

اثرات محافظتی اسید چرب لینولنیک در مقابل سمیت سلولی حاصل از اسید چرب پالمیتیک در سلول‌های قلبی رت

الهام زاده هاشم^{۱*}، فرشته پناهنده^۲، بهزاد لامع‌راد^۳

خلاصه

مقدمه: لیپوتوکسیسیتی از دیاد غلظت چربی داخل سلولی است که از طریق مکانیسم‌های مختلف موجب بروز اثرات مخرب در سلول می‌شود. بیماری‌های قلبی-عروقی ناشی از لیپوتوکسیسیتی به‌طور چشمگیری در جمعیت انسانی در حال افزایش می‌باشند. یافته‌های متعدد حکایت از آن دارد که تأثیر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در بروز لیپوتوکسیسیتی سلولی متفاوت از هم می‌باشند. برخی از اسیدهای چرب نظیر اسید لینولنیک می‌توانند در جلوگیری از بروز لیپوتوکسیسیتی در سلول‌های کبدی موش مؤثر باشند. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر اسید لینولنیک بر شاخص‌های لیپوتوکسیسیتی در سلول‌های عضلات قلبی می‌باشد.

روش: سلول‌های بطنی قلب موش صحرائی بالغ در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت و به‌صورت تصادفی در گروه‌های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسید لینولنیک (۰/۵mM) و ترکیب اسید لینولنیک با اسید پالمیتیک (۰/۵ mM + ۰/۵mM) تحت درمان قرار گرفتند. ارزیابی میزان تری‌گلیسیرید سلولی، دی‌گلیسیرید سلولی، DNA Fragmentation و درصد زنده مانی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت، انجام شد.

یافته‌ها: اضافه کردن اسید لینولنیک به اسید پالمیتیک باعث کاهش میزان DNA Fragmentation و محتوای دی‌گلیسیرید سلولی، افزایش میزان تری‌گلیسیرید سلولی و زنده مانی سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک به‌تنهایی شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: اسید لینولنیک می‌تواند شاخص‌های لیپوتوکسیسیتی حاصل از اسید پالمیتیک را در کشت اولیه عضلات قلبی رت بالغ بهبود ببخشد.

واژه‌های کلیدی: اسید لینولنیک، لیپوتوکسیسیتی، اسید پالمیتیک، عضله قلبی رت، بیماری قلبی-عروقی

۱- استادیار، بخش فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۲- دانش‌آموخته یوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران ۳- استادیار یوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: e.zadehashem@urmia.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۱۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۱/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۵

مقدمه

اسیدهای چرب و متابولیت‌های آنها عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی دارند. این ترکیبات نه تنها به عنوان منابع تامین انرژی عمل می‌کنند، بلکه در ساختار سلولی و بین سلولی و سیگنال‌های سلولی نیز نقش دارند. خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و فیزیولوژیکی اسیدهای چرب را، ساختمان این مولکول‌ها از نظر طول زنجیره کربنی، درجه غیراشباع بودن و تعداد و محل قرار گرفتن پیوند دو گانه در زنجیره کربنی تعیین می‌کنند (۱). بر اساس وجود یا نبود باند دو گانه، اسیدهای چرب به دو دسته ی غیر اشباع و اشباع تقسیم بندی می‌شوند (۲). در صورتی که بین دریافت و مصرف اسید چرب در سلول تعادل وجود نداشته باشد، در اثر ازدیاد غلظت چربی، تغییراتی در سلول یا عضو ایجاد می‌شود که به آن لیپوتوکسیسیتی می‌گویند. لیپوتوکسیسیتی برای هر نوع سلول می‌تواند خصوصیات خاصی داشته باشد و فرایندهایی را ایجاد کند که در نهایت موجب اختلال عملکرد و مرگ سلول شود (۳). مطالعات حاکی از آن است که در سلول‌های قلبی، لیپوتوکسیسیتی از طریق افزایش میزان لیپیدهای مخرب نظیر دی گلیسرید (DAG) موجب بروز آسیب سلولی می‌شود (۴).

اسید پالمیتیک از انواع اسیدهای چرب اشباع می‌باشد که در چربی‌های حیوانی، روغن نارگیل و خرما به میزان زیاد وجود دارد (۲). اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتات در همه ی کشت‌های سلولی سمی بوده‌اند، زیرا باعث القای استرس اکسیداتیو و نیز آسیب به میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی و القای آپوپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) می‌شوند (۵). در حالی که اسیدهای چرب غیر اشباع، یا غیر سمی بوده یا اثرات محافظتی روی سلول‌ها دارند (۶). مطالعات نشان داده‌اند که برخی از اسیدهای چرب غیر اشباع

نظیر اسید اولئیک (۹-n)، می‌توانند در جلوگیری از بروز لیپوتوکسیسیتی و آپوپتوزیس در سلول‌های کبدی رت مبتلا به لیپوتوکسیسیتی (۷) و نیز اسید لینولئیک (۶-n) در جلوگیری از آپوپتوز ناشی از اسید پالمیتیک در سلول‌های فیروبلاست انسانی مؤثر باشند (۸).

