



Effect of stress due to food deprivation, social inequality and instability on brain lipofuscin levels

Shirin Mahdi Dust^{1,2,3}, Mohammad Reza Vaez Mahdavi^{1,2,3*}, Susan Kabudanian Ardestani⁴, Reza Sedaghat⁵,
Foruzandeh Jalilvand⁴, Mohsen Khalili^{3,6}, Marjan Aghajani^{1,2,3}, Armin Azimi^{1,3},
Saeid Arbab Soleymani^{1,3}, Tooba Ghazanfari^{7,8}

1. Traditional Medicine Clinical Trial Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

2. Health Equity Research Group, Shahed University, Tehran, Iran

3. Dep. of Physiology, Shahed University, Tehran, Iran

4. Institute of Biophysics & Biochemistry, Tehran University, Tehran, Iran

5. Dept. of Anatomy and Pathology, Medical Faculty, Shahed University, Tehran, Iran

6. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

7. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

8. Dep. of Immunology, Shahed University, Tehran, Iran

Received: 8 Aug 2012

Accepted: 16 Sept 2012

Abstract

Introduction: Several reports show a relationship between health equity, and health status and longevity of individuals. In this study, effects of food deprivation, inequality and social instability were investigated on the formation of lipofuscin pigment in Balb/C mice by histopathological and biochemical methods.

Methods: Thirty-six male mice were divided into 6 groups, then different kinds of stress (food deprivation, inequality and cage-mate change) were implemented on these groups for 2 weeks according to the protocol. Lipofuscin was biochemically measured in the brain homogenate of one hemisphere by Shen's method. The other brain hemisphere was used to qualitatively investigate the accumulation of lipofuscin by fluorescent microscope and it was also stained with periodic acid Schiff and examined with light microscope.

Results: Food deprivation alone did not cause significant differences in the amount of lipofuscin, but in food deprived and inequality experienced animals the amounts of lipofuscin was well above controls ($P < 0.05$); moreover, in the mice, which merely experienced unstable social status, the increase of lipofuscin was significant compared to the controls ($P < 0.001$). When all of three social stresses were applied simultaneously, lipofuscin changes were more obvious. The microscopic examination of tissue samples showed accumulation of lipofuscin in test conditions.

Conclusion: Food deprivation, injustice and unstable social status, especially when are applied simultaneously, can increase brain lipofuscin levels. Considering the role of this pigment in aging, the probability of appearance of early aging can be considered after exposure to social stress.

Key words: Social justice, Food inequality, Social stress, Lipofuscin, Mice, Health Equity

* Corresponding author e-mail: vaezmahdavi@shahed.ac.ir
mh_mahdavi@yahoo.com

Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر استرس ناشی از محرومیت غذایی، بی عدالتی و بی ثباتی اجتماعی بر مقادیر کمی و کیفی لیپوفوشین در مغز

شیرین مهدی دوست^{۱،۲،۳}، محمدرضا واعظ مهدوی^{۱،۲،۳*}، سوسن کبودانیان اردستانی^۴، رضا صداقت^۵، محسن خلیلی^{۳،۶}، فروزنده جلیلود^۴،
مرجان آقاجانی^{۱،۲،۳}، آرمین عظیمی^{۱،۳}، سعید ارباب سلیمانی^{۱،۳}، طوبی غضنفری^{۷،۸}

۱. مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران
۲. گروه پژوهشی عدالت در سلامت، دانشگاه شاهد، تهران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۴. مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران
۵. گروه تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران
۶. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران
۷. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران
۸. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

پذیرش: ۲۶ شهریور ۹۱

دریافت: ۱۸ مرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: شواهد متعددی بر ارتباط نابرابری ها و بی عدالتی اجتماعی با سطح سلامتی و طول عمر افراد دلالت می کند. در مطالعه حاضر اثرات محرومیت و نابرابری غذایی و بی ثباتی در موقعیت اجتماعی بر تشکیل رنگدانه لیپوفوشین به صورت هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی در موشهای Balb/C با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات، مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: ۳۶ سر موش نر در ۶ گروه مختلف قرار گرفته، سپس استرس های مختلف (محرومیت، نابرابری غذایی و تغییر همخانه) به مدت ۲ هفته طبق دستورالعمل مربوطه در این گروه ها اعمال شد. میزان کمی لیپوفوشین در هموژنات یک نیمکره از بافت مغز با روش شن^۱ اندازه گیری شد. نیمکره دیگر جهت بررسی کیفی تجمع گرانول های لیپوفوشین با میکروسکوپ فلورسنت و نیز در رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

یافته ها: در این مطالعه محرومیت غذایی به تنهایی تفاوتی در میزان کمی لیپوفوشین ایجاد نکرد، اما در گروه های محرومیت و نابرابری غذایی میزان لیپوفوشین نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ($P < 0.05$)، نیز در شرایطی که ناپایداری در موقعیت اجتماعی بدون محرومیت غذایی اعمال شد، افزایش میزان کمی لیپوفوشین نسبت به گروه کنترل معنادار بود ($P < 0.001$). هنگامی که هر سه استرس اجتماعی به طور همزمان اعمال شد، تغییرات در تجمع لیپوفوشین شدیدتر بود. در بررسی نمونه های بافتی با میکروسکوپ پیدایش رنگدانه لیپوفوشین در شرایط آزمایش احراز شد.

نتیجه گیری: فقر، بی عدالتی و عدم ثبات اجتماعی، بخصوص زمانیکه همزمان اعمال شوند، می توانند موجب افزایش لیپوفوشین در بافت مغز شود که با توجه به نقش این ماده در ایجاد پیری، احتمال پیدایش پیری زودرس در اثر مواجهه با استرس های اجتماعی مطرح می باشد.

