

## اثر تجویز هم زمان اسیدهای چرب لینولنیک و لینولئیک در کاهش لیپوتوکسیسیتی در سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی بالغ

نویسندگان:

الهام زاده هاشم<sup>۱\*</sup>، مینا خدادادی<sup>۲</sup>، لاجین موسوی<sup>۱</sup>، رضوان سپهری وفا<sup>۱</sup>

۱- بخش فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.16, No.3, Fall 2018

## چکیده:

**مقدمه:** اثرات مخرب ناشی از تجمع چربی داخل سلولی در بافت‌های غیر از بافت چربی به عنوان لیپوتوکسیسیتی شناخته می‌شود. میزان شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی ناشی از لیپوتوکسیسیتی به طور چشمگیری در سراسر جهان در حال افزایش است. بر اساس گزارش‌های موجود اسید پالمیتیک سبب القای لیپوتوکسیسیتی در چندین نوع سلول از جمله سلول‌های عضلانی قلب و هیپاتوسیت‌ها می‌شود، در حالی که اسید اولئیک می‌تواند از بروز لیپوتوکسیسیتی در هیپاتوسیت‌های موش جلوگیری کند. دلیل این امر احتمالاً اسیدهای چرب غیر اشباع است که قادرند با لیپوتوکسیسیتی سلولی ناشی از اسیدهای چرب اشباع مقابله کنند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر ترکیب اسید لینولنیک + اسید لینولئیک بر شاخصه‌های لیپوتوکسیسیتی القایی توسط اسید پالمیتیک در سلول‌های عضلات قلب موش بالغ بود.

**روش کار:** در این مطالعه، ابتدا سلول‌های بطنی قلب موش صحرایی بالغ جدا و در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت شدند. سلول‌ها به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسید لینولنیک (۰/۵mM) + اسید لینولئیک (۰/۲۵mM) و ترکیب اسید لینولنیک + اسید لینولئیک با اسید پالمیتیک (۰/۵mM + ۰/۲۵mM + ۰/۵mM) تحت بررسی قرار گرفتند. میزان تری گلیسیرید سلولی، دی گلیسیرید سلولی، تکه تکه شدن DNA و درصد زنده ماندن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ ساعت پس از تجویز اسیدهای چرب اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند افزودن اسید لینولنیک + اسید لینولئیک به اسید پالمیتیک باعث کاهش میزان تکه تکه شدن DNA و محتوای دی گلیسیرید سلولی، افزایش میزان تری گلیسیرید سلولی و زنده ماندن سلولی در مقایسه با مصرف اسید پالمیتیک به تنهایی شد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** در مجموع ترکیب اسید چرب اسید لینولنیک + اسید لینولئیک می‌تواند شاخصه‌های لیپوتوکسیسیتی حاصل از اسید پالمیتیک را در کشت اولیه عضلات قلبی موش بالغ بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: اسید لینولنیک، اسید لینولئیک، لیپوتوکسیسیتی، اسید پالمیتیک

Pars J Med Sci 2018;16(3):33-43

## مقدمه:

ناقص یا هردو، تغییر مسیر سیگنال‌های کلیدی و مرگ سلولی شود [۱ و ۲].

از انواع اسیدهای چرب اشباع می‌توان به اسید پالمیتیک ۱۶ کربنی اشاره کرد که در چربی‌های حیوانی، روغن نارگیل و خرما به میزان زیاد وجود دارند [۳]، اما اسید لینولئیک، اسید چرب غیر

لیپوتوکسیسیتی از دیدگاه غلظت چربی داخل سلولی است که از طریق سازوکارهای مختلف موجب بروز اثرات مخرب در سلول می‌شود. مطالعات متعدد حاکی از آن است که لیپوتوکسیسیتی در میوسیت‌ها می‌تواند باعث اختلالات سلولی، انقباض و انبساط

\* نویسنده مسئول، نشانی: بخش فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۴۴۹۱۱۳۹۱ - شماره: ۰۴۴-۳۲۷۷۱۹۲۶ پست الکترونیک: e.zadehashem@urmia.ac.ir

اصلاح: ۹۷/۱۰/۱ پذیرش: ۹۷/۱۰/۵

دریافت: ۹۷/۸/۳۰

قلبی عروقی ناشی از لیپوتوکسیسیتی در جامعه از سوی دیگر، مطالعه حاضر با هدف بررسی سازوکارهای خنثی شدن لیپوتوکسیسیتی پالمیتات در تجویز هم زمان با اسیدهای چرب لینولئیک و لینولنیک انجام شد.

## روش کار:

### حیوانات

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی روی تعداد ۱۵ موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم بود. موش‌ها در دمای حدود ۲۲ درجه سانتیگراد و با در نظر گرفتن دوره زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی از ساعت ۸ صبح نگهداری شدند. آب در دسترس حیوان به صورت روزانه با آب تازه جایگزین می‌شد. غذا (خوراک آماده موش کارخانه دام پارس-تهران) به صورت نامحدود در دسترس حیوانات قرار داشت. بررسی‌های بالینی به منظور یافتن علائم عمومی آسیب‌شناسی به طور متناوب انجام شد.

### طراحی مطالعه و گروه بندی

در هر آزمایش سه موش صحرایی و در کل برای پنج آزمایش ۱۵ موش استفاده شد. بعد از جداسازی سلول‌ها از بطن قلب هر موش بالغ به روش تشریح شده در ادامه مقاله، در هر چاهک از پلیت‌های ۲۴ خانه تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول و جمعاً ۲۴۰۰۰۰۰ سلول کشت شد. سپس اسیدهای چرب در گروه‌های مورد مطالعه به چاهک‌ها تجویز شدند. هر آزمایش سه بار با سه موش تکرار شد.