اسید چرب لینولئیک (۱۸ کربنه و دارای سه باند دو گانه)، اسید چرب ضروری، از خانواده ی ۳-n می‌باشد که در بذر کتان، بذرک و ماهی وجود دارد (۲،۶). بیشترین مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع از خانواده ی ۳-n در روغن ماهی وجود دارند (۹). اسیدهای چرب ۳-n در بدن به ترکیبات پروستاگلاندین‌ها و ایکوزانوئیدها تبدیل می‌شوند. پروستاگلاندین‌ها در تنظیم فشار خون، پاسخ آلرژیک، تولید انرژی، تنظیم هورمون‌های جنسی، تقویت سیستم ایمنی، کنترل التهاب و مقابله با عفونت‌ها نقش دارند (۱۰). این اسیدهای چرب به غشای سلول‌ها خاصیت سیالیت و انعطاف‌پذیری داده و تبادل مواد از این غشاء را تسهیل می‌نمایند (۱۱). همچنین، اسیدهای چرب ۳-n با کاهش تولید لیپوپروتئین‌ها با چگالی خیلی کم (VLDL) در کبد، سبب کاهش تری‌گلیسریدها شده و در کاهش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) و افزایش لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا (HDL) بسیار اهمیت دارند (۱۲). اضافه کردن اسید لینولئیک با دوز ۱۵۰ یا ۲۵۰ میکرومولار به همراه ۲۵۰ میکرومولار اسید استئاریک به کشت سلول‌های کبدی رت و انکوبه کردن آن سلول‌ها به مدت ۱۶ ساعت باعث کاهش مرگ سلولی و کاهش القای پروتئین‌های استرس اکسیداتیو توسط اسید استئاریک می‌شود (۱۳).

در این راستا، تاکنون تأثیر اسید چرب لینولئیک (۳-n)، بر سلول‌های قلبی مبتلا به لیپوتوکسیسیتی مورد مطالعه قرار

به همراه تورین، کراتین، کارنیتین و 4% FCS (Fetal Calf Serum) به پلت سلولی مرحله قبل اضافه شد.

شمارش سلول‌ها و افزودن اسیدهای چرب: سلول‌ها شمارش شدند و به تعداد مورد نظر (حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول) به همراه محیط کشت M۱۹۹ به همراه تورین، کراتین، کارنیتین و 4% FCS به پلت‌های ۲۴ خانه انتقال داده شد و به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. پلت‌های ۲۴ خانه با بافر شستشوی حاوی کلسیم و منیزیم شستشو داده شد. نهایتاً اسیدهای چرب مورد نظر (اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسید لینولنیک (۰/۵mM) و ترکیب اسید لینولنیک + اسید پالمیتیک (۰/۵mM) + BSA (۰/۵) به عنوان گروه‌های درمانی و ۰/۵mM از BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان گروه کنترل در این مرحله به محیط کشت سلول‌ها اضافه شدند. قابل ذکر است که تمام اسیدهای چرب مورد استفاده، نیز به صورت کونژوگه با BSA استفاده شدند. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (حاوی ۹۵% O₂ و ۵% CO₂، دما ۳۷ °C) کشت داده شدند و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج لیپید سلولی: لیپید سلولی طبق روش پیشنهادی Bligh and Dyer استخراج شد (۱۵). در این روش سلول‌های هر چاهک در حضور متانول و اسید استیک خراشیده شدند و داخل لوله آزمایش ریخته شدند. سپس با اضافه کردن ترکیب کلروفرم/متانول مخلوط شدند و به ترتیب کلروفرم و بعد ۲ mL محلول کلرید سدیم اضافه شد و در نهایت سانتریفیوژ گردید. فاز پایینی جمع‌آوری شد و در لوله مجزایی قرار داده شد. به فاز بالایی، کلروفرم اضافه شد و مشابه مرحله قبل سانتریفیوژ شد. فاز پایینی مجدداً جمع‌آوری شد و

نگرفته است. از این رو مطالعه‌ی تأثیر این دسته از اسیدهای چرب بر شاخص‌های لیپوتوکسیسیتی در سلول‌های قلبی، می‌تواند گام مؤثری در زمینه‌ی یافتن تأثیر این اسید چرب بر وضعیت سلول‌های عضله قلبی مذکور و احتمالاً تأثیر این اسید چرب در کاهش بیماری‌های قلبی مبتلا به لیپوتوکسیسیتی باشد.

روش بررسی

جداسازی و کشت سلول‌های بطنی قلب موش صحرائی بالغ: سلول‌های قلبی رت بالغ طبق روش Piper and Volz جداسازی و کشت شد (۱۴). به صورت خلاصه قبل از بیهوشی به هر موش صحرائی ۵۰۰ واحد بین المللی هپارین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پوست به کمک قیچی شکافته و برای باز کردن قفسه سینه، جناغ از خط وسط قطع شد قفسه صدری موش‌های صحرائی با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و قلب به همراه قسمتی از ریه برداشته شد. قلب در پتری دیش حاوی سرم فیزیولوژی سرد شده با یخ غوطه‌ور شد. قلب از طریق آئورت به سیستم پرفیوژن متصل گردید. در ادامه ۰/۱۵ گرم تریپسین و ۰/۰۶ گرم EDTA) به بافر پرفیوژن اضافه شد و پرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. تمامی بافرها با ترکیب ۹۵% O₂ و ۵% CO₂ مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله بطن‌ها از دهلیزها جدا شدند و با اسکالپل یا قیچی به صورت سوسپانسیون سلولی به قطر ۰/۷ میلی‌متر تبدیل شدند. سوسپانسیون سلولی از الک ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و به مدت ۶ دقیقه در ۲۵ g سانتریفیوژ شد. پلت سلولی به ترتیب در محلول ۰/۲٪، ۰/۴٪ و ۱٪ کلرید کلسیم دوباره معلق شد و مانند مرحله قبل سانتریفیوژ گردید. بر روی پلت سلولی حاصل، محیط حاوی آلبومین سرم گاوی، اضافه شد و محلول به مدت ۳ دقیقه در ۱۵ g سانتریفیوژ گردید. محیط کشت M۱۹۹

اندازه‌گیری پروتئین تام: براساس روش پیشنهادی Bradford پروتئین سلولی اندازه‌گیری شد (۱۸). در این روش با استفاده از معرف Bradford و استانداردهای تهیه شده از BSA، میزان پروتئین سلولی در طول موج ۵۹۵ قرائت گردید.