واژه های کلیدی: عدالت اجتماعی، نابرابری غذایی، استرس اجتماعی، لیپوفوشین، موش، عدالت در سلامت

مقدمه

و اقتصادی ارتباط تنگاتنگی دارد. عوامل اجتماعی به طور فزاینده ای به عنوان یک عامل مهم در سلامت افراد و جوامع به رسمیت شناخته شده است [۳]. یک میلیارد نفر از مردم جهان در دام فقر کامل گرفتارند: سوء تغذیه، بیسوادی و میانگین پایین عمر، مشخصه های زندگی همراه با محرومیت و

به خوبی ثابت شده است که سلامتی با شرایط اجتماعی

vaezmahdavi@shahed.ac.ir
mh_mahdavi@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj
1. Shen

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

یافته‌ها تجمع پروتئین‌های به شدت اکسید شده به نام لیپوفوشین^۱ است که عامل پیری و کهولت سلولی هم شناخته شده و از پروتئین‌های تغییر یافته اکسید شده و پسماندهای تخریبی چربی در جریان استرس اکسیداتیو تشکیل شده است. در میان اندامک‌های سلول‌های پیر، چشمگیرترین تغییرات ناشی از استرس اکسیداتیو در میتوکندری و لیزوزم مشاهده می‌شود؛ میتوکندری‌ها دچار تغییرات تدریجی ساختاری همراه با تقلیل ATP می‌شوند. در حالی که در لیزوزوم لیپوفوشین (به صورت رنگدانه‌های قهوه‌ای مایل به زرد با خاصیت اتوفلوئورسنت) به صورت فزاینده‌ای، انباشته می‌شود، توانایی پاسخ مناسب به استرس‌های اکسیداتیو با افزایش سن کاهش می‌یابد، بنابراین سلول‌های پیرتر در برابر صدمات اکسیداتیو به طور فزاینده‌ای آسیب پذیرتر می‌شوند [۲۱]. کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پایه انباشتگی ضایعات و ترکیبات سلولی اکسیداتیو مانند لیپوفوشین است [۱۱]. ثابت شده که بالا رفتن میزان تشکیل لیپوفوشین در طول زمان، پتانسیل بالقوه سلول را برای حیات کاهش می‌دهد. بنابراین یکی از شاخص‌های وقوع پیری، تجمع گرانول‌های لیپوفوشین قلمداد شده است [۷، ۱۲، ۱۹]. مطالعه حاضر بخشی از مطالعه وسیع‌تر آنالیز فاکتورهای استرس اکسیداتیو در جریان بی‌عدالتی و عدم ثبات اجتماعی، به منظور ارزیابی اثرات مستقیم استرس‌های اجتماعی مذکور بر مکانیسم‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن است و در آن میزان کمی لیپوفوشین در کل مغز موش‌های Balb/c که در معرض استرس‌های محرومیت غذایی، نابرابری اجتماعی و عدم ثبات محیط زندگی قرار داشته‌اند، مورد بررسی قرار گرفت و از رنگ‌آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف (PAS)^۲ جهت تکمیل یافته‌های بیوشیمیایی و از میکروسکوپ فلورسنت جهت تأیید تشکیل گرانول‌های لیپوفوشین در سلول‌های هیپوکامپ استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، حیوان‌های مورد مطالعه ۳۶ سر موش ماده

فقر است که هویت انسانی افراد نادیده گرفته می‌شود. در جهان از هر چهار نفر، یک نفر دچار فقر است. در اغلب جوامع طول عمر افراد فقیر نسبت به افراد مرفه، کوتاه‌تر و تندرستی آنها کم‌تر است [۱۴]. اکثر مطالعات نقش فقر در کاهش سلامت را در اثر «کاهش دسترسی» دانسته‌اند به این معنی که فقدان تغذیه، عدم دسترسی به امکانات بهداشتی و درمانی، بی‌سوادی و فرهنگ پایین، و خلاصه عوامل منفی اجتماعی ایجاد شده در اثر فقر و محرومیت، باعث بروز بیشتر بیماری‌ها و یا عدم برخورداری از مراقبت‌ها و درمان‌های ضروری شده، یا سطح سلامت افراد فقیر را دچار آسیب می‌کند. لکن به آثار مستقیم فقر و نابرابری‌های اجتماعی بر چرخه‌های فیزیولوژیک حیاتی کمتر پرداخته شده است. علاوه بر اینکه فقیر بودن با تعدادی از عوامل ایجادکننده استرس در ارتباط است، نفس احساس فقر یک استرس مزمن است [۱۸]. مطالعات نشان داده‌اند که بی‌عدالتی، از بسیاری از فاکتورهای خطر شناخته شده امروزی کشنده‌تر است. پیشرفت‌های قرن حاضر باعث عمیق‌تر شدن شکاف طبقاتی و شدت یافتن بی‌عدالتی در میان اقشار جامعه شده است و در عین حال ثابت شده که احساس بی‌عدالتی، اثرات مخربی بر روح و جسم افراد جامعه وارد می‌آورد [۲۶]. مقاله حاضر شواهدی از اثرات مستقیم «محرومیت» و «نابرابری» و «بی‌ثباتی اجتماعی» بر کارکرد فیزیولوژیک مغز را بررسی می‌کند. قرار گرفتن طولانی مدت افراد در موقعیت‌های نامناسب اجتماعی، منجر به ایجاد سطحی از استرس‌های مزمن می‌شود که با افزایش فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو همراه است. تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، پدیده‌ای غیر قابل اجتناب در فرایند متابولیسم محسوب می‌شود و چنانچه مکانیسم‌های آنتی اکسیدان فیزیولوژیک بدن قادر به مهار و خنثی کردن این رادیکال‌های آزاد اکسیژنی نگردند، «استرس اکسیداتیو» ایجاد می‌گردد. این ترکیبات فعال اکسیژنی، به علت پتانسیل بالا در تخریب پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک موجب صدمه به فعالیت فیزیولوژیک غشاء، اختلال در متابولیسم، و تکثیر غیر طبیعی سلول می‌شود. افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در پیدایش پیری زودرس هم مؤثر دانسته شده است [۵]. جلوگیری از افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن، احتمالاً موجب بالا رفتن طول عمر خواهد شد [۴]. در سلول‌های پیر، پس از کاهش میتوز، یکی از مهمترین