### جداسازی و کشت سلول‌های بطنی قلب موش صحرایی بالغ:

سلول‌های قلبی موش بالغ به روش پیپر و ولز جداسازی و کشت شدند [۱۵]. برای این کار، قبل از بی‌هوشی به هر موش ۵۰۰ واحد بین‌المللی هپارین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. به منظور دسترسی به قفسه سینه حیوان بعد از شکافتن پوست، استخوان جناغ از خط وسط بریده شد. قفسه صدری موش‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و قلب به همراه قسمتی از ریه برداشته و در پتری دیش حاوی سرم فیزیولوژی سرد شده با یخ غوطه‌ور شد. سپس قلب از طریق سرخرگ آئورت به سیستم پرفیوژن که از پیش آماده شده بود متصل شد. در ادامه، مقادیر ۰/۱۵ گرم تریپسین و ۰/۰۶ گرم EDTA به بافر پرفیوژن اضافه شد و پرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. لازم به ذکر است که تمامی بافرها با ترکیب ۹۵٪ O<sub>2</sub> و ۵٪ CO<sub>2</sub> مورد استفاده قرار گرفتند و در این مرحله بطن‌ها از دهلیزها جدا و به صورت سوسپانسیون سلولی به قطر ۰/۷ میلی‌متر با قیچی بریده شدند. سوسپانسیون سلولی تهیه شده از الک ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و به مدت شش دقیقه در ۲۵ سانتیگراد فیلتر سلولی

اشباع متعلق به خانواده n-6 است که در خانواده اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) قرار می‌گیرد. بیشترین مقدار اسیدهای چرب PUFA از نوع n-6 در روغن آفتابگردان وجود دارند. از دیگر منابع این اسید چرب می‌توان به تخم مرغ، گوشت و غلات اشاره کرد [۴]. همچنین اسید چرب لینولنیک یکی دیگر از اسید چرب غیراشباع (۱۸ کربنی با سه پیوند دوگانه) است. این اسید چرب ضروری از خانواده n-3 در بذر کتان، بذرک و روغن ماهی به مقدار فراوان وجود دارد [۳ و ۵].

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتات به علت این که باعث القای استرس اکسیداتیو، صدمه به میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی و همچنین القا آپوپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) می‌شوند، در همه کشت‌های سلولی سمی‌اند [۶]. اگرچه فرایند لیپوتوکسیسیتی در سلول‌های میوسیت قلبی [۷ و ۸] در مقایسه با سلول‌های غیر میوسیت [۹] تا حدودی متفاوت است، ولی استفاده از اسید چرب لینولئیک (n-6) هم زمان با اسید پالمیتیک در جلوگیری از آپوپتوز ناشی از این اسید در سلول‌های فیبروبلاست انسان موثر است [۱۰]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر افزودن اسید لینولئیک با دوز ۱۵۰ یا ۲۵۰ میکرومولار به همراه ۲۵۰ میکرومولار اسید استئاریک توانسته سبب کاهش معنادار مرگ سلولی و القاء پروتئین‌های استرس اکسیداتیو توسط اسید استئاریک در در سلول‌های کبدی موش شود [۱۱].

به نظر می‌رسد که تجمع اسید پالمیتیک به تنهایی یا دیگر سیگنال‌های میانجی حاصل از متابولیت‌های آن مانند دی‌گلیسیرید می‌تواند مسئول القاء آپوپتوز ناشی از اسید پالمیتیک در سلول عضلانی قلبی باشند [۱۲]. با احتمال زیاد یکی از سازوکارهای مهارکننده اثرات نامطلوب اسید پالمیتیک توسط اسیدهای چرب غیراشباع، کاهش تجمع اسید پالمیتیک به صورت دی‌گلیسیرید و تشویق سنتز تری‌گلیسیرید است [۱۳].

علاوه بر سازوکار احتمالی فوق به نظر می‌رسد در راستای رهیافت‌های درمان لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسیدهای چرب اشباع به وسیله اسیدهای چرب غیر اشباع، کاهش میزان تکه تکه شدن DNA ناشی از پالمیتات و افزایش درصد زنده مانی سلول‌های عضلات قلب در مواجهه با اسیدهای چرب اشباع نیز از دیگر سازوکارهای محتمل باشند. در این خصوص نشان داده شده است که اضافه کردن توام اسید اولئیک با اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از القاء آپوپتوز ناشی از پالمیتات در سلول‌های قلبی موش‌های نوزاد می‌شود [۱۴].

نظر به اهمیت بالینی بهبود شاخصه‌های لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسیدهای چرب اشباع در تجویز توام با اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول‌های قلبی از یک سو و افزایش بیماری‌های

شد. بعد از آن، محلول صابونی‌کننده اضافه و پس از مخلوط شدن 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 ۶۵° درجه سیلیسوس قرار داده شد و جذب نوری آن‌ها در ۴۱۰ نانومتر در مقابل لوله شاهد قرائت شد. مقدار تری گلیسرید با استفاده از منحنی استاندارد و اعمال ضریب رقت محاسبه شد.

#### اندازه گیری دی گلیسرید سلولی:

دی گلیسرید سلولی طبق روش پیشنهادی بالدانزی و همکاران اندازه گیری شد [۱۸]. برای این کار، پلیت‌های سیلیکاژل (TLC Silicagel 60 F254, Merck) با استفاده از متانول فعال شدند. به ۵۰ میکرولیتر از لیپید استخراج شده، ۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و روی پلیت‌های سیلیکاژل به همراه استاندارد دی گلیسرید لکه گذاری شد. پلیت در تانک حاوی دی اتیل اتر/هپتان/اسید استیک (v:v:v) (۷۵:۲۵:۱) قرار داده شد. پلیت بعد از اتمام حرکت حلال خشک و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کوماسی ۰/۰۳٪ تهیه شده در NaCl (۱۰۰ mM) و متانول ۳۰٪ رنگ شد. با استفاده از نرم افزار Power Scan 2012 باندهای تشکیل شده در مقابل باند استاندارد کمی شدند.

#### اندازه گیری پروتئین تام:

پروتئین سلولی به روش پیشنهادی برادفورد اندازه گیری شد [۱۹]. در این روش با استفاده از معرف برادفورد و استانداردهای تهیه شده از BSA، میزان پروتئین سلولی در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

#### ارزیابی تکه تکه شدن DNA سلولی:

تکه تکه شدن DNA سلولی طبق روش پیشنهادی ساندوا ارزیابی شد [۲۰]. در این روش، سلول‌های هر چاهک به میکروتیوب مجزا منتقل و با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لایسیس شسته و سپس به سلول‌های موجود در میکروتیوب مربوط اضافه شده و در دمای ۴ درجه سیلیسوس قرار داده شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۷۰۰۰ با دمای ۴ درجه سیلیسوس سانتریفیوژ شدند. مایع رویی (s)، از پلیت (p) جدا، در میکروتیوب دیگری ریخته، به هر دو تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه و در دمای ۴ درجه سیلیسوس 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 ۹۰ درجه سیلیسوس قرار گرفت. در نهایت، DPA reagent به آن‌ها اضافه و ۲۴-۱۲ ساعت بعد، OD مربوط به s و p در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

$$\text{DNA Fragmentation \%} = \left( \frac{\text{OD s}}{\text{OD p} + \text{OD s}} \right) \times 100$$

حاوی سلول‌های به هم چسبیده به ترتیب در محلول ۰/۲٪، ۰/۴٪ و ۱٪ کلرید کلسیم مجدداً معلق و مانند مرحله قبل سانتریفیوژ شدند. روی پلیت سلولی حاصل، محیط حاوی آلبومین سرم گاوی اضافه شد و محلول به مدت سه دقیقه در ۱۵ سانتیفریوژ شد. سپس محیط کشت M۱۹۹ به همراه تورین، کراتین، کارنیتین و ۴٪ FCS (Fetal Calf Serum) به پلیت سلولی مرحله قبل اضافه شد.