ارزیابی DNA Fragmentation سلولی: DNA Fragmentation سلولی طبق روش پیشنهادی Sandau ارزیابی شد (۱۹). سلول‌های هر چاهک به میکروتیوب مجزا منتقل شد و هر چاهک با ۵۰۰ μL بافر Lysis شسته شد و به سلول‌های موجود در میکروتیوب مربوطه اضافه شد و در دمای 4°C قرار داده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در 27000 g با دمای 4°C درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی (s)، از پلت (p) جدا شد و در میکروتیوب دیگری ریخته شد و در هر دو، تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد و در دمای 4°C قرار داده شدند. برای هیدرولیز DNA، به پلت حاصل از s و به پلت حاصل از p ۵٪ TCA اضافه شد و ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای 90°C قرار گرفت. در نهایت DPA reagent به آن‌ها اضافه شد و ۲۴-۱۲ ساعت بعد، OD مربوط به s و p در طول موج 600 nm قرائت شد.

$$\text{DNA Fragmentation \%} = [\text{OD s} / (\text{OD p} + \text{OD s})] \times 100$$

ارزیابی زنده مانی سلول با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو: زنده مانی سلولی طبق روش پیشنهادی Pienata and Lehr ارزیابی شد (۲۰). به هر چاهک تریپسین - EDTA ۰/۲۵٪ اضافه شد و پلیت به مدت ۴-۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. سپس به هر چاهک محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد و بعد از رقیق سازی، ۱ μL از سوسپانسیون سلولی به یک میکروتیوب انتقال داده شد و حدود ۶۰ درصد از تریپان بلو ۰/۴٪ و حدود ۴۰ درصد از محلول PBS به میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب را کاملاً مخلوط کرده و ۱۵-۱۰

به لوله‌های حاوی این فاز اضافه گردید. محتوای لوله‌ها هوادهی شدند و ۰/۵ mL کلروفورم/متانول به هر یک اضافه شد و نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

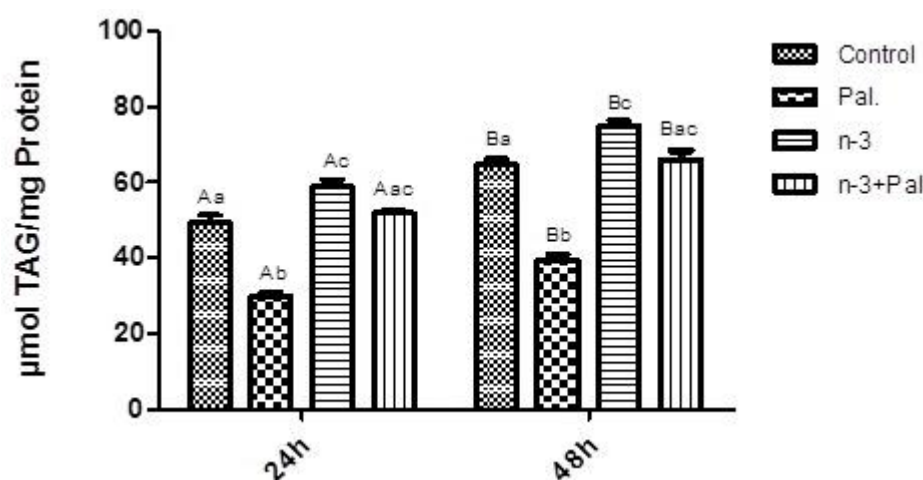
اندازه‌گیری تری‌گلیسرید سلولی: تری‌گلیسرید سلولی طبق روش پیشنهادی Neri and Frings اندازه‌گیری شد (۱۶). به ۵۰ میکرولیتر از لیپید استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. سپس محلول صابونی کننده اضافه گردید و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. سپس به ترتیب، بعد از اضافه کردن محلول پریدات و معرف استیل استن به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری 65°C قرار داده شد و جذب نوری نمونه‌ها در 410 nm در مقابل لوله شاهد قرائت شده و با استفاده از منحنی استاندارد و نیز اعمال ضریب رقت، مقدار تری‌گلیسرید محاسبه گردید.

اندازه‌گیری دی‌گلیسرید سلولی: دی‌گلیسرید سلولی طبق روش پیشنهادی Baldanzi و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۷). پلیت‌های سیلیکاژل (TLC Silicagel 60 F254, Merck) با استفاده از متانول فعال شدند. به ۵۰ μL از لیپید استخراج شده، ۵۰ μL از کلروفورم اضافه شد و روی پلیت‌های سیلیکاژل به همراه استاندارد دی‌گلیسرید لکه‌گذاری شد. پلیت در تانک حاوی دی‌اتیل اتر/هپتان/اسید استیک (v:v:v) (۱:۲۵:۷۵) قرار داده شد. پلیت بعد از اتمام حرکت حلال خشک شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کوماسی ۰/۰۰۳ درصد تهیه شده در 100 mM NaCl و متانول ۳۰ درصد رنگ شد. با استفاده از نرم افزار Power Scan 2012 باندهای تشکیل شده در مقابل باندهای حاصل از استاندارد کمی شدند.

