اجتماعی(F). نوک پیکان اشاره به هسته های آپوپتوتیک دارد. (تکنیک TUNEL Assay ،۴۰×)

www.SID.ir



نشکل ۴: مقایسه میزان تجمع هسته های آپوپتوتیک به عنوان شاخصی ازپیری زودرس سلولی در سلول های کبدی گروه های مورد آزمایش : قرارگرفتن خرگوش ها در معرض استرس عدم ثبات اجتماعی ،ایزوله شدن ویا مواجهه با محرومیت، باعث تجمع بیشتر هسته های آپوپتوتیک در گروه های مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل گردید که در گروه های ۵و ۶ بلحاظ آماری معنی دار بود.

(* : $p<0.05$ در مقایسه با گروه . مقادیر به صورت Mean ± SEM ارائه گردیده است. گروه ۱: کنترل :n=8 گروه ۲: محرومییت غذایی همراه با مواجهه: n=8 ؛ گروه۳: محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات در موقعیت اجتماعی n=8 ؛ گروه ۴ : محرومیت غذایی همراه با مواجهه و عدم ثبات درموقعیت اجتماعی درنیم دوره : n=8 گروه ۵ : محرومیت غذایی همراه با عدم ثبات در موقعیت اجتماعی در محیط ایزوله و بدون مواجهه : n=8 ؛ گروه۶ :تغییر در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت غذایی n=8)

گروه پنجم: در این گروه که از محرومیت غذایی و عدم ثبات اجتماعی رنج می‌برد میزان آپوپتوز سلولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) (شکل۳ E و ۴).

گروه ششم: میزان آپوپتوز سلول‌های کبدی در این گروه بیش از سایر گروه‌ها بود (p<۰/۰۵ در مقایسه با کنترل) (شکل F۳).

۳-کورتیزول:

مطابق جدول ۱ مقدار کورتیزول در گروه ششم که از عدم ثبات اجتماعی رنج می‌برد بالاتر از گروه کنترل و نیز بالاتر از سایر گروه‌ها بود، گروه چهارم رتبه دوم را داشته و در سایر گروه‌های تحت استرس که از محرومیت غذایی رنج می‌بردند میزان کورتیزول کم‌تر از گروه شاهد بود.

جدول ۱. مقادیر میانگین کورتیزول سرمی(µg/dl)در گروه های آزمایش

گروه ها	میانگین (µg/dl)
کنترل	۱/۷۱
محرومیت غذایی	۱/۴
محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی	۲/۳
محرومیت غذایی+ عدم ثبات اجتماعی به مدت ۴ هفته	۱/۷
محرومیت غذایی و ایزوله	۰/۸۵
عدم ثبات اجتماعی	۲/۳

برای توضیح بیشتر، به متن مراجعه شود.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه از مقایسه گروه‌های تحت استرس با گروه کنترل به این نتیجه رسیدیم که استرس‌های اعمال شده، شامل محرومیت غذایی، احساس نابرابری یا تبعیض، ایزوله بودن و عدم ثبات اجتماعی، باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در تجمع لیپوفوشین و نیز افزایش میزان آپوپتوز در کبد گروه‌های مورد بررسی شد. به نحوی که حتی اعمال موقت موارد مذکور به مدت تنها دو هفته و زدوده شدن شرایط استرسی پس از آن به مدت چهار هفته نتوانست آثار رسوب لیپوفوشین ایجاد شده در همان دوره موقت را بزداید. (مقایسه گروه ۴ با گروه کنترل p<۰/۰۵) به بیان دیگر افراد با سطوح متفاوت اجتماع و اقتصادی، واکنش‌های متفاوتی نسبت به استرس مزمن اجتماعی از خود نشان می‌دهند. مطالعه ساپولسکی و همکارانش به‌روی جمعیتی از موش‌ها در جهت بررسی نقش استرس در موش‌های جوان نیز موید این نکته بود که موش‌هایی که به مدت سه ماه تحت استرس بودند در مقایسه با موش‌های پیری که تحت استرس نبودند از دست رفتن قابل توجهی از نورون‌های مناطق مختلف هیپوکامپ و افزایش تراکم میکروگلیاها برا نشان دادند و به نظر می‌رسید که استرس مزمن فرآیند پیری را در مغز موش‌های جوان تسریع کرده باشد [۱۴]. توانایی پاسخ مناسب به استرس‌های اکسیداتیو با افزایش سن کاهش می‌یابد. بنابراین سلول‌های پیرتر برای ضایعات اکسیداتیو مستعدتر هستند هم‌چنین تجمع نورونی

Archive of SID
www.SID.ir

گرانول‌های لیپوفوشین در شرایط استرس پایدار در سلول‌های عصبی به وقوع می‌پیوندد. تفاوت در حضور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایه انباشتگی ضایعات و ترکیبات سلولی اکسیداتیو مانند لیپوفوشین است. بنابراین لیپوفوشین‌ها احتمالاً مارکری برای ضایعات مداوم اکسیداتیو در سلول هستند [۱۴،۱۰].