#### شمارش سلول‌ها و افزودن اسیدهای چرب:

سلول‌ها در زیر میکروسکوپ شمارش شدند و به تعداد مورد نظر (حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول) با محیط کشت M۱۹۹ به همراه تورین، کراتین، کارنیتین و ۴٪ FCS به پلیت‌های ۲۴ خانه انتقال داده و به مدت پنج ساعت انکوبه شدند. پلیت‌های ۲۴ خانه با بافر شستشوی حاوی کلسیم و منیزیم شستشو داده شدند. در نهایت، اسیدهای چرب مورد نظر اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسید لینولنیک (۰/۵mM) + اسیدلینولئیک (۰/۲۵mM) و ترکیب اسید لینولئیک + اسیدلینولئیک + اسید پالمیتیک (۰/۵mM + ۰/۲۵mM + ۰/۵mM) به عنوان گروه‌های درمانی و ۰/۵mM از BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان گروه کنترل به محیط کشت سلول‌ها اضافه شدند. تمام اسیدهای چرب مورد استفاده به صورت کونژوگه با BSA استفاده شدند. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (حاوی ۹۵٪ O<sub>2</sub> و ۵٪ CO<sub>2</sub>) با دمای ۳۷ درجه سیلیسوس) کشت داده شدند و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ ساعت بعد از تجویز اسیدهای چرب، نمونه‌گیری از پلیت‌ها به منظور ارزیابی فاکتورهای به شرح زیر به عمل آمد.

#### استخراج لیپید سلولی:

لیپید سلولی طبق روش پیشنهادی بلیق و دایر استخراج شد [۱۶]. در این روش، سلول‌های هر چاهک پس از این که در حضور متانول و اسید استیک خراشیده می‌شوند داخل لوله آزمایش ریخته و با کلروفرم/متانول مخلوط می‌شوند. سپس به ترتیب کلروفرم و بعد ۲ mL محلول کلرید سدیم به سلول‌ها اضافه و سانتریفیوژ شدند. فاز پایینی جمع‌آوری و در لوله مجزایی قرار داده شد. به فاز بالایی، کلروفرم اضافه شد و مشابه مرحله قبل سانتریفیوژ شدند. فاز پایینی بار دیگر جمع‌آوری و به لوله‌های حاوی این فاز اضافه شد. محتوای لوله‌ها هوادهی شدند و mL ۰/۵ کلروفرم/متانول به هر یک اضافه شد. نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر در ۲۰- درجه سیلیسوس نگهداری شدند.

#### اندازه گیری تری گلیسرید سلولی:

تری گلیسرید سلولی به روش پیشنهادی نری و فرینگز اندازه‌گیری شد [۱۷]. برای این کار به ۵۰ میکرولیتر از لیپید استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و به مدت یک دقیقه مخلوط

## ارزیابی زنده مانی سلول با روش رنگ آمیزی تریپان بلو:

زنده مانی سلولی به روش پیشنهادی پیناتا و لهر ارزیابی شد [۲۱]. در این روش به هر چاهک تریپسین - EDTA ۰/۲۵٪ اضافه شد و سپس پلیت به مدت ۵-۴ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. در ادامه، به هر چاهک محیط کشت مقدار ۱۰٪ FBS اضافه و بعد از رقیق سازی، مقدار یک میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به یک میکروتیوب جهت اضافه کردن ۱۲۵۰ میکرولیتر تریپان بلو ۰/۴٪ و ۷۵۰ میکرولیتر PBS انتقال داده شد. میکروتیوب ها کاملاً مخلوط شده و ۱۰-۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به لام هموسیترومتر برای تعیین درصد زنده مانی سلول ها منتقل شد. در زیر میکروسکوپ تعداد سلول های زنده و مرده جداگانه در چهار مربع گوشه ای شمرده و درصد سلول های زنده محاسبه شد. تحلیل آماری داده های جمع آوری شده با نرم افزار Sigma Stat software 3.5 انجام شد. برای مقایسه بین گروه های مختلف آزمایش و گروه کنترل در یک ساعت مشخص از آزمون آماری تحلیل واریانس یک سویه و برای مقایسه میانگین یک گروه در ساعات ۲۴ و ۴۸ بعد از تجویز اسیدهای چرب از آزمون آماری تی استفاده شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## یافته ها:

### میزان تری گلیسرید سلولی در گروه های مورد آزمایش

میزان تری گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در گروه اسید پالمیتیک به طور معناداری کمتر از گروه های دیگر بود ( $P < 0/05$ )، در حالی که در زمان های فوق میزان تری گلیسرید در گروه اسیدلینولئیک + اسید لینولئیک به مراتب بیشتر از گروه کنترل و گروه اسید پالمیتیک بود ( $P < 0/05$ ). البته این افزایش در زمان ۲۴ ساعت در مقایسه میان گروه کنترل و گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک معنادار نبود ( $P > 0/05$ ). میزان تری گلیسرید در گروه ترکیبی (اسید لینولئیک + اسید لینولئیک + اسید پالمیتیک) نیز در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). همچنین میزان تری گلیسرید سلولی در همه گروه ها، در زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه مشابه در زمان ۲۴ ساعت افزایش قابل توجهی داشت ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۱).

### میزان دی گلیسرید سلولی در گروه های مورد آزمایش

دی گلیسرید سلولی در گروه های درمانی با اسیدلینولئیک + اسید لینولئیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش داشت که این افزایش از نظر

آماري معنادار بود ( $P < 0/05$ ). میزان دی گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ ساعت در گروه کنترل کمتر از گروه های دیگر بود، ولی اختلاف مذکور بین گروه کنترل و گروه های اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک + اسید لینولئیک و گروه ترکیبی بارز نبود ( $P > 0/05$ ). همچنین میزان دی گلیسرید در گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ ساعت بیشتر از گروه های دیگر بود، اما با گروه ترکیبی اختلاف معناداری نداشت ( $P > 0/05$ ). میزان دی گلیسرید گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بین مقادیر مربوط به گروه کنترل و گروه ترکیبی قرار داشت، اما به غیر از زمان ۲۴ ساعت با گروه کنترل ( $P < 0/05$ ) با هیچ کدام یک از گروه های مذکور در این زمان ها اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (نمودار ۲).