نتایج

تری گلیسرید سلولی

تری گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، در گروه اسید پالمیتیک، کمتر از گروه‌های دیگر بوده ($P < 0/01$) و میزان تری گلیسرید در گروه اسید لینولنیک به مراتب بیش از تری گلیسرید مشاهده شده در گروه کنترل و اسید پالمیتیک بود ($P < 0/01$). میزان تری گلیسرید در گروه ترکیبی نیز فقط نسبت به گروه اسید پالمیتیک بیشتر بود ($P < 0/01$). همچنین میزان تری گلیسرید سلولی در همه گروه‌ها، در زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه مشابه در زمان ۲۴ ساعت افزایش قابل توجهی را نشان داد ($P < 0/03$). نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده‌اند.



نمودار ۱: مقادیر تری گلیسرید سلولی در کشت اولیه سلول‌های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. a, b و c اختلاف آماری را بین گروه‌ها در یک زمان مشخص نشان می‌دهند و A و B اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهند.

دی گلیسرید سلولی

افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/3$). میزان دی گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ ساعت در گروه کنترل کمتر از گروه‌های دیگر بود، طوری که این اختلاف با گروه اسید پالمیتیک چشم گیر بود ($P < 0/004$), ولی اختلاف

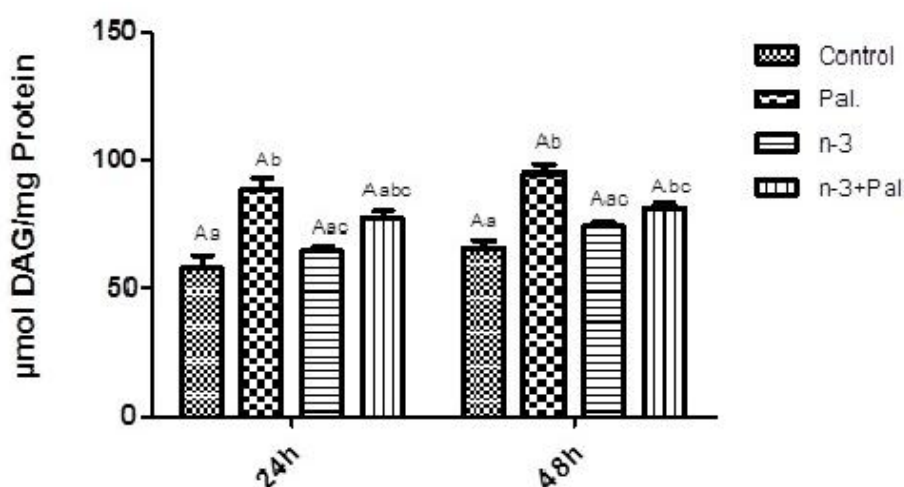
از سوسپانسیون سلولی به لام هموسیتومتر انتقال داده شد. در زیر میکروسکوپ تعداد سلول‌ها در ۴ مربع گوشه‌ای شمرده شد (سلول زنده و مرده جداگانه شمرده شد) و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد.

آنالیز آماری داده‌های موجود با نرم افزار Sigma Stat (version 3.5)، با آزمون آماری One-way ANOVA و t-test انجام شد. سطح معنی‌داری داده‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

دی گلیسرید سلولی، در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۴۸ ساعت افزایش یافت، البته این

آماري معنی‌داری نداشت ($P > 0/06$)، اما با گروه اسیدپالمیتیک اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($P < 0/01$). در این زمان نیز، میزان دی‌گلیسرید گروه اسیدپالمیتیک بیشتر از گروه‌های دیگر بود، که فقط با گروه ترکیبی اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج در نمودار ۲ نشان داده شده‌اند.

مذکور بین گروه کنترل و گروه اسیدلینولنیک و گروه ترکیبی بارز نبود ($P > 0/09$). در حالی که، میزان دی‌گلیسرید گروه اسیدپالمیتیک بیشتر از گروه‌های دیگر بود، اما فقط با گروه ترکیبی اختلاف چشم‌گیری نداشت ($P > 0/09$). میزان دی‌گلیسرید گروه اسیدلینولنیک در زمان ۴۸ ساعت، مابین گروه کنترل و گروه ترکیبی قرار داشت که با هیچ کدام از گروه‌های مذکور اختلاف

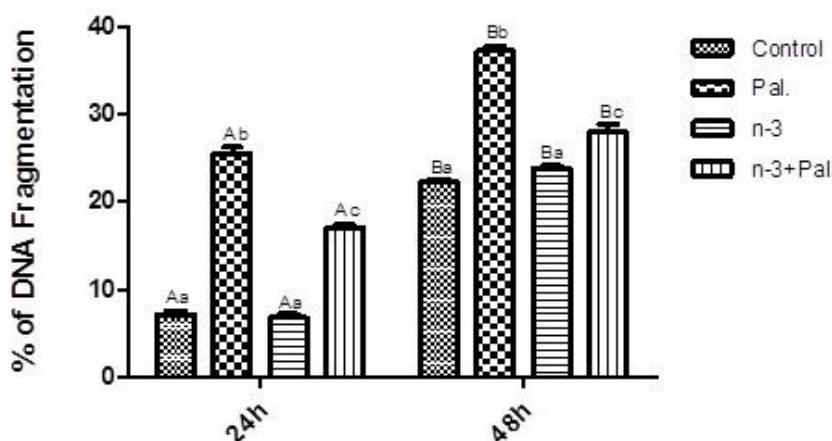


نمودار ۲: مقادیر دی‌گلیسرید سلولی در کشت اولیه سلول‌های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. a, b و c اختلاف آماری را بین گروه‌ها در یک زمان مشخص نشان می‌دهند و A و B اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهند.