مطالعه مجرب و همکاران نیز در تایید مطالعه حاضر نشان می‌دهد که احساس نابرابری در دریافت مواد غذایی در ایجاد تغییرات بافتی و افزایش رسوب لیپوفوشین در سلول‌های قلب خرگوش موثر است [۱۶،۱۵]. مهم‌ترین یافته ما در این مطالعه این است که تحت شرایط استرس ایجاد شده شکل‌گیری گرانول‌های لیپوفوشین و نیز آپوپتوز در کبد تسریع شده است؛ و به‌خصوص در شرایط فقدان ثبات اجتماعی، ایجاد این تغییرات حتی از فقر و محرومیت غذایی بیش‌تر بوده است. جالب‌تر این است که ناپایداری اجتماعی حتی در صورت عدم محرومیت ازغذا سبب ضایعات بافتی گردید.

مقایسه گروهی که محرومیت غذایی به همراه ناپایداری در شرایط اجتماعی داشتند لیکن حیوان این استرس‌ها را در محیطی تحمل می‌کرد که سایر حیوان‌های برخوردار از رفاه و آرامش نیز وجود داشتند (گروه ۳)، با گروهی که در همین شرایط اما در محیط ایزوله قرار داشتند (گروه ۵)، نشان داد که میان این دو گروه (۳ و ۵) تجمع لیپوفوشین در گروه ۳ بیش‌تر است. ($P<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه۳) مطلب مهم این است که با وجود آن‌که این دو گروه از نظر محرومیت غذایی و موقعیت اجتماعی در شرایطی مشابه بوده‌اند اما تفاوت در احساس محرومیت (در گروهی که سایر حیوانات غیر محروم را مشاهده می‌کرده است در مقایسه با گروهی که در شرایط تغذیه‌ای و اجتماعی مشابه لکن در محیط ایزوله قرار داشته است) پیدایش بارزتر گرانول‌های لیپوفوشین، نشان‌دهنده آسیب بیش‌تر مرتبط با استرس اکسیداتیو و پیدایش روند زودرسی از کهولت در سلول‌های هیپوکامپ گروه مذکور است. این نتیجه تا حدودی می‌تواند اثر بارز «شاهد نابرابری بودن» را در این گروه توجیه کند [دیاگرام ۱]. پیش‌تر نیز تفاوت حافظه و یادگیری در موش‌های تحت استرس‌های مزمن روانی و تاثیر احساس نابرابری اجتماعی در مقایسه با موش‌های برخوردار از ثبات وضعیت اجتماعی نشان داده شده است [۱۷]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که «بی‌عدالتی»، از بسیاری از بیماری‌های خطرناک شناخته شده امروزی آسیب‌زاتر است. در دوران معاصر در کنار پیش‌رفت و توسعه تکنولوژی اختلاف و شکاف طبقاتی عمیق‌تر شده و بی‌عدالتی در میان اقشار جامعه شدت یافته است. ثابت شده است که شکاف طبقاتی، اثر مخربی بر روح و جسم افراد جامعه وارد می‌آورد. در مطالعه‌ای در هندوستان، دو فردی که از همه جهات با یک‌دیگر مشابه بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. یکی از این افراد، در منطقه‌ای زندگی می‌کرد که همه افراد فقیر بودند و فرد دیگر در منطقه‌ای زندگی می‌کرد که افراد از طبقات مختلف اقتصادی و اجتماعی زندگی می‌کردند. به رغم آن‌که این افراد به یک میزان درآمد داشتند و طبعاً می‌توانستند به یک میزان از مواهب ثروت برخوردار شوند، اما امید به زندگی متفاوتی داشتند. "بی‌عدالتی می‌کشد!" نتیجه آن که وضعیت همسایگان افراد در سطح سلامت انسان‌ها اثرگذار است [۱۸]. Essner و Novikoff در سال ۱۹۶۰ در یک مطالعه به‌روی کبد نشان دادند که گرانول‌های لیپوفوشین منشأ لیزوزومی داشته همچنین ارتباطی بین افزایش سن و تجمع لیپوفوشین در نورون‌ها، سلول‌های عضله قلبی، غدد پستانی، بافت بینابینی بیضه‌ها و سلول‌های کبدی تایید شده است [۱۹].