### درصد تکه تکه شدن DNA در گروه های مورد آزمایش

درصد تکه تکه شدن DNA در گروه های کنترل، درمانی با اسید لینولئیک + اسید لینولئیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با به زمان ۲۴ ساعت افزایش معناداری داشت ( $P < 0/05$ ). اختلاف معناداری در درصد تکه تکه شدن DNA بین گروه اسید پالمیتیک با سایر گروه ها هم در زمان ۲۴ ساعت و هم در زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در هر دو زمان، در گروه اسید پالمیتیک درصد تکه تکه شدن DNA در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ )، در حالی که با اضافه کردن اسید لینولئیک + اسید لینولئیک به اسید پالمیتیک (گروه ترکیبی)، این درصد در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک به طور معناداری کاهش داشت ( $P < 0/001$ ). در زمان ۲۴ ساعت، اختلافی در درصد تکه تکه شدن DNA بین گروه کنترل و گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک مشاهده نشد ( $P > 0/05$ )، در حالی که اختلاف معناداری در این درصد بین گروه های کنترل و گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک در زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۳).

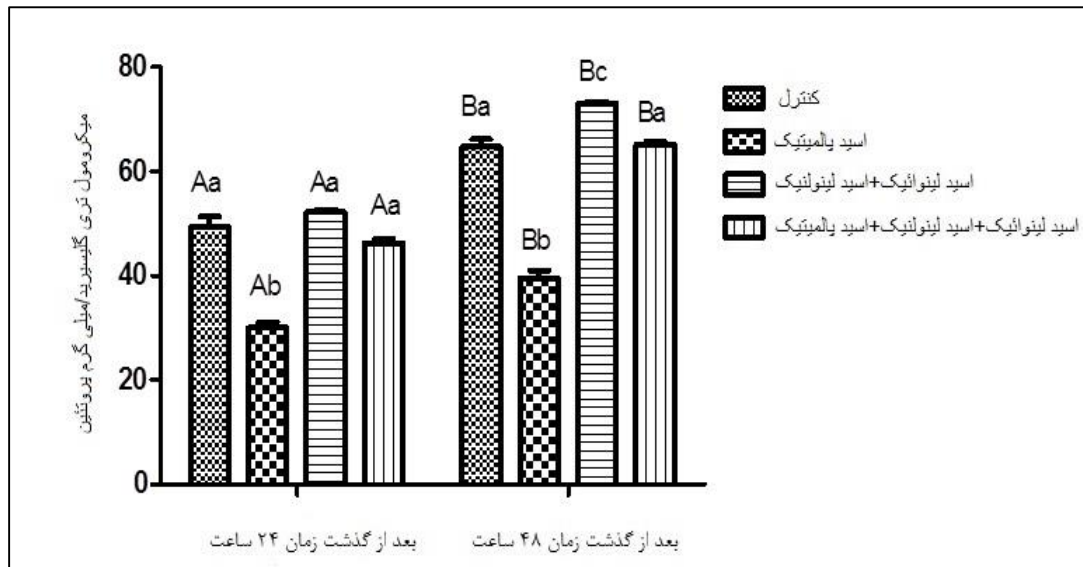
### درصد زنده مانی سلولی در گروه های مورد آزمایش

درصد زنده مانی سلولی، در گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سه گروه دیگر دارای کمترین مقدار بود. در زمان های مذکور، درصد زنده مانی سلول ها به صورت مشخص در گروه ترکیبی بیشتر از گروه اسید پالمیتیک ( $P < 0/001$ )، در گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک بیشتر از گروه ترکیبی و در گروه کنترل بیشتر از گروه اسید لینولئیک + اسید لینولئیک بود. این درصد در گروه های درمانی با اسید لینولئیک + اسید لینولئیک، اسید پالمیتیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت نیز کاهش داشت، اما کاهش در گروه کنترل و ترکیبی معنادار نبود ( $P > 0/05$ ) (نمودار ۴).

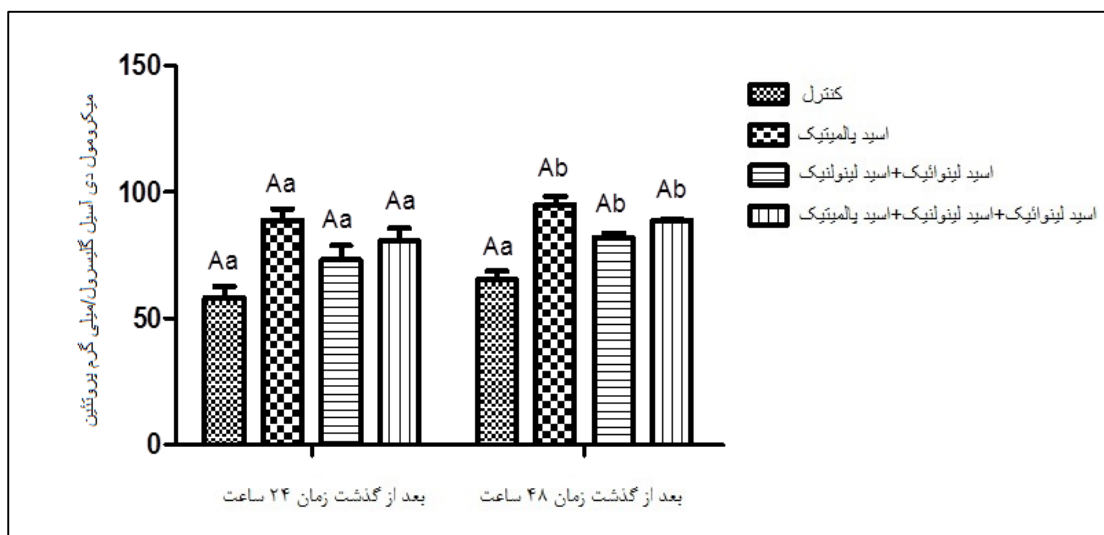
## میزان پروتئین تام در گروه‌های مورد آزمایش

میزان پروتئین در سلول‌های عضلانی قلب موش بالغ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در گروه‌های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، ترکیب اسید لینولنیک و لینولئیک و ترکیب اسید لینولنیک و لینولئیک + اسید پالمیتیک به شرح جدول ۱ می باشد.