1. Lipofuscin

2. Periodic Acid Schiff

Balb/c با محدوده سنی ۸ تا ۱۰ هفته بودند. حیوانات تا قبل از شروع مطالعه، بدون محدودیت آب و غذا دریافت کردند. موش‌ها در محیطی با دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و با نور کافی نگهداری شدند. قبل از شروع دوره مطالعه تمام موش‌ها وزن شده و در شش گروه به صورت تصادفی تقسیم شدند. در طی دو هفته اول مطالعه، حیوانات در شرایط عادی و به دور از استرس بودند و غذا به اندازه کافی در اختیار آنها بود. برای اندازه‌گیری میزان غذای مورد نیاز در طی ۲۴ ساعت، غذای روزانه آنها اندازه‌گیری شد و مشخص گردید هر حیوان به طور متوسط روزانه ۴/۵ گرم غذا مصرف می‌کند. تمام روش‌های به کار رفته در این مطالعه با اصول استاندارد و اخلاقی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی مطابقت داشته و در جهت کاهش درد و نیز خونگیری با شرایط استاندارد می‌باشد [۱]. پس از گذشت دو هفته، دوره اصلی مطالعه با اعمال «شرایط متفاوت اجتماعی» به مدت دو هفته، شروع شد. شرایط محل زندگی از نظر دما و نور یکسان بوده و در طول دوره آزمایش، حیوانات محدودیتی برای دریافت آب نداشتند. شرایط اجتماعی مختلف شامل محرومیت غذایی، نابرابری غذایی و تغییر همخانه به ترتیب ذیل در گروه‌های مختلف اعمال شد:

گروه ۱: این گروه به عنوان گروه شاهد تحت هیچ استرسی نبودند و غذای کافی داشتند. [گروه کنترل]

گروه ۲: دریافت یک سوم غذای کامل و همخانه ثابت. حیوانات این گروه در اتاق ایزوله بوده و بوی غذای دیگران را استشمام نمی‌کردند [گروه محرومیت غذایی (ایزوله)]

گروه ۳: این گروه مانند گروه ۲ بوده با این تفاوت که این گروه در کنار سایر حیوانات قرار گرفتند و احساس نابرابری در دریافت غذا به این گروه اعمال شد. [گروه محرومیت غذایی (مشاهده)]

گروه ۴: دریافت یک سوم غذای کامل و همخانه متغیر (تغییر هر ۳ روز یکبار). حیوانات این گروه در اتاق ایزوله قرار گرفتند. [گروه محرومیت غذایی (ایزوله) با تغییر همخانه]

گروه ۵: این گروه مانند گروه ۴ بوده با این تفاوت که این گروه با قرار گرفتن در کنار سایر گروه‌ها، احساس نابرابری در دریافت غذا (بی‌عدالتی) را احساس می‌کردند. [گروه محرومیت غذایی (مشاهده) با تغییر همخانه]

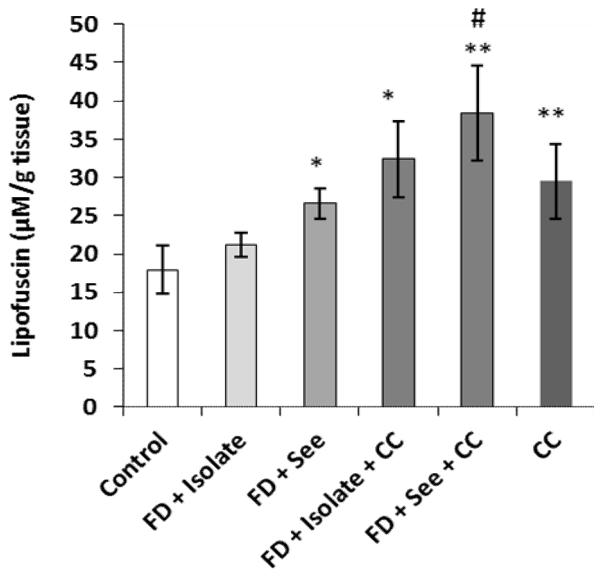
گروه ۶: دریافت غذای کامل و همخانه متغیر (تغییر هر ۳ روز یکبار). در این گروه اثر خالص فقدان ثبات در محیط اجتماعی بررسی می‌شد. [گروه تغییر همخانه]

یک روز بعد از اتمام دوره اعمال استرس‌های اجتماعی ذکر شده، موش‌ها با یک پنبه آغشته به اثر کاملاً بیهوش و کشته شدند. پوست ناحیه سر باز و بافت مغز جدا شد. برای سنجش کمی لیپوفوشین یک نیمکره از بافت، هموژنیزه و لیپوفوشین با روش شن^۱ اندازه‌گیری شد. بر این اساس از بافت مغز با بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار) $\text{pH}=8$ ، هموژنات ۱۰٪ تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از هموژنات ۱۰٪ را در ۱ میلی‌لیتر محلول فولج^۲ (متانول/کلروفرم به نسبت ۱:۲) مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. لیپوفوشین در فاز کلروفرم قرار می‌گیرد که جذب نوری آن در اسپکتروفلورومتر گیلفورد^۳ در طول موج ۴۳۵ نانومتر خوانده شد. برای تهیه این نمودار استاندارد از کوئینین^۴ به عنوان نمونه استاندارد لیپوفوشین استفاده شد [۱۵، ۱۶]. نیمکره دیگر بافت مغز جهت تهیه لام، فیکس و پس از انجام پاساژ بافتی و بلوک گیری، بافت به ضخامت ۵ میکرون بر روی لام قرار گرفت. برش بافتی جهت بررسی پیگمانت لیپوفوشین در سلول هیپوکامپ مغز، با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف رنگ‌آمیزی شد.