($P < 0/001$)، در حالی که با اضافه کردن اسیدلینولنیک به اسیدپالمیتیک (گروه ترکیبی)، درصد DNA fragmentation در مقایسه با گروه اسیدپالمیتیک کاهش یافت ($P < 0/002$). در دو زمان مذکور، اختلافی در درصد DNA fragmentation بین گروه کنترل و گروه اسیدلینولنیک مشاهده نشد ($P > 0/32$). نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده‌اند.

DNA fragmentation

درصد DNA fragmentation، در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۴۸ ساعت افزایش چشم‌گیر یافت ($P < 0/007$). اختلاف معنی‌دار درصد DNA fragmentation بین گروه اسیدپالمیتیک با سایر گروه‌ها هم در زمان ۲۴ ساعت و هم در زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد. در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، اسیدپالمیتیک، درصد DNA fragmentation را در مقایسه با گروه کنترل، افزایش داد

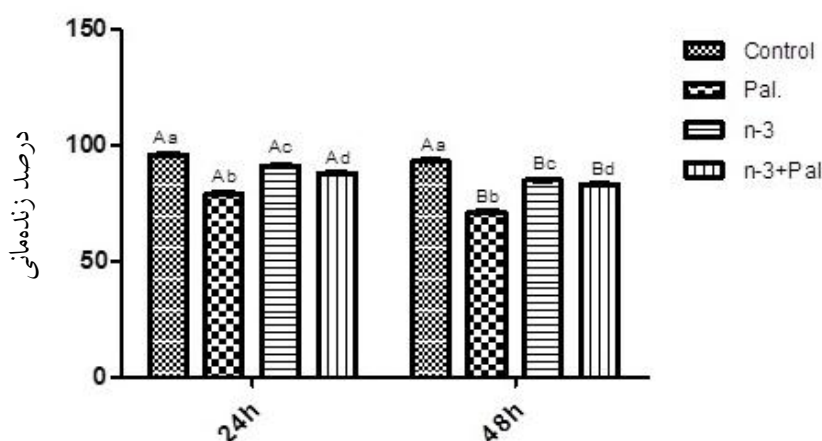


نمودار ۳: درصد *DNA fragmentation* در کشت اولیه سلول‌های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. *a, b, c* و *a, b, c* اختلاف آماری را بین گروه‌ها در یک زمان مشخص نشان می‌دهند و *A* و *B* اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهند.

اسیدلینولنیک ($P < 0.02$) مشاهده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها، در گروه‌های درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۴۸ ساعت کاهش مشخص یافت ($P = 0.003$)، اما این کاهش در گروه کنترل چشم‌گیر نبود ($P = 0.06$). نتایج در نمودار ۴ نشان داده شده‌اند.

زنده‌مانی سلولی

درصد زنده‌مانی سلولی، در گروه اسیدپالمیتیک، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سه گروه دیگر، دارای کمترین مقدار بود. در زمان‌های مذکور، سلول‌های زنده به‌صورت مشخص در گروه ترکیبی، بیشتر از گروه اسیدپالمیتیک ($P < 0.01$)، در گروه اسیدلینولنیک بیشتر از گروه ترکیبی ($P < 0.04$) و در گروه کنترل بیشتر از گروه



نمودار ۴: درصد زنده‌مانی در کشت اولیه سلول‌های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه‌های کنترل، درمانی با اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. *a, b, c* و *a, b, c* اختلاف آماری را بین گروه‌ها در یک زمان مشخص نشان می‌دهند و *A* و *B* اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهند.

پروتئین تام

اسید پالمیتیک، اسید لینولنیک و اسید لینولنیک+اسید پالمیتیک به شرح جدول ۱ می‌باشد.

میزان پروتئین در سلول‌های عضلانی قلب رت بالغ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در گروه‌های کنترل و درمانی با

جدول ۱: اندازه‌گیری میزان پروتئین تام در گروه‌های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولنیک و اسید لینولنیک+اسید پالمیتیک در زمان ۴۸ ساعت. مقادیر به صورت $Mean \pm SE$ نمایش داده شده است.

میزان پروتئین تام ($\mu\text{g/ml}$)	گروه‌ها
$2/27 \pm 0/27$	کنترل
$2/72 \pm 0/06$	اسید پالمیتیک
$2/01 \pm 0/25$	اسید لینولنیک
$2/15 \pm 0/11$	اسید لینولنیک+اسید پالمیتیک

بحث

پالمیتیک، می‌تواند باعث افزایش تشکیل تری‌گلیسیرید در سلول‌های مذکور شود یا نه، اندازه‌گیری گردید. زمانی که اسید لینولنیک همزمان با اسید پالمیتیک به محیط کشت سلولی اضافه گردید، افزایش در میزان تری‌گلیسیرید در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. شبیه این الگو در زمان ۴۸ ساعت نیز تکرار گردید. به نظر می‌رسد که اسیدهای چرب غیراشباع از طریق تغییرات داخل سلولی اثرات سمی اسید پالمیتیک را جلوگیری یا کاهش می‌دهند. اولین گام در غیر سمی کردن این اسید چرب سمی، استریفیکاسیون این اسید چرب به تری‌گلیسیرید بوده، که این چربی خنثی به راحتی و بدون ایجاد خطر زیاد می‌تواند در سلول ذخیره گردد. گام بعدی در از بین بردن اثرات سمی این اسید چرب، القای اکسیداسیون اسید چرب در میتوکندری به واسطه‌ی تحریکات ناشی از MUFA می‌باشد (۶). به نظر می‌رسد که به‌دنبال تیمار سلول با اسیدهای چرب اشباع، یک یا چندین مرحله از مراحل تشکیل تری‌گلیسیرید که در شبکه آندوپلاسمی اتفاق می‌افتد دچار نقص می‌شود، درحالی که

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که اسید لینولنیک، باعث کاهش محتوای DAG سلولی، افزایش میزان تری‌گلیسیرید سلولی، همچنین باعث کاهش میزان DNA Fragmentation و جلوگیری از مرگ سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک می‌شود. تجویز همزمان اسید لینولنیک با اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک بر روی سلول‌های مذکور گردید.