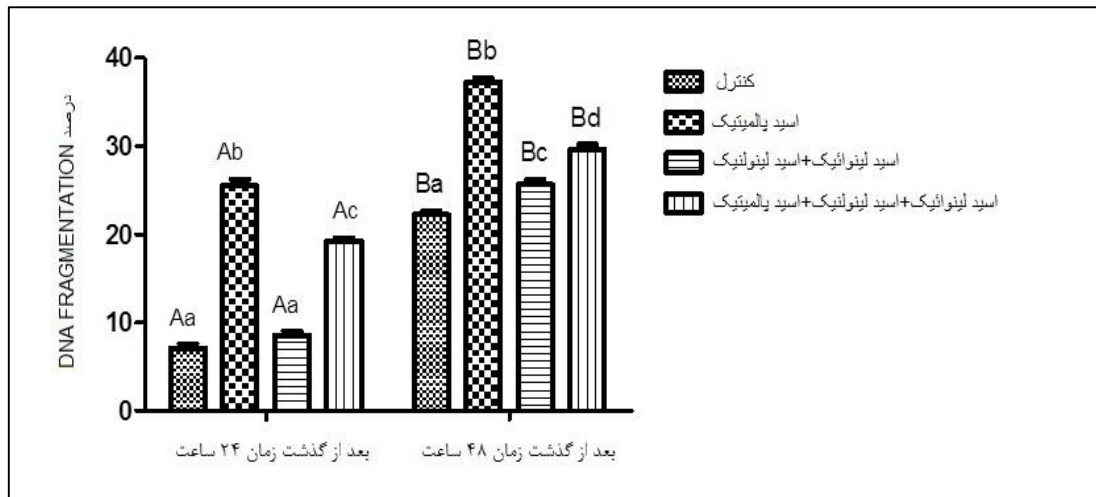
اندازه‌گیری میزان پروتئین تام در گروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و اسید لینولئیک + اسید پالمیتیک در زمان ۴۸ ساعت. مقادیر به صورت  $Mean \pm SE$  نمایش داده شده است (جدول ۱).



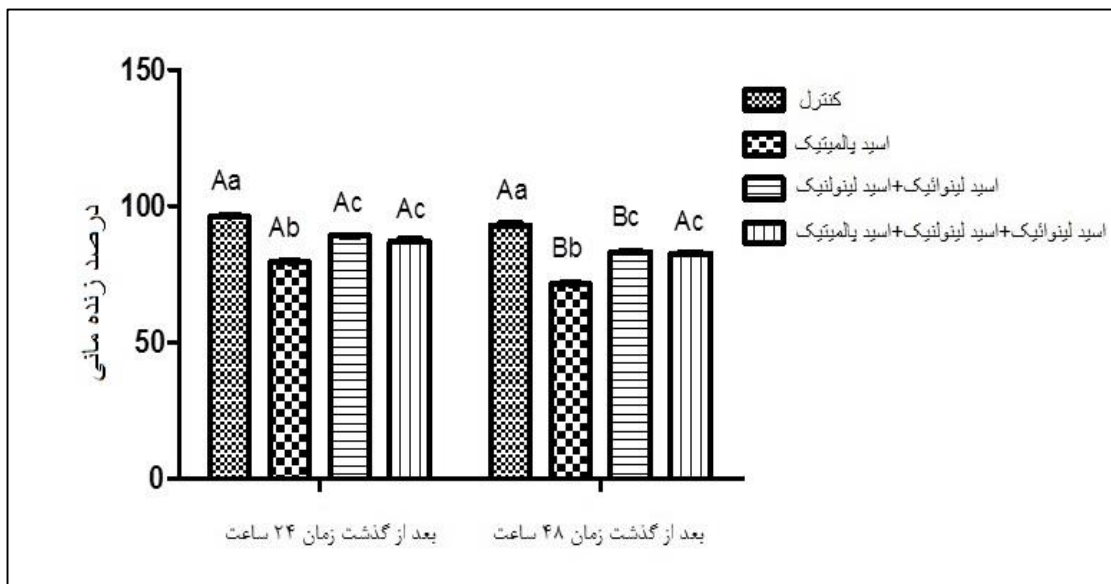
نمودار ۱: میزان تری گلیسرید سلولی / میلی گرم پروتئین در سه گروه درمانی و گروه کنترل پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۲: میزان دی آسید گلیسرول / میلی گرم پروتئین در سه گروه آزمایش و گروه کنترل پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون



نمودار ۳: درصد تکه تکه شدن DNA در سه گروه آزمایش و گروه کنترل پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون



نمودار ۴: درصد زنده مانده در سه گروه آزمایش و گروه کنترل پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون

جدول ۱: اندازه گیری میزان پروتئین تام در گروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و اسید لینولئیک + اسید پالمیتیک در زمان ۴۸ ساعت

میزان پروتئین تام (میکروگرم/میلی لیتر)	گروه ها
۲,۲۷ ± ۰,۲۷	کنترل
۲,۷۲ ± ۰,۰۶	اسید پالمیتیک
۲,۵۷ ± ۰,۱۸	اسید لینولئیک + لینولئیک
۲,۴۷ ± ۰,۱۵	اسید لینولئیک + لینولئیک + اسید پالمیتیک

**بحث و نتیجه‌گیری:**

نتایج حاصل از مطالعه حاضر حاکی از آن است که تجویز هم زمان دو اسید چرب لینولنیک و لینولئیک در کشت سلول‌های عضلانی قلب موش بالغ می‌تواند سبب کاهش محتوای دی‌گلیسیرید سلولی، افزایش میزان تری‌گلیسیرید سلولی، کاهش میزان تکه تکه شدن DNA و جلوگیری از مرگ سلول‌ها در اثر لیپوتوکسیسیتی القایی توسط اسید پالمیتیک شود. از این رو به نظر می‌رسد تجویز هم زمان اسید لینولنیک + اسید لینولئیک با اسید پالمیتیک می‌تواند باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک روی سلول‌های مذکور شود.