علاوه بر موارد فوق، جهت تأیید پیگمانت اتوفلورسنت لیپوفوشین، برش‌های تهیه شده بدون رنگ آمیزی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنتی در طول موج (۳۳۰-۳۹۰ nm) مورد مطالعه قرار گرفتند. با تابش نور ماوراء بنفش به پیگمانت، نوری با طیف سبز-زرد ساطع می‌شود. رنگدانه‌ها در این روش درخشش خاص فلورسنت پیدا کرده که برای مشاهده رنگ‌دانه‌های لیپوفوشین در بافت کاملاً اختصاصی است [۲۲].

در بررسی تجمع لیپوفوشین در بافت هیپوکامپ مغز هر حیوان در گروه مورد مطالعه، نمونه بافتی رنگ‌آمیزی شده (با پریودیک اسید شیف)، در سه لام بافتی تهیه و آماده بررسی با میکروسکوپ نوری گردید.

1. Shen
2. Folch
3. Gilford
4. quinine



شکل ۱- مقایسه غلظت لیپوفوشین در بافت مغز بین گروه کنترل با گروه تحت استرس: گروه کنترل (mean=18/009; SD=3/136; n=6)، گروه محرومیت غذایی (ایزوله) (mean=21/272; SD=1/603; n=6)، گروه محرومیت غذایی (مشاهده) (mean=26/63; SD=1/96; n=6)، گروه تغییر همخانه (mean=29/528; SD=4/902; n=6)، گروه محرومیت غذایی (ایزوله) با تغییر همخانه (mean=32/444; SD=4/988; n=6)، گروه محرومیت غذایی (مشاهده) با تغییر همخانه (mean=38/468; SD=6/267; n=6). نتایج بر حسب میانگین و انحراف معیار (SD) نشان داده شده است.
 *: معرف معنی‌دار بودن هر گروه با گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$).
 **: معرف معنی‌دار بودن با گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.01$).
 # معرف معنی‌دار بودن با گروه محرومیت غذایی و مشاهده: (FD+See) می‌باشد ($P < 0.05$).

FD+ Isolated: محرومیت غذایی (ایزوله)

FD+ See: محرومیت غذایی (مشاهده)

FD+ Isolated + CC: محرومیت غذایی (ایزوله) + تغییر همخانه

FD + See + CC: محرومیت غذایی (مشاهده) + تغییر همخانه

CC: تغییر همخانه

محرومیت غذایی (ایزوله و مشاهده) + تغییر همخانه»، تفاوت آماری معنی‌داری را ($P < 0.001$) در بافت مغز نشان داد. اما بین «گروه محرومیت غذایی (ایزوله) + تغییر همخانه» و «گروه محرومیت غذایی (مشاهده) + تغییر همخانه» تفاوت آماری دیده نشد و این در حالی است که هر کدام از این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را در میزان تجمع لیپوفوشین در بافت مغز نشان می‌دهند.

نتایج از این حکایت می‌کند که همزمان شدن سه استرس، باعث افزایش شدت تشکیل پیگمانت لیپوفوشین و افزایش در غلظت لیپوفوشین بافت مغز شده است. محرومیت غذایی به تنهایی قادر به تغییر سطح لیپوفوشین بافت مغز نبوده، لکن

به منظور جلوگیری از تأثیر قضاوت شخصی در بررسی‌ها، لام‌های تهیه شده به نحوی نام‌گذاری شد که در حین بررسی، از گروه حیوان مطلع نباشیم و مشخصات دقیق هر لام در مکانی دیگر ثبت شد. سپس با استفاده از جدول اعداد تصادفی مختصات محورهای X و Y بر روی میکروسکوپ تنظیم شد. این کار بدین منظور صورت گرفت که محدوده تعیین شده جهت شمارش لیپوفوشین در سلول‌ها کاملاً تصادفی باشد. سپس در مقطع مورد مشاهده، تعداد گرانول‌های لیپوفوشین شمارش گردید. میانگین تعداد گرانول‌های مشاهده شده برای هر حیوان محاسبه شده و در جدول داده‌های مربوط به گروه قرار گرفت. سپس میانگین و انحراف از معیار هر گروه از حیوان‌ها محاسبه شد.

نتایج تمامی آزمایشات توسط نرم‌افزار سیگما استات ارزیابی شد، به طوری‌که در صورت توزیع پارامتریک داده‌ها، آزمون ANOVA یک طرفه و در صورت توزیع غیر نرمال، آنالیز آماری کروسکال والیس برای مقایسه گروه‌های مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت و نتایج بر حسب میانگین و خطای انحراف معیار (SD) گزارش شد و اختلاف با $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تعریف شد.

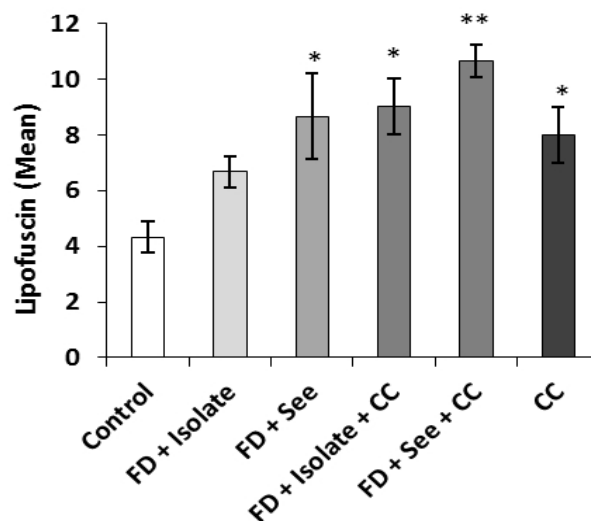
یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، محرومیت غذایی به تنهایی قادر به تغییر سطح لیپوفوشین بافت مغز نبوده، لکن هنگامی که با احساس نابرابری و بی‌عدالتی توأم گردید، میزان لیپوفوشین نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنادار ($P < 0.05$) نشان داد. استرس همخانه متغیر در بافت مغز افزایش معناداری را در غلظت لیپوفوشین بافت مغز باعث شده است ($P < 0.001$). در مقایسه «گروه محرومیت (ایزوله)» با «گروه محرومیت غذایی (ایزوله) + تغییر همخانه»، نیز استرس تغییر همخانه باعث افزایش غلظت لیپوفوشین در بافت مغز شده است ($P < 0.05$). همچنین در مقایسه «گروه محرومیت (مشاهده)» با «گروه محرومیت غذایی (مشاهده) + تغییر همخانه» نیز افزایش در غلظت لیپوفوشین بافت مغز دیده می‌شود ($P < 0.001$). مقایسه غلظت لیپوفوشین بین «گروه کنترل» و «گروه