در حضور مقدار ۰/۵ mM اسید اولئیک، سلول‌های بطنی قلب موش صحرایی سلامت خود را حفظ کرده و مقادیر کافی از تری‌گلیسیرید را در سیتوزول خود ذخیره می‌کنند (۲۱). به نظر می‌رسد که اثرات محافظتی اسیدهای چرب غیراشباع در جلوگیری از لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک به دلیل تبدیل پالمیتات به تری‌گلیسیرید و فعال کردن مسیرهای مرتبط با ابقای سلولی باشد (۲۲). در مطالعه حاضر میزان تری‌گلیسیرید سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون، برای ارزیابی اینکه آیا اسید لینولنیک، همانند اسید اولئیک در تجویز توام با اسید

سلول‌های غیر چربی به وسیله شرکت دادن اسیدپالمیتیک در تشکیل تری‌گلیسیرید محافظت می‌کنند. این تجمع در واقع دفاع اولیه سلولی در مقابل لیپوتوکسیسیتی می‌باشد (۳۱).

زمانی که درجه‌ی اشباع DAG افزایش پیدا می‌کند، توانایی واکنش با پروتئین کیناز نوع C کاهش می‌یابد. دلیل پدیده‌ی مذکور، تغییر فیزیکی و شیمیایی DAG از حالت کریستال مایع به حالت ژله‌ای می‌باشد که در این حالت واکنش‌پذیری این ترکیب با واسطه‌های لازم برای تبدیل آن به TAG کاهش می‌یابد (۲۵-۲۳). تجویز اسید چرب غیراشباع می‌تواند حالت کریستال مایع را در ترکیب DAG مجدداً ایجاد کرده و توانایی واکنش‌پذیری این ترکیب با پروتئین‌های لازم برای تبدیل این ترکیب به TAG را دوباره فراهم کند (۳۲). در بین اسیدهای چرب غیراشباع نیز توانایی و ظرفیت تبدیل DAG به TAG متفاوت است. تیمار هپاتوسیت‌ها با EPA باعث کاهش نرخ TAG/DAG در مقایسه با تیمار با اسید اولئیک و DHA گردید (۳۳). اسیدهای چرب غیراشباع با مکانیسم‌های ناشناخته به پاکسازی اسیدهای چرب اشباع کمک می‌کنند (۳۴). همچنین نشان داده شده است که اسیدهای چرب غیراشباع نظیر اسید اولئیک در شرایط تغذیه‌ای نامناسب (رژیم غذایی نامتعادل و بیش از حد) به تعادل وزن بدن کمک می‌کنند. با این ویژگی اسیدهای چرب غیراشباع می‌توانند در رژیم‌های درمانی برای مدیریت چاقی و در نتیجه عواقب ناشی از چاقی نظیر بیماری‌های قلبی-عروقی مفید واقع شوند (۳۴). مطالعه انجام شده نشان می‌دهد که اسید لینولنیک می‌تواند باعث کاهش اثرات سمی اسیدپالمیتیک شده و لیپوتوکسیسیتی ناشی از DAG که توسط اسید پالمیتیک القاء می‌شود را از بین ببرد. با توجه به دانش نویسندگان این اولین گزارش از اثرات پیشگیرانه‌ی

در تیمار با اسیدهای چرب دارای پیوند غیر اشباع چنین نقضی دیده نمی‌شود. همچنین درجه‌ی اشباع اسیدهای چرب که در فرایند ساخت تری‌گلیسیرید نقش دارند، مانند اسید فسفاتیدیک و دی‌آسیل‌گلیسرول می‌توانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این ترکیبات را تحت تأثیر قرار داده و بدین سبب واکنش‌های آنها را با پروتئین‌های مربوطه تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۶-۲۳). در مطالعات مشابه دیگر نیز نشان داده شد که اسیدهای چرب غیراشباع منجر به تشکیل قطرات لیپید در سیتوزول سلول‌های C2C12 می‌شوند، در حالی که اسیدهای چرب اشباع به تنهایی منجر به شکل‌گیری این قطرات لیپیدی نمی‌شوند. اما در تجویز همزمان با اسیدهای چرب غیراشباع، در شکل‌گیری قطرات لیپیدی خنثی که همان تری‌گلیسیرید هستند، شرکت می‌کنند (۲۷). اثر بیولوژیکی تجمع تری‌گلیسیرید روی لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسیدپالمیتیک بحث برانگیز می‌باشد. مطالعات اولیه گزارش کرده‌اند که تجمع تری‌گلیسیرید سیگنال‌های خطرناکی در توسعه آسیب‌شناسی مرتبط با متابولیسم غیرطبیعی لیپید ایجاد می‌کند (۲۸). تجمع تری‌گلیسیرید در سلول‌های بتای پانکراس در ارتباط نزدیک با اختلال ترشح انسولین می‌باشد (۲۸). در مقابل گزارش شده است که اسیدهای چرب که توانایی بالا در ساخت تری‌گلیسیرید دارند، در پیشگیری از آپوپتوزیس وابسته به اسیدپالمیتیک به وسیله تجزیه اسیدپالمیتیک به ذخایر تری‌گلیسیرید شرکت می‌کنند (۲۹). Cnop و همکاران نشان دادند که رابطه معکوسی میان درصد سلول‌های بتای مرده پانکراس و محتوای تری‌گلیسیرید سلولی شان وجود دارد (۳۰). همچنین گزارشات مبنی بر این وجود دارد که اسیدهای چرب غیراشباع، آپوپتوزیس القا شده با اسیدپالمیتیک را در