در مطالعات گذشته نویسندگان این مقاله اثرات سمی ناشی از اسید چرب پالمیتیک در این نوع سلول‌ها به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در مطالعه مشابه نشان داده شد که تجویز اسید پالمیتیک در کشت سلول‌های عضلانی قلب موش می‌تواند سبب بهبود عوارض ناشی از استرس اکسیداتیو، لیپوتوکسیسیتی و سمیت ناشی از تجویز اسید پالمیتیک در این سلول‌ها شود [۲۲، ۲۳]. به علاوه، در مطالعات منتشر نشده این گروه اثرات مشابهی از تجویز دو اسید چرب لینولئیک و لینولنیک به تنهایی در بهبود سمیت ناشی از اسید پالمیتیک نیز مشاهده شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر تأثیر هم زمان تجویز دو اسید چرب مذکور به همراه اسید پالمیتیک بر شاخص‌های سمیت سلولی گزارش نشده است. از این رو مطالعه حاضر اولین گروه از مشاهدات و یافته‌ها را ارائه می‌دهد.

در ارتباط با سازوکار کاهش سمیت سلولی القا شده توسط اسید پالمیتیک با استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع می‌توان به اثرات محافظتی این اسیدهای چرب در جلوگیری از ایجاد لیپوتوکسیسیتی به دلیل تبدیل پالمیتات به تری‌گلیسیرید و فعال کردن مسیرهای مرتبط با زنده ماندن سلولی اشاره کرد [۲۲] به عنوان نمونه، مطالعه انجام شده توسط دی‌ویریز و همکاران در سال ۱۹۹۷ در زمینه بررسی زنده ماندن و میزان ذخیره تری‌گلیسیرید نشان داد سلول‌های بطنی قلب موش صحرایی در حضور مقدار ۰/۵ mm اسید اولئیک، سالم مانده و مقادیر کافی از تری‌گلیسیرید را در سیتوزول خود ذخیره کرده است [۲۵]. در مطالعه حاضر میزان تری‌گلیسیرید سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون برای ارزیابی این که آیا ترکیب اسید لینولنیک + اسید لینولئیک، همانند اسید اولئیک در تجویز توأم با اسید پالمیتیک می‌تواند باعث افزایش تشکیل تری‌گلیسیرید در سلول‌های مذکور شود یا نه، اندازه‌گیری شد. به طوری که اضافه شدن هم زمان اسید لینولنیک + اسید لینولئیک با اسید پالمیتیک به محیط کشت سلولی باعث افزایش میزان تری‌گلیسیرید سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت شد. از این رو، در این شرایط نیز

احتمالاً اسیدهای چرب غیر اشباع با سازوکار مشابه اسید اولئیک سبب بهبود اثرات سمی اسید پالمیتیک می‌شوند. همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام شد، تجویز  $\alpha$ -Linolenic Acid در سلول‌های قلب موش سبب افزایش میزان ذخیره تری‌گلیسیرید و کاهش عوارض لیپوتوکسیسیتی در این سلول‌ها شده است [۲۶]. در توضیح این سازوکار می‌توان گفت، اولین مرحله در غیر سمی کردن این اسید چرب، استریفیکاسیون آن به تری‌گلیسیرید بوده تا این چربی خنثی بتواند به راحتی و بدون ایجاد خطر زیاد در سلول ذخیره شود. مرحله القاء اکسیداسیون اسید چرب در میتوکندری به واسطه تحرکات ناشی از MUFA است [۲۷]. همچنین به نظر می‌رسد به دنبال تیمار سلول با اسیدهای چرب اشباع، یک یا چندین مرحله از مراحل تولید تری‌گلیسیرید در شبکه آندوپلاسمی دچار نقص می‌شود، درحالی که در تیمار با اسیدهای چرب دارای پیوند غیر اشباع چنین نقصی دیده نمی‌شود. البته مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که درجه اشباع اسیدهای چربی که در فرایند ساخت تری‌گلیسیرید نقش دارند، مانند اسید فسفاتیدیک و دی‌آسیل‌گلیسرول که می‌توانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این ترکیبات را تحت تأثیر قرار داده، واکنش‌های آن‌ها را با پروتئین‌های مربوط دستخوش تغییر کرده و بدین ترتیب زمینه بهبود سمیت ناشی از اسیدهای چرب اشباع را فراهم کنند [۲۸، ۲۹، ۳۰]. در واقع زمانی که درجه اشباع دی‌گلیسیرید افزایش پیدا می‌کند، توانایی واکنش آن با پروتئین‌کیناز نوع C، به دلیل ایجاد تغییر فیزیکی و شیمیایی دی‌گلیسیرید از حالت کریستال مایع به حالت ژله‌ای کاهش می‌یابد که در این حالت واکنش‌پذیری این ترکیب با واسطه‌های لازم برای تبدیل به تری‌گلیسیرید نیز کاهش خواهد یافت [۲۸، ۲۹، ۳۰]. به نظر می‌رسد تجویز اسیدهای چرب غیر اشباع بار دیگر می‌تواند حالت کریستال مایع را در ترکیب دی‌آسیل‌گلیسرول ایجاد کرده و توانایی واکنش‌پذیری این ترکیب با پروتئین‌های لازم جهت تبدیل مجدد آن به تری‌گلیسیرید را فراهم سازد [۳۲].

در مطالعه منتشر نشده نویسندگان نشان داده شده است که اسید لینولنیک و اسید لینولئیک قادرند اثرات سمی اسید پالمیتیک را با سازوکار مشابه با سازوکار فوق کاهش داده و لیپوتوکسیسیتی ناشی از دی‌گلیسیرید به واسطه اسید پالمیتیک را بهبود بخشند. تکه تکه شدن DNA ژنومیک به خصوص در مناطق نوکلئوزوم از علائم آپوپتوزیس است [۳۳]. در واقع این تکه تکه شدن موجب ایجاد الگوی DNA Fragmentation خواهد شد. در مطالعه حاضر به دنبال تجویز اسید پالمیتیک در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، افزایش معناداری در تکه تکه شدن DNA در مقایسه با گروه

داد تجویز هم زمان آلفا لینولنیک اسید با سازوکار کاهش استرس ناشی از پالمیتات روی شبکه اندوپلاسمی می تواند لیپوتوکسیسیتی ناشی از استئاریک اسید را نیز بهبود بخشد [۴۲]. در مجموع به نظر می رسد که تجمع پالمیتات به تنهایی یا دیگر سیگنالهای میانجی مانند دی گلیسیرید ممکن است مسئول القاء آپوپتوز ناشی از پالمیتات در سلول عضلانی قلبی باشند [۱۲].