مقایسه گروه ۲ با ۳ نشان داد در گروه ۳ تجمع گرانول لیپوفوشین بیش‌تر و از نظر آماری معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) است. هر دو این گروه‌ها از محرومیت غذایی رنج می‌برده و در عین حال در کنار سایر گروه‌ها بوده و شاهد نابرابری نیز بوده‌اند؛ ولی در ثبات موقعیت اجتماعی (یعنی تغییر هم‌خانه؛ در گروه ۲ در سرتاسر دوره هم‌خانه ثابت داشتند و درگیری‌های درون گروهی آن‌ها حداقل بود بر خلاف گروه ۳ که هم‌خانه‌ها هر دو هفته یک بار تغییر می‌کرد) تفاوت داشته‌اند. تفاوت مشاهده

Archive of SID
www.SID.ir

شده در میزان تجمع لیپوفوشین، این احتمال را مطرح می‌کند که ثبات موقعیت اجتماعی و آرامش درون‌گروهی در گروه ۲ توانسته است اثر تنش ناشی از محرومیت غذایی را به حداقل برساند [دیاگرام ۱]. افزایش معنی‌دار تجمع گرانول‌های لیپوفوشین در گروه ۳ در مقایسه با گروه ۲ که فاقد استرس‌های درون‌گروهی بوده‌اند ($p<۰/۰۵$) نشان می‌دهد عدم پایداری در شرایط اجتماعی حتی بدون محرومیت غذایی توانسته است به عنوان یک منبع استرس‌زا در تجمع لیپوفوشین‌ها عمل کند و به این ترتیب زمینه را برای پیری زودرس سلولی فراهم کند. این مطلب نتیجه‌ای مهم در این مطالعه محسوب می‌شود [تصویر ۱]. مقایسه دو گروه ۲ و ۶ و هم‌چنین گروه ۶ با گروه ۱ (کنترل) نیز این مطلب را تائید می‌کند. گروه ۶ هیچ‌گونه محرومیت غذایی نداشت (تفاوت با گروه ۲) اما هم‌خانه آن‌ها هر دو هفته یک بار عوض می‌شد (تفاوت با گروه کنترل). تجمع لیپوفوشین بسیار بالا در این گروه مشهود بوده و نیز میزان آپوپتوز آن بیش از سایر گروه‌هاست ($p<۰/۰۵$ در مقایسه با کنترل) این مطلب بیانگر این است که «عدم پایداری در شرایط اجتماعی» عاملی مهم در تجمع گرانول پیگمانتی لیپوفوشین و پیش‌برد آپوپتوز درون بافت است [تصویر ۲,۱: F و دیاگرام ۲]. در گروه ۴ استرس‌های مذکور در نصف دوره اعمال شد. تفاوت معنی‌دار در تجمع بیش‌تر لیپوفوشین در مقایسه با گروه کنترل ($p<۰/۰۵$) وجود دارد و این مطلب تائیدکننده اثر مداخلات مزبور حتی در همان مدت کوتاه است به نحوی که حذف این استرس‌ها در مدت چهار هفته پس از دوره استرس نتوانسته از شدت ضایعات بکاهد. [دیاگرام ۱] .