هنگامی که با احساس نابرابری و بی‌عدالتی توأم گردید، نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنادار ($P < 0.05$) شد.

در ادامه، بررسی رنگدانه لیپوفوشین با میکروسکوپ نوری (رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف) در جهت تکمیل داده‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپ فلورسنت برای تأیید این رنگدانه صورت گرفت. در بررسی هیستولوژی هیپوکامپ مغز به وسیله میکروسکوپ نوری، رنگدانه‌های لیپوفوشین در گروه‌های مختلف مشاهده شد. به منظور مقایسه گروه‌های مختلف از حیث تجمع لیپوفوشین در بافت هیپوکامپ مغز، از هر حیوان در هر گروه مورد مطالعه، حداقل سه نمونه بافتی رنگ آمیزی شده، تهیه شده و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

در شکل ۲، مقادیر گرانول‌های لیپوفوشین شمارش شده، پس از انجام بررسی‌های آماری نشان داده شده است. بر اساس این شکل، کمترین میزان تجمع لیپوفوشین در گروه کنترل و بیشترین شدت تجمع در گروه ۵ «محرومیت غذایی (مشاهده)» تغییر همخانه» دیده شد. در این گروه هر سه استرس محدودیت غذایی، مشاهده نابرابری‌ها و تغییر همخانه اعمال شده بود. گروه ۴ «محرومیت غذایی (ایزوله)» تغییر همخانه» در رتبه دوم از نظر شدت تجمع قرار گرفت. این گروه در فاکتور



شکل ۲- مقایسه تعداد لیپوفوشین بین گروه کنترل و گروه‌های تحت استرس در بافت مغز: در مقایسه بین گروه کنترل و گروه‌های تحت استرس، حداکثر میزان تجمع لیپوفوشین در گروه محرومیت غذایی (مشاهده) با تغییر همخانه با تفاوت آماری معنی‌دار ($P < 0.001$) دیده شد. نتایج بر حسب میانگین و انحراف معیار (SD) نشان داده شده است.

*: معرف معنی‌دار بودن هر گروه با گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$).

***: معرف معنی‌دار بودن با گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.001$).

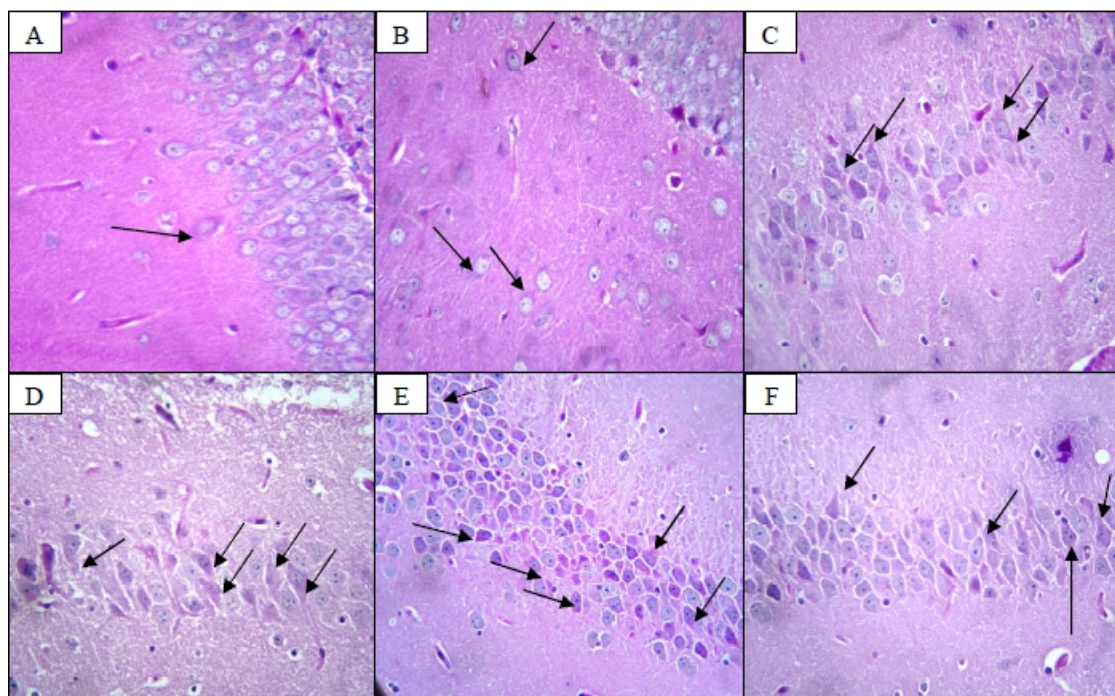
FD+ Isolated: محرومیت غذایی (ایزوله)

FD+ See: محرومیت غذایی (مشاهده)