هرچند در مطالعات در حال چاپ نویسندگان اثرات این دو اسید چرب با سازوکار افزایش میزان تری گلیسیرید سلولی، کاهش محتوای دی گلیسیرید سلولی و کاهش میزان تکه تکه شدن DNA در بهبود زنده مانی سلول های عضلانی قلب موش بالغ در مواجهه با اسید پالمیتیک به خوبی نشان داده شده است، ولی گزارشی از اثر ترکیب ایندو اسید چرب، اسید لینولنیک + اسید لینولئیک بر روی زنده مانی سلول های قلبی موش صحرایی بالغ یافت نشده است تا بتوان با نتایج مطالعه حاضر مقایسه کرد. البته مطالعات دیگری اثرات مفید اسید چرب اولئیک و اسید لینولئیک را در جلوگیری از مرگ سلولی در تجویز توأم با اسید پالمیتیک گزارش کرده اند [۲۵، ۴۱، ۴۳]. همچنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۶ توسط کریوز و همکاران انجام شد، اثرات تجویز لینولئیک اسید بر بهبود لیپوتوکسیسیتی در سلول های عضلانی قلب موش بخوبی نشان داده شده است [۴۴]. در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده است که ترکیبات آلفا لینولئیک اسید قادرند دیس لیپیدی ناشی از اسیدهای چرب اشباع را در سلول های قلبی کنترل کرده و عوارض ناشی از آن را بهبود بخشند. در این رابطه مطالعه دیگری نیز اثرات بهبود بخش این اسید چرب بر لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک در سلول های قلبی به خوبی نشان داده شده است [۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۸].

نتایج مطالعه اخیر نشان داد که تجویز ترکیب اسید لینولنیک + اسید لینولئیک به همراه اسید پالمیتیک می تواند منجر به کاهش محتوای دی گلیسیرید سلولی، افزایش میزان تری گلیسیرید سلولی، کاهش میزان تکه تکه شدن DNA و همچنین ممانعت از مرگ سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک شود. در نتیجه، تجویز هم زمان اسید پالمیتولئیک با این دو اسید چرب باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک روی سلول های مذکور شد.

### تشکر و قدردانی:

از ریاست محترم دانشگاه ارومیه و دانشگاه تهران به خاطر حمایت مالی از این پروژه تشکر به عمل می آید.

### تعارض منافع:

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

کنترل مشاهده شده است که هم راستا با مطالعات دی وریز و همکاران در سال ۱۹۹۷ است. در این مطالعه نشان داده شد که تیمار ۱۶ ساعته سلول های قلبی موش صحرایی نوزاد با ۰/۲۵ mM یا ۰/۵ mM پالمیتات توانسته موجب القاء معنادار تکه تکه شدن DNA در مقایسه با گروه کنترل شود [۲۳]، اما در مطالعه حاضر زمانی که مخلوط اسید لینولنیک و اسید لینولئیک هم زمان با اسید پالمیتیک به محیط کشت سلولی اضافه شد، میزان مذکور به خاطر اثر پالمیتیک اسید در زمان های ۲۴، ۴۸ ساعت کاهش یافت. از این رو، به نظر میرسد تجویز توأم این دو اسید چرب غیر اشباع در زنده مانی سلول ها در حالت سمیت سلولی ناشی از اسید پالمیتیک نقش به سزائی داشته باشد. در مطالعه حاضر درصد زنده مانی سلول های عضلات قلب در گروه اسید پالمیتیک به طور معناداری کمتر از گروه های کنترل و اسید لینولنیک + اسید لینولئیک در طول دوره کشت سلولی بود. به تازگی مشخص شده است که آپوپتوز سلول های قلبی نقش مهم و مرکزی در ایجاد و پیشرفت نارسایی قلبی دارد [۳۴]. البته سازوکار ایجاد مرگ سلولی در زمان تجویز اسید پالمیتیک به طور کامل مشخص نشده است. بر اساس یک نظریه موجود، بعد از اضافه کردن اسید پالمیتیک، میزان سنتز سرامید افزایش پیدا کرده [۳۵] و این مولکول سبب القاء آپوپتوز می شود [۳۶]. بنابراین، به نظر می رسد افزایش میزان سرامید ناشی از حضور اسید پالمیتیک در سلول، زمینه ساز آپوپتوز و مرگ سلولی می شود [۳۷، ۳۸]. بر اساس نظریه دیگری، متابولیسم ناقص پالمیتات در سلول نیز می تواند سبب ساخت ترکیبات سمی و در نهایت مرگ سلولی شود [۳۹].

به نظر می رسد سازوکارهایی مستقل از مسیر سنتز سرامید نیز در ارتباط با آپوپتوز ناشی از پالمیتات در سلول ها وجود دارند. مطالعات روی سلول های تخمدان همستر چینی، افزایش (ROS) Reactive Oxygene Species را به عنوان یکی از سازوکارهای مرتبط با مرگ سلولی و در نتیجه لیپوتوکسیسیتی بیان می کنند [۴۰]. این مشاهدات در سلول های مختلف نشان می دهند که احتمالاً لیپوتوکسیسیتی القایی توسط این اسید چرب در سلول های عضلات اسکلتی قلبی [۸، ۲۵] در مقایسه با سلول های غیر اسکلتی [۹] با سازوکار های متفاوتی سبب القای مرگ سلولی می شود. به عنوان نمونه، بر اساس نتایج حاصل از مطالعه کاتاسولیریز و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی فرایند بهبود لیپوتوکسیسیتی ناشی از پالمیتات در سلول های کلیه موش ها نشان داده شد که اسیدهای چرب غیر اشباع با کاهش استرس ناشی از پالمیتات روی شبکه اندوپلاسمی سبب کاهش وقوع آپوپتوز در سلول ها می شوند [۴۱]. همچنین مطالعه مشابهی که روی کشت سلول اولیه هپاتوسیت های موش انجام شده نشان