مرکزی در ایجاد و پیشرفت نارسایی قلبی دارد (۳۹). همچنین مشخص شده است که اسید پالمیتیک طیف وسیعی از انواع مرگ سلولی را بسته به انواع سلول‌ها القا می‌کند که باید از راهکارهای متناسب با نوع مرگ سلولی، جهت مقابله با سیگنال‌های لیپوتوکسیسیته ناشی از آن، استفاده کرد (۲۷). با توجه به دانش نویسنده‌گان، گزارشی از اثر اسید لینولنیک بر روی زنده مانده سلول‌های بطنی قلب موش صحرائی بالغ وجود ندارد تا بتوان با نتایج مطالعه‌ی حاضر مقایسه کرد. هر چند که مطالعات دیگری اثرات مفید اسید چرب اولئیک را در جلوگیری از مرگ سلولی در تجویز توام با اسید پالمیتیک گزارش کرده‌اند (۲۱، ۷). در مطالعه‌ی نشان داده شد که اسید اولئیک در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع، نقش محافظتی در مقابل التهاب و مرگ سلولی دارد که احتمالاً این اثر به دلیل افزایش سرعت اکسیداسیون لیپید در ماهیچه‌های اسکلتی است (۴۲-۴۰).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن اسید لینولنیک به اسید پالمیتیک باعث کاهش محتوای DAG سلولی، افزایش میزان تری گلسیرید سلولی، همچنین باعث کاهش میزان DNA Fragmentation و جلوگیری از مرگ سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک می‌شود. در نتیجه تجویز همزمان اسید پالینولئیک و اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک بر روی سلول‌های مذکور می‌شود.

اسید لینولنیک بر روی تشکیل DAG ناشی از پالمیتات بر روی سلول‌های عضلات قلبی موش صحرائی بالغ می‌باشد. تقسیم شدن و تکه تکه شدن DNA ژنومیک به ویژه در مناطق نوکلئوزوم از علائم آپوپتوزیس می‌باشد (۳۵). تکه تکه شدن DNA باعث ایجاد الگوی DNA Fragmentation خواهد شد. اسیدهای چرب غیراشباع اثرات آنتاگونیست کننده بر علیه لیپوتوکسیسیته القا شده با اسیدهای چرب اشباع دارند (۳۶). تیمار سلول‌های بتای انسانی با اسیدهای چرب غیراشباع به صورت کامل از آپوپتوزیس ناشی از اسیدهای چرب اشباع پیشگیری کرد (۳۶). تیمار ۱۶ ساعته‌ی سلول‌های بطنی قلب موش صحرائی نوزاد با ۰/۲۵ یا ۰/۵ mM پالمیتات باعث القای معنادار DNA Fragmentation در مقایسه با گروه کنترل شد (۲۱). همچنین پالمیتات منجر به افزایش DNA Fragmentation در سلول‌های C2C1 در غلظت ۰/۵ mM شد (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر اسید پالمیتیک باعث افزایش معناداری در DNA Fragmentation در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین، زمانی که اسید لینولنیک همزمان با اسید پالمیتیک به محیط کشت سلولی اضافه گردید، باعث کاهش میزان DNA Fragmentation در زمان‌های ۲۴، ۴۸ ساعت شد.

در مطالعه‌ی حاضر درصد زنده مانده سلول‌های عضلات قلب در گروه اسید پالمیتیک به طور معناداری کمتر از گروه‌های کنترل و اسید لینولنیک در تمام طول دوره‌ی کشت سلولی بود. اسید پالمیتیک مرگ سلولی و آپوپتوزیس را القا می‌کند (۳۷، ۳۸). به تازگی مشخص شده است که آپوپتوزیس سلول‌های بطنی قلب نقش مهم و

References

- Carlson L, Nilsson I, Oscarsson J. Hormonal regulation of liver fatty acid binding protein in vivo and in vitro: Effects of growth hormone and Insulin. *Endocrinology* 1998; 139(6): 2699-709.
- Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(7): 585-94.
- Ulloth JE, Casiano CA, De Leon M. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 2003; 84(4): 655-68.
- Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM, Trucillo MP, Pimentel DR, Ido Y, et al. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(1): 309-15.
- Preedy VR, Reilly ME, Mantle D, Peters TJ. Oxidative damage in liver diseases. *J Int Fed Clin Bio Chem* 1998; 10(1): 16-20.
- Nolan C J, Larter CZ. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(5): 830-40.
- Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pintti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(5): 830-40.
- Beeharry N, Lowe JE, Hernandez AR, Chambers JA, Fucassi F, Cragg PJ, et al. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutat Res* 2003; 530(1-2): 27-33.
- Azain MJ. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J Anim Sci* 2004; 82(3): 916-24.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nut* 2002; 21(6): 495-505.
- Baile CA, Della-fera MA, Martin RJ. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 2002; 20: 105-27.
- Zurier B, Essential fatty acids and inflammation. *Ann Rheum Dis* 1991; 50(11):745-47.
- Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L. a-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011; 10:81.
- Piper HM, Jacobsen SL, Schwartz P. Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 20: 825-35.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8): 911-7.
- Neri BP, Frings CS. Improved method for determination of triglycerides in serum. *Clin Chem* 1973; 19(10): 1201-2.