FD+ Isolated + CC: محرومیت غذایی (ایزوله) + تغییر همخانه

FD+ See + CC: محرومیت غذایی (مشاهده) + تغییر همخانه

CC: تغییر همخانه

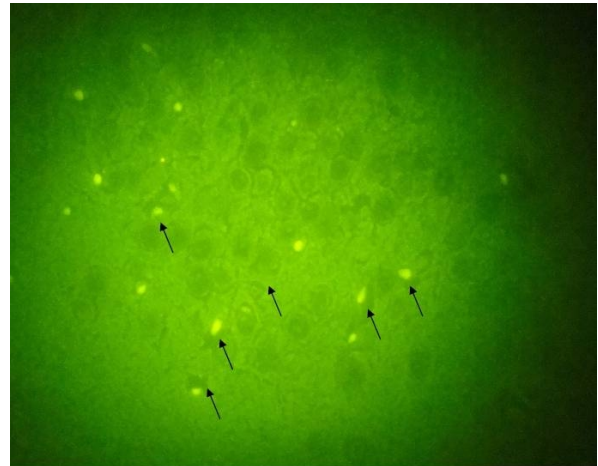


شکل ۳- پیگمانت لیپوفوشین در هیپوکامپ موش‌های نر: گرانول‌های لیپوفوشین (علامت زده شده) با رنگ‌آمیزی PAS مشاهده می‌شود. این رنگدانه در سینوپلاسم سلول‌های عصبی هیپوکامپ مغز تشکیل شده است که در این نوع رنگ‌آمیزی، به رنگ ارغوانی دیده می‌شوند. شکل A گروه کنترل، شکل B گروه محرومیت غذایی (ایزوله)، شکل C گروه محرومیت غذایی (مشاهده)، شکل D گروه محرومیت غذایی (ایزوله) + تغییر همخانه، شکل E گروه محرومیت غذایی (مشاهده) + تغییر همخانه، شکل F گروه تغییر همخانه. این عکس‌ها با بزرگنمایی ۴۰X با میکروسکوپ نوری تهیه شده است.

حیوان شاهد نابرابری و بی‌عدالتی در دریافت غذا بود، نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت. مرادی و همکاران در مطالعه خود در بررسی اثر محرومیت غذایی و نابرابری در دریافت غذا و بی‌ثباتی اجتماعی نشان دادند که رنگدانه لیپوفوشین در بافت مغز و کبد لیپوفوشین در بافت مغز و کبد خرگوش‌های تحت استرس‌های اجتماعی تحت استرس‌های اجتماعی محرومیت غذایی و نابرابری غذایی تجمع می‌یابد [۱۰]. لیپوفوشین به عنوان یک محصول ناشی از استرس اکسیداتیو، منجر به پیری و پراکسیداسیون لیپید در سلول می‌شود [۲۵] که تجمع این پیگمانت باعث کاهش ظرفیت اتوفاگوسیتی سلول شده و در نهایت در بازیافت ترکیبات سلول اختلال ایجاد می‌شود. بنابراین ممکن است ارتباط بین لیپوفوشین و انحطاط سلولی بسیار بیشتر از آنچه تصور می‌شد، باشد [۲].

بر اساس شکل ۱، تغییر همخانه به تنهایی قادر بوده تا میزان لیپوفوشین بافت مغز را به صورت بارزی افزایش دهد. این موضوع گویای این است که استرس تغییر همخانه، این بافت را به شدت متأثر کرده و روند پیری را در آن تسریع می‌کند. بررسی کمی یافته‌های بافت شناسی نیز این موضوع را تأیید می‌کند (شکل ۲)، تغییر همخانه موجب افزایش و تجمع پیگمانت لیپوفوشین در هیپوکامپ موش شد. در مطالعه مجرب و همکاران در سال ۱۳۸۷ در دانشگاه شاهد دیده شد که این تشکیل و تجمع لیپوفوشین در قلب خرگوش‌هایی که استرس ناپایداری و بی‌ثباتی در موقعیت اجتماعی را تجربه می‌کردند نسبت به گروه کنترل افزایش بارزی داشته است و همچنین در شرایطی که تغییر همخانه (ناپایداری در شرایط اجتماعی) با محرومیت غذایی همراه شود، میزان تشکیل لیپوفوشین نسبت به زمانی که صرفاً محرومیت غذایی اعمال شود، افزایش می‌یابد [۹].

پیش‌تر حیدری و همکاران در سال ۱۳۸۵ در دانشگاه شاهد نشان دادند که استرس ناشی از نابرابری غذایی باعث ایجاد تغییرات پاتولوژیک در میوکارد خرگوش سفید نیوزلندی به صورت افزایش تجمع رنگدانه لیپوفوشین در بافت قلب می‌شود [۶]. همچنین در سال ۲۰۰۹ در مطالعه مهدوی و همکاران نشان داده شده است که نابرابری‌های اجتماعی علاوه بر افزایش روند پیری در بافت، باعث تغییرات قابل توجهی در تثبیت یادگیری و حافظه می‌شود [۲۳].



شکل ۴- پیگمانت لیپوفوشین در هیپوکامپ بافت مغز موش‌های نر: در شکل ۲ گرانول‌های لیپوفوشین مشخص شده‌اند. این عکس با بزرگنمایی $40\times$ با میکروسکوپ فلورسنت تهیه شده است. این رنگدانه‌ها که با پیکان مشخص شده‌اند، در سیتوپلاسم سلول‌های عصبی هیپوکامپ مغز مشاهده شده‌اند. به دلیل خاصیت اتوفلورسنت لیپوفوشین، این پیگمانت در کنار هسته سلول مانند یک جسم درخشان مشخص است. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت به طور اختصاصی تشکیل رنگدانه لیپوفوشین را اثبات می‌کند.

نابرابری در دریافت غذا (بی‌عدالتی) با گروه ۵، متفاوت بود و میزان تجمع لیپوفوشین در این گروه از گروه ۵ کمتر بود. گروه ۳ (محرومیت غذایی «مشاهده») و گروه ۶ (تغییر همخانه) در رتبه سوم قرار گرفت. گروه ۲ «محرومیت غذایی (ایزوله)» و سپس گروه ۱ به ترتیب در رتبه‌های چهارم و پنجم از نظر شدت تجمع لیپوفوشین قرار گرفتند.