## References:

1. Kenchaiah S, Evans J, Levy D. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 305-13.
2. Jennifer L, Peura E, Jean S. Lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle. *Heart Metabolism* 2006; 30: 4-6.
3. 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.
4. Azain MJ. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J Anim Sci* 2004; 82: 916-24.
5. Nolan C J and Larter CZ. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 830-40.
6. Preedy M, Mantle O, Peters T. Oxidative damage in liver diseases. *J Int Fed Clin Chem* 1998; 10(1): 16-9.
7. De Vries JE, Vork MM, Roemen THM, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 1997; 38: 1384-94.
8. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes* 2001; 50(9):2105-13.
9. Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 110-16.
10. 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.
11. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L.  $\alpha$ -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011; 10:81.
12. Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 309-15.
13. Montell E, Turini M, Marotta M, et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: 229-37.
14. De Vries JE, Vork MM, Roemen THM, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 1997; 38: 1384-94.
15. Piper HM, Volz A. In *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research* (Piper, H. M., ed.). Springer-Verlag, Heidelberg. 1990; 158-77.
16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-7.
17. Neri BP, Frings C S. Improved method for determination of triglyceride in serum. *Clin Chem* 1973; 19: 1201-2.
18. 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.
19. 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; 7(72): 248-54.
20. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997; 52: 378-86.
21. Pienata 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.
22. Zadeh Hashem E, Koohi MK, Eslami M, Asadi F, Taleb Zadeh R., Khodadadi M, Hassani-Dizaj S. Ameliorative Role of Palmitoleic Acid on Palmitate Induced Lipotoxicity in the Rat Cardiomyocytes. *Iranian Journal of Toxicology* 2016; Vol 10, No 5.
23. Zadeh Hashem H, Khodadadi M, Asadi F, Koohi MK, Eslami M, Hasani-Dizaj S, Taleb Zadeh R. The Antioxidant Activity of Palmitoleic Acid on the Oxidative Stress Parameters of Palmitic Acid in Adult Rat Cardiomyocytes. 2016; *Ann Mil Health Sci Res* 14(3):e11467.
24. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the Heart. *Curr Hypertens Rep* 2005; 7: 412-7.
25. De Vries JE, Vork MM, Roemen THM, De Jong YF, Cleutjens JPM, 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: 1384-94.
26. Creus A, Ferreira MR, Oliva ME, Lombardo YB. Mechanisms Involved in the Improvement of Lipotoxicity and Impaired Lipid Metabolism by Dietary  $\alpha$ -Linolenic Acid Rich *Salvia hispanica* L (Salba) Seed in the Heart of Dyslipemic Insulin-Resistant Rats. *J Clin Med* 2016 Jan 28;5(2). pii: E18.
27. Nolan C J and Larter CZ. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 830-40.
28. Goldberg EM, Lester DS, Borchardt DB, Zidovetzki R. Effects of diacylglycerols and Ca<sup>2+</sup> on structure of phosphatidylcholine / phosphatidylserine bilayers. *Biophys J* 1994; 66: 382-93.
29. 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: 4537-43.
30. 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: 427-31.
31. 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.
32. Goldberg EM, Zidovetzki R. Effects of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys J* 1997; 73: 2603-14.

33. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
34. 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: 1131-41.
35. Merrill AH Jr, Jones DD. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044: 1-12.
36. Obeid LM, Hannun YA. Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J Cell Biol* 1995; 58: 191-8.
37. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 3324-9.
38. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 114-25.
39. Hendrickson SC, Louis JD, Lowe JE, Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997; 166: 85-9.
40. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 14890-5.
41. Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK.  $\alpha$ -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharmacol* 2009 Nov 25; 623(1-3).
42. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L.  $\alpha$ -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10:81.
43. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 830-44.
- Creus A, Ferreira MR, Oliva ME, Lombardo YB. Mechanisms Involved in the Improvement of Lipotoxicity and Impaired Lipid Metabolism by Dietary  $\alpha$ -Linolenic Acid Rich *Salvia hispanica* L (Salba) Seed in the Heart of Dyslipemic Insulin-Resistant Rats. *J Clin Med*. 2016 Jan 28;5(2). pii: E18. doi: 10.3390/jcm5020018.
45. Ullah R, Nadeem M, Khalique A, Imran M, Mehmood S, Javid A, Hussain J. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. *J Food Sci Technol*. 2016 Apr;53(4):1750-8. doi: 10.1007/s13197-015-1967-0. Epub 2015 Oct 1.
46. Waleed F.A. Marei, Jessie De Bie, Omnia Mohey-Elsaeed, Eline Wydooghe, Peter E.J. Bols, Jo L.M.R Leroy. Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus-oocyte complexes matured under lipotoxic conditions in vitro. *Biology of Reproduction*, Volume 96, Issue 6, 1 June 2017, Pages 1181-1196, <https://doi.org/10.1093/biolre/iox046>.
47. Elias Katsoulis E, Jon G. Mabley, Mohamed Samai, Irene C. Green, Prabal Chatterjee.  $\alpha$ -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology* 623 (2009) 107-112.
48. Stanley, W.C.; Dabkowski, E.R.; Ribeiro, R.F., Jr.; O'Connell, K.A. Dietary fat and heart failure: Moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ. Res.* 2012, 110, 764-776.

## Coadministration of linolenic and linoleic fatty acids decrease lipotoxicity in cardiomyocytes

Elham Zadeh Hashem<sup>1\*</sup>, Mina Khodadadi<sup>2</sup>, Lachin Mousavi<sup>2</sup>, Rezvan Sephrri Vafa<sup>1</sup>

Received: 2017.11.21

Revised: 2018.12.22

Accepted: 2017.12.26

1. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
2. Department of physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.16, No.3, Fall 2018

Pars J Med Sci 2018;16(3):33-43

### *Abstract:*

#### **Introduction:**

Deleterious effects of lipid accumulation in non-adipose tissues are known as lipotoxicity. The prevalence of cardiovascular diseases caused by lipotoxicity are dramatically increased worldwide. Based on available reports, palmitic acid induced lipotoxicity in several cell type like cardiomyocyte and hepatocytes while oleic acid could prevent the lipotoxicity in rat hepatocytes because Un-saturated fatty acids may possibly are able to counteract lipotoxicity induced by with saturated fatty acids. This study aimed to investigate the effects of combination of linoleic acid with linolenic acid on the indexes of lipotoxicity induced by palmitic acid in adult rat cardiomyocyte.

#### **Material and Method:**

Ventricular heart muscle cells were isolated and seeded into 24-well-plates. Cells were treated with palmitic (0.5 mM), linoleic acid (0.25 mM) + linolenic acid (0.5 mM), palmitic+ linoleic acid+linolenic acid (0.5 mM+0.25 mM+0.5 mM). Triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), DNA fragmentation and percent of viability were measured at 24, 48 hours after treatment.

#### **Results:**

Result showed that linoleic acid+linolenic acid decreased DAG and DNA fragmentation and increased TAG and cell viability when co-administrated with palmitic in comparison with palmitic alone ( $p < 0.05$ ).

#### **Conclusion:**

In conclusion, combination of linoleic+linolenic acid may improve the indexes of lipotoxicity indices of by palmitic acid in primary adult rat cardiomyocytes cell culture.

**Keywords:** linolenic acid, Linoleic acid, lipotoxicity, palmitic acid

\* Corresponding author Email: e.zadehashem@urmia.ac.ir