17. Baldanzi G, Alchera E, Imarisio C, Gaggianesi M, Dal Ponte C, Nitti M, Domenicotti C, et al. Negative regulation of diacylglycerol kinase theta mediates adenosine-dependent hepatocyte preconditioning. *Cell Death Differ* 2010; 17(6): 1059-68.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248- 54.
19. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997; 52(2): 378-86.
20. Pienta KJ, Lehr JE. Inhibition of prostate cancer cell growth by estamurine and etoposide: Evidence for interaction of the nuclear matrix. *J Urol* 1993; 49: 1622-5.
21. De Vries JE, Vork MM, Roemen TH, de Jong YF, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 1997; 38(7): 1384-94.
22. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the Heart. *Curr Hypertens Rep* 2005; 7: 412-7.
23. Goldberg EM, Lester DS, Borchardt DB , Zidovetzki R. Effects of diacylglycerols and Ca²⁺ on structure of phosphatidylcholine / phosphatidylserine bilayers. *Biophys J* 1994; 66(2pt1): 382-93.
24. Coleman R, Bell RM. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J Biol Chem* 1976; 251(15): 4537-43.
25. Mori T, Takai Y, Yu B, Takahashi J, Nishizuka Y, Fujikura T. Specificity of the fatty acyl moieties of diacylglycerol for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biochem* 1982; 91(2): 427-31.
26. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 38061-7.
27. Cheon HG, Cho YS. Protection of palmitic acid-mediated lipotoxicity by arachidonic acid via channeling of palmitic acid into triglycerides in C2C12. *J Biomed Sci* 2014; 21(1):13.
28. Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, et al. Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology* 2004; 145(8):3566-77.
29. Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, Segu VB, Poitout V. Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 2001; 50(2):315-21.
30. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship

- between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001; 50(8):1771-7.
31. Keane DC, Takahashi HK, Dhayal S, Morgan NG, Curi R, Newsholme P. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic beta-cell line. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120(5):195-206.
 32. Goldberg EM, Zidovetzki R. Effects of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys J* 1997; 73(5): 2603-14.
 33. Berge RK, Madsen L, Vaagenes H, Tronstad KJ, Göttlicher M, Rustan AC. In contrast with docosahexaenoic acid, elcosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem J* 1999; 343(part 1): 191-7.
 34. Lim JH, Gerhart-Hines Z, Dominy JE, Lee Y, Kim S, Tabata M, et al. Oleic acid Stimulates Complete Oxidation of Fatty Acids through PKA-dependent activation of SIRT1/PGC1 complex. *J Biol Chem* 2013; 288(10): 7117-26.
 35. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1): 3-15.
 36. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):853-6.
 37. Tan SH, Shui G, Zhou J, Li JJ, Bay BH, Wenk MR, et al. Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). *J Biol Chem* 2012; 287(18):14364-76.
 38. Khan MJ, Rizwan Alam M, Waldeck-Weiermair M, Karsten F, Groschner L, Riederer M, et al. Inhibition of autophagy rescues palmitic acid-induced necroptosis of endothelial cells. *J Biol Chem* 2012; 287(25):21110-20.
 39. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336(16): 1131-41.
 40. Coll T, Eyre E, Rodriguez-Calvo R, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2008; 283(1): 11107-16.
 41. Kien CL. Dietary interventions for metabolic syndrome: role of modifying dietary fats. *Curr Diab Rep* 2009; 9(1): 43-50.
 42. Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. *Br J Nutr* 2009; 102(11): 1557-63.

Protective Effects of Linoleic Acid against the Cytotoxicity of Palmitic Fatty Acid in Rat Cardiomyocytes

Elham Zadeh Hashem, Ph.D.^{1*}, Freshteh Panahandeh, MSc.², Behzad Lame-Rad, Ph.D.³

1. Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Biochemistry, Payame Noor University, Branch of Tehran- Shargh, Tehran, Iran

3. Assistant Professor of Biochemistry, Payame Noor University, Branch of Tehran- Shargh, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: e.zadehashem@urmia.ac.ir

(Received: 7 Nov. 2015 Accepted: 23 Feb. 2016)

Abstract

Background & Aims: Lipotoxicity is the process through which accumulation of lipid intermediates leads to cellular dysfunction. The worldwide prevalence of cardiovascular diseases has been increased dramatically due to lipotoxicity. According to the performed studies, saturated and unsaturated fatty acids differ significantly in their contributions to lipotoxicity. It has been reported that linolenic acid prevents lipotoxicity in rat hepatocytes. The objective of the present study was to evaluate the effects of linolenic acid on the lipotoxicity induced by palmitic acid in adult rat cardiomyocyte.

Methods: Ventricular heart muscle cells were isolated and seeded into 24-well-plates. Cells were randomly treated with palmitic acid (0.5 mM), linolenic acid (0.5 mM), palmitic acid+ linolenic acid (0.5 mM+0.5 mM) or left as control. Triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), DNA fragmentation and percent of viability were measured at 24, 48 hours.

Results: Linolenic acid decreased DAG and DNA fragmentation and increased TAG and viability when co-administrated with palmitic acid in comparison with palmitic acid alone ($P < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, linolenic acid significantly eliminates induced lipotoxicity induced by palmitic acid in primary adult rat cardiomyocytes culture.

Keywords: Linolenic acid, Lipotoxicity, Palmitic acid, Myocytes, Rat, Cardiovascular disease