شکل ۳ مقادیر لیپوفوشین تجمع یافته در هیپوکامپ گروه‌های مختلف آزمایش را با بزرگنمایی $40\times$ با میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد.

در شکل ۴ رنگدانه اتوفلورسانس لیپوفوشین با بزرگنمایی $40\times$ با میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده است.

بحث

بر اساس یافته‌های بیوشیمیایی (کمی)، محرومیت غذایی (به تنهایی) در بافت مغز باعث افزایش غلظت لیپوفوشین نشد ولی هنگامی که با نابرابری (با و بدون تغییر همخانه) همراه شد، میزان لیپوفوشین به صورت بارزی در این بافت افزایش یافت. بر اساس نمودار ۲ (یافته‌های حاصل از بررسی‌های بافت شناسی در هیپوکامپ) تشکیل و تجمع این رنگدانه‌ها در اثر محرومیت غذایی هم در حالت ایزوله و هم در شرایطی که

مسأله احتمالاً به دلیل محتوای بالای آهن در لیپوفوشین صورت می‌گیرد. محتوای آهن، مس و روی و به خصوص آهن که در طی زمان در سلول‌های عصبی تجمع می‌یابند، حساسیت نورون‌های پیر را به استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهند و ممکن است باعث تجمع لیپوفوشین شود [۱۷، ۲۴]. در مطالعات بر روی امکان تولید و شکل‌گیری رسوبات لیپوفوشین بر هسته‌های عصبی کرانیال مشخص گردید که گرانول‌های لیپوفوشین در نورون‌هایی که به لحاظ فیزیولوژیک فعال‌تر هستند نسبت به نورون‌هایی که فعالیت کمتری دارند به تعداد بیشتری تجمع دارند [۱۳]. علیرغم فواید چشمگیر محدودیت غذایی متوسط، شواهد گویای این است که کاهش شدید در دریافت غذا ممکن است اثرات مضر را در شرایط اکسیداتیو ایجاد کند. مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ در بررسی اثر محرومیت غذایی نشان داد که در این گروه از موش‌ها میزان اکسیداسیون لیپید افزایش و میزان گلوتاتیون کاهش یافته است. در مطالعه دیگر نشان داد که ۳۶ ساعت محرومیت از غذا موجب افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز می‌شود [۸].

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که فقر و محرومیت غذایی، بی‌عدالتی در دریافت غذا و نیز بی‌ثباتی اجتماعی هر یک به درجاتی باعث افزایش شدت تشکیل و تجمع پیگمانت لیپوفوشین و تسریع روند پیری (aging) در حیوانات تحت استرس مزمن اجتماعی می‌گردد، به نحوی که هرچه تعداد و شدت این استرس‌های اجتماعی بیشتر باشد، میزان تجمع این پیگمانت افزایش می‌یابد. نهایتاً در گروهی که تحت هر سه استرس فوق بود، بیشترین تجمع پیگمانت دیده شد. همچنین شایان ذکر است که اثر محرومیت غذایی و بی‌ثباتی در موقعیت اجتماعی و مشاهده نابرابری و بی‌عدالتی در افزایش میزان کل لیپوفوشین مغز که با روش بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد با اثرات بر ایجاد استرس اکسیداتیو در هیپوکامپ از طریق بررسی بافت شناسی لیپوفوشین، هم‌خوانی دارد؛ اگرچه انواع استرس‌های اجتماعی ذکر شده، هر کدام دارای درجات متفاوتی از اثرات استرس اکسیداتیو بوده‌اند. به طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که قرار گرفتن افراد در محیط‌های اجتماعی مختلف آنها را در معرض سطوح و انواع متفاوتی از استرس‌های مزمن اجتماعی قرار می‌دهد که در سلامت روان، روند پیری، طول

در مطالعه حاضر تجمع لیپوفوشین در بافت مغز با روش‌های بیوشیمیایی و بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفته و با بررسی میزان غلظت این رنگدانه بین «گروه کنترل» با گروه ۴ و ۵ «محرومیت غذایی با تغییر همخانه (ایزوله و مشاهده)» در بافت مغز مشخص شده است که میزان تغییرات لیپوفوشین در این سه بافت به صورت معنی‌داری افزایش داشته است. این یافته گویای این است که همزمانی در اعمال «محرومیت از غذا» و «نابرابری‌های اجتماعی» و «بی‌ثباتی در موقعیت اجتماعی»، می‌تواند منجر به افزایش چشمگیر غلظت لیپوفوشین در بافت مغز شود یعنی در اثر اعمال همزمان چند استرس با هم، روند پیری تسریع می‌شود. در مطالعه مرادی سال ۱۳۸۸، (صرفاً) با روش بافت شناسی نشان داده شد که محرومیت و نابرابری غذایی و نیز عدم ثبات اجتماعی هر یک به درجاتی باعث افزایش تجمع لیپوفوشین و تسریع روند پیر شدن در هیپوکامپ خرگوش‌های تحت استرس مزمن روانی-اجتماعی گردید. در مطالعه مذکور نیز بیشترین شدت این تجمع در گروهی که هر سه استرس را تحمل می‌نمود، دیده شد [۹].