در سال ۲۰۰۶ zhang و هم‌کارانش فرضیه‌ای درباره نقش استرس و اثرات سیگنالینگ کورتیزول در استرس‌های مزمن پیشنهاد کردند. بر طبق این فرضیه، استرس باعث افزایش سطوح کورتیزول می‌شود، کورتیزول ترشح شده از دو مسیر ژنومیک و غیرژنومیک باعث تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود. این تغییرات پتانسیل در نهایت مسیرهای آپوپتوزی را فعال کرده و موجبات مرگ سلولی را فراهم می‌کند [۲۰]. در بررسی سطح کورتیزول سرمی در گروه‌های که از محرومیت غذایی و نیز استرس‌های روانی اجتماعی رنج می‌بردند مطالعات قبلی نشان داده‌اند که محرومیت غذایی مزمن در طی دوره محرومیت به تدریج سبب کاهش سطح هورمون‌های کاتابولیک مانند هورمون‌های تیروئیدی و کورتیزول می‌شود تا بدن مصرف انرژی را کنترل کرده و ذخایر غذایی خود را حفظ کند [۲۲،۲۱] به‌ویژه این کاهش در سطح کورتیزول در حیواناتی که محرومیت غذایی داشته و نیز تحت استرس‌های دیگر نیز قرار دارند تشدید می‌شود [۲۳]. یافته ما در مورد میزان کورتیزول سرم در گروه ۶ که از سایر گروه‌ها بیش‌تر بوده است موید این است که سطح کورتیزول سرم در گروه‌هایی که در معرض محرومیت غذایی بوده‌اند، با مکانیسم کنترل کاتابولیک، پایین‌تر از گروه ۶ (که در معرض استرس بی‌ثباتی اجتماعی بدون محرومیت غذایی قرار داشته) تثبیت شده است، به عبارت دیگر، کورتیزول سرم در اثر استرس اجتماعی بدون محرومیت غذایی (گروه ۶) افزایش یافته لکن در گروه ۲ که محرومیت غذایی با مواجهه و گروه ۵ که محرومیت غذایی در شرایط ایزوله داشته‌اند، حتی از گروه کنترل نیز کم‌تر بوده است. هنگامی که هر سه نوع استرس محرومیت غذایی، نابرابری و بی‌ثباتی اجتماعی به طور هم‌زمان اعمال شده است (گروه ۳)، اثر بی‌ثباتی اجتماعی و احساس نابرابری (مشاهده محرومیت خود و برخورداری غذایی دیگران)، بر اثر مهار کاتابولیکی محرومیت غذایی غلبه کرده و میزان گلوکوکورتیکوئیدی سرم را نسبت به گروه کنترل بیش‌تر کرده است. نکته جالب این‌که هنگامی که این سه نوع استرس هم‌زمان به مدت کم‌تری (نصف دوره: گروه ۴) اعمال شده است، سطح کورتیزول کم‌تر از گروه ۳ و تقریباً معادل گروه کنترل (تعادل سیگنال محرومیت در کاهش کورتیزول با سیگنال‌های بی‌ثباتی و نابرابری در افزایش آن) بوده است. (جدول۱) در موش‌های تحت درمان با کورتیکوسترون تشدید واضح آسیب کبدی یافت شده است در قسمتی از مغز که کبد

www.SID.ir

را کنترل می‌کند استرس می‌تواند جریان خون را مختل کرده و ممکن است به اختلال فعالیت محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–فوق کلیه و در نهایت تشدید بیماری کبدی منتهی شود [۴].

محرومیت غذایی، احساس نابرابری در دریافت مواد غذایی و نیز عدم ثبات در موقعیت اجتماعی هر یک به درجاتی باعث افزایش شدت تجمع پیگمانت لیپوفوشین و تسریع روند پیر شدن در سلول‌های کبد حیوانات تحت استرس مزمن روانی– اجتماعی گردید. هم‌چنین تسریع روند پیری ناشی از افزایش تجمع لیپوفوشین در گروهی که عدم ثبات اجتماعی را تحمل می‌کرد نسبت به گروهی که فقط محرومیت غذایی و مواجهه با دیگران را داشت بالاتر بود بر این اساس بیان این نکته حائز اهمیت است که وضعیت اجتماعی و محیط روانی که فرد در آن به سر می‌برد نقش بسیار مهمی در پیش‌بینی کیفیت زندگی و سال‌های مفید عمر وی خواهد داشت. مطالعات دیگری در این زمینه امروزه، اصلاح عوامل اثرگذار اجتماعی بر سلامت افراد جامعه را به عنوان هدف اصلی نظام‌های سلامت برای ارتقای سطح سلامت جامعه تعیین کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از یافته‌های پژوهشی طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. ضمن تشکر و قدردانی از مسئولین مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی از هم‌کاری گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد علی‌الخصوص جناب آقای دکتر محسن خلیلی و سرکار خانم فریبا انصاری هم‌چنین بخش آناتومی این دانشکده که ما را در انجام مراحل عملی این پژوهش یاری کردند نیز صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