ترمن^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۴، در یک مدل آزمایشی جلوگیری از تجمع لیپوفوشین (به عنوان مشخصه استرس اکسیداتیو) را امکان‌پذیر ساختند و این زمانی بود که سلول‌ها در محیطی با اکسیژن هشت درصدی نگهداری شدند. در این غلظت از اکسیژن ساخت لیپوفوشین بسیار آهسته‌تر از زمانی بود که سلول‌ها در محیطی با اکسیژن چهل درصدی قرار گرفتند [۲۰]. به نظر می‌رسد لیپوفوشینی که در جریان اکسیداسیون طبیعی ایجاد می‌شود، توسط لیزوزوم‌ها بلعیده شده و فرآوری می‌شود. چنین لیپوفوشینی که توسط لیزوزوم گرفته می‌شود هنوز از نظر واکنشی فعال بوده و ممکن است باعث پارگی در غشاء لیزوزوم و رها شدن دوباره در سیتوزول شود. مواد دیگر بلعیده شده توسط لیزوزوم از جمله بقایای میتوکندری‌های پیر نیز قادر به واکنش با لیپوفوشین اولیه بوده و می‌توانند در ایجاد ارتباطات متقاطع سهیم باشند. این فرآیند به یک چرخه مداوم برای ساخت توده در حال رشد لیپوفوشین منتهی خواهد شد [۲]. تجمع لیپوفوشین سلول‌ها را به استرس اکسیداتیو و اختلال لیزوزومی و آپوپتوز حساس می‌کند و این

1. Terman

عمر آنها اثرات قابل توجهی به جا می‌گذارد.

سپاسگزاری

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند تا از زحمات و همکاری پرسنل مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی دانشگاه تهران و نیز آقای دکتر مهرداد

روغنی استاد گروه فیزیولوژی که راهنمایی‌های مستمر ارزنده‌ای ارائه کردند و سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشگاه شاهد صمیمانه تشکر و سپاسگزاری نمایند.

References

- [1] Aghajani M, VaezMahdavi M.R, Ghazanfari T, Khalili M, Azimi A, Arbab Soleymani S, Mahdi dust S, The effect of social stresses on pain behaviour, immune cells and serum concentration of TNF- α , Interleukin-1 and Interleukin-6 in female mice. *Physiol Pharmacol* 15 (2012) 545-561.
- [2] Brunk U.T, Terman A, The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Eur J Biochem* 2002: 1996-2002.
- [3] Evans G.W, Kim P, Childhood Poverty and Health Cumulative Risk Exposure and Stress Dysregulation. *Psychol Sci* 18 (2007) 953-957.
- [4] Harman D, Free radical theory of aging. *Mutat Res-DNAging* 275 (1992) 257-266.
- [5] Heinonen O.P, Albanes D, The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 330 (1994) 1029-1035.
- [6] Heidary F, Mahdavi MRV, Momeni F, Minaii B, Roghani M, Fallah N, Heidary R, Gharebaghi R, Food inequality negatively impacts cardiac health in rabbits. *PloS one* 3 (2008) e3705.
- [7] Katz M.L, Rice L.M, Gao C.L, Reversible accumulation of lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1999) 175-181.
- [8] Marczuk-Krynicka D, Hryniewiecki T, Piątek J, Paluszak J, The effect of brief food withdrawal on the level of free radicals and other parameters of oxidative status in the liver. *Med Sci Monit* 9 (2003) 131-135.
- [9] Mojarab S, Mahdavi MRV, Roghani M, Safarpour AR, Tiraihi T, Faghihzadeh S, Azathy MH, Nasabi N.A, Effect of food inequality and unstable social status on myocardial cells of male rabbits. *World Appl Sci J* 6 (2010) 680-686.
- [10] Moradi F, Mojarab S, VaezMahdavi M.R, Ahmadiani A, Roghani M, Delshad A, The effect of social instability, food deprivation and injustice in the histological changes in hippocampal neurons in rabbits. *Daneshvar J* 19 (2012) 13-22.
- [11] Morrissey C, Buser A, Scolaro J, Changes in hormone sensitivity in the ventral prostate of aging Sprague-Dawley rats. *J Androl* 23 (2002) 341-351.
- [12] Peixoto S, Aguado N, D'Incao F, Wasielesky W, Cousin J.C, Preliminary identification and quantification of the age-pigment lipofuscin in the brain of Farfantepenaeus paulensis (Crustacea: Decapoda). *Braz J Biol* 62 (2002) 871-876.
- [13] Samorajski T, Ordy J, Keefe J, The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. *J Cell Biol* 26 (1965) 779-795.
- [14] Sarikhani F, Poverty, health and development. *Pejvak Keyvan* 14 (2005) 67-73.
- [15] Shen Q, Shang N, Li P, In vitro and in vivo antioxidant activity of Bifido bacterium animalis 01 isolated from centenarians. *Curr Microbiol* 62 (2011) 1097-1103.
- [16] Sohal R, Assay of lipofuscin/ceroid pigment in vivo during aging. *Methods Enzymol* 105 (1984) 484-487.
- [17] Shringarpure R, Grune T, Davies K, Protein oxidation and 20S proteasome dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 1442-1450.
- [18] Tabibi J, Management structure in Iranian health system of justice. *Social Security* 28 (2008) 81-106.
- [19] Terman A, Brunk U.T, Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *Apmis* 1998, 265-276.
- [20] Terman A, Brunk U.T, Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 1400-1404.
- [21] Terman A, Brunk U.T, The aging myocardium: roles of mitochondrial damage and lysosomal degradation. *Heart Lung Circ* 14 (2005) 107-114.

- [22] Thompson SW, Hunt RD, *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. IL: Charles C. Thomas, Springfield 3, 1966.
- [23] Vaez Mahdavi M.R, Rogani M., Kallili M., Dalir R, The effect of food restriction on learning and memory of male Wister rat Behavioral Analysis. *Basic and Clinical Neuroscience* 1 2 (2009) 20-23.
- [24] Wihlmark U, Wrigstad A, Roberg K, Nilsson SE, Brunk UT, Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells causes enhanced sensitivity to blue light irradiation. *Free Radic Biol Med* 22 (1997) 1229-1234.
- [25] Woulfe J, Gray D.A, Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ* 5 (2005) 120-129.
- [26] Yazdani S, Poverty and injustice are the most important social factors influencing health. *Sepid* 2009. Available from <http://www.javanemrooz.com/articles/social/society/organizations/article-8104.aspx>.