[1] Marmot M. Social determinants of health inequality. Lancet 2005; 365: 1099-1104.
[2] Lupie SJ, King S, Meaney MJ, McEwen BS. Can poverty get under your skin? Basal cortisol levels and cognitive function in children from low and high SES. Dev Psychopathol 2001; 13: 653-676.
[3] Tayebbi J. Construction of management in Iran health system. Tehran Quart Soc Sec 2007. (Persian).
[4] Chida Y, Sudo N, Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? J Gastroenterol Hepatol 2006; 21: 202-208.
[5] The liver: stress and liver 2007. The data are available at http://www.hcvadvocate.org.
[6] Vermetten E, Bremner JD. Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. Depress Anxiety 2002; 15: 126-147.
[7] Iwai M, Saheki S, Ohta Y, Shimazu T. Foot-shock stress accelerates carbon tetrachloride induced liver injury in rats: implication of the sympathetic nervous system. Biomed Res 1986; 7: 145-154.
[8] Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B, Brunk UT. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. Cell Mol life Sci 2008; 65: 1669-1682.
[9] Sulzer D, Mosharov E, Talloczy Z, Zucca FA, Simon JD, Zecca L. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin and disease. J Neurochem 2008; 106: 24-36.
[10] Katz ML, Rice LM, Gao CL. Reversible accumulation of lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 175-181.
[11] Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. Sci Aging Knowledge Environ 2005; 1: 120-129.
[12] Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Eur J Biochem 2002; 269: 1996-2002.
[13] Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. Arch Biochem Biophys 2007; 462: 220-230.
[14] Sapolsky R. Timing stress. Sci Am 2003; 289: 87-95.
[15] Mojarab SH, Vaez Mahdavi MR, Roghani M, Safarpour AR, Tiraihi TS. Effect of food inequality and unstable social status on myocard ial cells of male rabbits. WASJ 2010; 8: 680-686. (Persian).
[16] Heidary F, Vaez Mahdavi MR, Momeni F, Minaii B, Roghani M, Fallah N. et al. Food inequality negatively impacts cardiac health in rabbits. PLos One 2008; 3: e3705.
[17] Vaez Mahdavi MR, Rogani M, Kallili M, Dalir R. The effect of food restriction on learning and memory of male wister rat. behavioral analysis. Iran J Neurol 2009; 1: 29-33. (Persian).
[18] Yazdani Sh. Health care of individuals. 2008. from: http://www.aftab.ir
[19] Essner E, Novikoff AB. Human hepatocellular pigments and lysosomal. J Ultrastruct Res 1960; 3: 374-391.
[20] Zhang L, Zhou R, Li X, Ursano RJ, Li H. Stress induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non genomic signaling. Med Hypotheses 2006; 66: 1205-1208.
[21] Wronska D, Niezgoda J, Sechman A, Bobek S. Food deprivation suppresses stress-induced rise in catabolic hormones with a concomitant tendency to potentiate the increment of blood glucose. Physiol Behav 1990; 48: 531-537.
[22] Vijayan MM, Foster GD, Moon TW. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven, Hemitripterus americanus. Fish Physiol Biochem 1993; 12: 327-335.
[23] Wronska-Fortuna D, Sechman A, Niezgoda J, Bobek S. Modified responses of circulating cortisol, thyroid hormones, and glucose to exogenous corticotropin and thyrotropin-releasing hormone in food-deprived sheep. Pharmacol Biochem Behav 1993; 45: 601-606.

Archive of SID

www.SID.ir

Unstable social situation and food inequality can promote accumulation of lipofuscin and induced apoptosis in hepatocytes

Fatemeh Moradi (M.Sc)[1,2], Mohammad Reza Vaez Mahdavi (Ph.D)[*1], Abolhassan Ahmadiani (Ph.D)[2], Mehrdad Rogani (Ph.D)[1] , Taki Altiraihi (Ph.D)[3], Ali Reza Delshad (Ph.D)[4], Shahnaz Mojarab (M.Sc)[5],

1- Equity and Health Research Center and Dept. of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Neuroscience Research Center, and Dept. of pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Dept of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

4 - Dept of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

5- Dept of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

(Received: 30 Jan 2012 Accepted: 27 May 2012)

Introduction: Based on both animal and human studies, inequality and social injustice have adverse effects on individual and community health. However, it is not yet known whether social instability and food inequality can cause the premature aging hepatocytes death in young people. To address this question, the effects of food intake inequality with or without unstable social status were evaluated and histopathological changes in hepatocytes and aging process investigated as well.

Material and Methods: Forty eight Newzeland 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 two main markers of aging were studied by long Zeihl Nelseen staining and the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nike end labeling (TUNEL reaction) of the hepatocytes respectively. Serum cortisol level was also measured.

Results: The simultaneous application of the mentioned situations (i.e. food restriction, social inequality and changed cage-mate), caused significant change in lipofuscin accumulation in the hepatocytes in comparison with the control group ($p<0.001$). In addition, application of instability and isolation environment produced significant changes in hepatocytes apoptosis ($p<0.05$).

Conclusion: Accumulation of two main markers of aging increased in hepatocytes and was accelerated in the groups with unstable social status.

Keywords: Social justice, Food deprivation, Socioeconomic factors, Lipofuscin, Aging , Rabbits

* Corresponding author: Tel: +98 09121779116; Fax: +98 21 88964792
mh_mahdavi@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir