ارزیابی اثرات اسید اولئیک در پیشگیری از لیپو توکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک در سلول های قلبی کشت شده موش های صحرایی

الهام زاده هاشم[1*]، محمد کاظم کوهی[2]

۱) گروه فارماکو لوژی و توکسیکو لوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش:۹۵/۲/۴

چکیده

مقدمه: یافته های متعدد حکایت از آن دارد که تاثیر اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در بروز لیپو توکسیسیتی سلولی متفاوت از هم می باشند. برخی از اسید های چرب نظیر اسیداولئیک در جلوگیری از بروز لیپو توکسیسیتی در سلول های کبدی موش موثر بودند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر اسید اولئیک بر شاخصه های لیپو توکسیسیتی در سلول های کشت شده عضله قلبی موش می باشد.

مواد روش ها: سلول های بطنی قلب موش صحرایی در پلیت های ۲۴ خانه کشت و به صورت تصادفی در گروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک (۰/۵ mmol/L)، اسید اولئیک (۰/۵ mmol/L) و ترکیب اسید اولئیک با اسید پالمیتیک (۰/۵ mmol/L + ۰/۵ mmol/L) به صورت تک دوز تحت درمان قرار گرفتند. ارزیابی میزان تری گلیسرید سلولی، دی گلیسرید سلولی، DNA Fragmentation و درصد زنده مانی در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اضافه کردن اسید های چرب، انجام شد.

یافته های پژوهش: اضافه کردن اسید اولئیک به اسید پالمیتیک باعث کاهش محتوای دی گلیسرید سلولی (P>۰/۰۵)، کاهش میزان DNA Fragmentation(P<۰/۰۵)، افزایش میزان تری گلیسرید سلولی (P<۰/۰۵) و افزایش زنده مانی سلولی (P<۰/۰۵) در مقایسه با اسید پالمیتیک به تنهایی شد.

بحث و نتیجه گیری: اسید اولئیک می تواند شاخصه های لیپو توکسیسیتی حاصل از اسید پالمیتیک را درکشت اولیه عضلات قلبی رت بالغ بهبود ببخشد.

واژه های کلیدی: اسید اولئیک، لیپو توکسیسیتی، اسید پالمیتیک، سلول قلبی

* **نویسنده مسئول** : گروه فارماکو لوژی و توکسیکو لوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: e.zadehhashem@urmia.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

مقدمه

اسید های چرب، به عنوان منبع اصلی تامین انرژی قلب مهره داران بالغ می باشند، ۷۰-۶۰٪ ATP (Adenosine Tri Phosphate) قلب از طریق اکسید اسیون اسید چرب تامین می گردد. با افزایش میزان حضور اسید های چرب در بافت های غیر چربی مثل کبد، کلیه، پانکراس، عضلات اسکلتی و قلبی، تجمع لیپید در این بافت ها افزایش یافته که در نهایت باعث اختلال در عملکرد این بافت ها و افزایش احتمال مرگ سلولی خواهد شد (۱). به تغییرات ایجاد شده در سلول یا اندام، در اثر در معرض قرار گرفتن با سطوح بالای چربی در بافت را لیپو توکسیسیتی (Lipotoxicity) می گویند. لیپو توکسیسیتی برای هر نوع سلول می تواند خصوصیات خاصی داشته باشد و فرایند هایی را ایجاد کند که در نهایت موجب اختلال عملکرد و مرگ سلول شود(۲).شدت لیپوتوکسیسیتی بسته به طول مدت و گستردگی اختلالات متابولیکی و اندام های متاثر شده دارد. در بافتهایی مثل قلب که ظرفیت کمی برای رژنراسیون دارند، اختلال عملکرد اندام سریع تر مشاهده می شود (۲). بر اساس وجود یا عدم وجود پیوند دو گانه، اسید های چرب به دو دسته ی غیر اشباع (Unsaturated Fatty Acid; UFA) و اشباع (Saturated Fatty Acids; SFA) تقسیم بندی می شوند. از انواع اسید های چرب اشباع می توان به اسید پالمیتیک ۱۶ کربنه اشاره کرد که در چربی های حیوانی، روغن نارگیل و خرما به میزان زیاد وجود دارند (۳). بسته به محل حضور پیوند دوگانه، اسید های چرب غیر اشباع به چندین خانواده تقسیم بندی می گردند که یکی از این خانواده ها، خانواده ی n-9 شامل اسید اولئیک می باشد. اسید اولئیک دارای ۱۸ کربن و یک پیوند دو گانه (Mono Unsaturated Fatty Acid; MUFA) است و زیتون و کلزا به میزان زیاد وجود دارد (۳). انواع اسید های چرب در خصوصیات، متابولیسم و عملکرد از هم متفاوت می باشند. اسید های چرب اشباع مانند پالمیتات، در همه ی کشت های سلولی سمی بوده اند، درحالیکه اسیدهای چرب دارای یک زنجیر غیر اشباع، مانند اولئیک، یا غیر سمی بوده یا اثرات محافظتی روی سلول ها دارند (۴). اضافه کردن اسید اولئیک به محیط کشت سلولی باعث مهار اثرات سمی اسید های چرب اشباع می شود. مکانیسمی که به وسیله آن اسید های چرب اشباع اثرات سمی خود را اعمال می کنند، به صورت دقیق مشخص نشده است. هم چنین مکانیسمی که باعث خنثی شدن اثرات سمی اسید های چرب اشباع، در تجویز هم زمان، بااسید های چرب غیراشباع می شود، نیز معلوم نشده است (۵). بنا بر این مشخص شدن دو مکانیسم مذکور، می تواند در آینده، ره یافت های جدیدی در درمان لیپو توکسیسیتی ارائه دهد (۵). مواجهه با اسید چرب اشباع و نه اسید چرب غیر اشباع، آپوپتوزیس را در محیط کشت سلولی تسریع می کند (۵). مطالعه بر روی فیبروبلاستها نشان داده است که تجمع لیپید در شبکه ی آندوپلاسمی ممکن است منجر به بروز اثرات توکسیک اسیدهای چرب اشباع گردد، در حالیکه UFA منجر به افزایش قطرات لیپید سیتو پلاسمیک می شود و زنده مانی سلول حفظ می شود (۶). در کشت ۲۴ ساعته ی سه لاین سلولی کبد (WRL68, HuH7, HePG2)، تاثیر اسید اولئیک (۰/۶۶، ۱/۳۲ میلی مولار) و اسید پالمیتیک (۰/۳۳ و ۰/۶۶ میلی مولار) به تنهایی یا در ترکیب با همدیگر بر روی آپوپتوزیس مطالعه شد و نشان داد که اسید اولئیک به تنهایی موجب آپوپتوزیس نشد، در حالی که اسید پالمیتیک منجر به افزایش چشم گیری در آپوپتوزیس در مقایسه با گروه کنترل شد (۷). از طرفی دیگر اسید اولئیک علیرغم عدم القاء آپوپتوزیس در مقایسه با اسید پالمیتیک، خصوصیات استئاتوزیس بیشتری نسبت به اسید پالمیتیک داشت (۷). مطالعات پیشین نشان داده اند که تجویز هم زمان اسید اولئیک با اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک در کشت سلول های بتای پانکراس (۸) و سلول های تخمدان هامستر چینی (۹) گردید. به نظر می رسد که شناخت دقیق خصوصیات و اثرات اسید های چرب، بخصوص اسید های چرب غیر اشباع، بر روی سلول های غیر چربی مثل سلول های قلبی، می تواند در آینده راه کار های پیشگیرانه یا درمانی در مورد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

بیماری های قلبی _عروقی ارائه دهد. در این راستا، تاکنون تاثیر اسید اولئیک، بر عضلات قلبی مبتلا به لیپوتوکسیسیتی رت بالغ مورد مطالعه قرار نگرفته است. از این رو، در مطالعه ی حاضر، تاثیر احتمالی اسید اولئیک، در پیشگیری از لیپو توکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک در کشت اولیه ی سلول های بطنی موش صحرایی با هدف کاربرد بالینی بررسی شد.

مواد و روش ها

جدا سازی و کشت سلول های بطنی قلب موش صحرایی بالغ: سلول های قلبی موش صحرایی بالغ طبق روش Piper and Volz جدا سازی و کشت شد (۱۰). پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه طراحی و به کار گرفته شد. به صورت خلاصه قبل از بی هوشی به هر موش صحرایی 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 موش های صحرایی با سرم فیزیولوژی شستشو و قلب به همراه قسمتی از ریه جدا شد. قلب در پتری دیش حاوی سرم فیزیولوژی سرد شده با یخ غوطه ور 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 و پرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. تمامی بافر ها با ترکیب ۹۵٪ o_2 و ۵٪ co_2 مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله بطن ها از دهلیز ها جدا شدند و با اسکالپل یا قیچی به صورت سوسپانسیون سلولی به قطر ۰/۷ میلی متر تبدیل شدند. سوسپانسیون سلولی از الک ۰/۲۲ میکرونی عبور و به مدت ۶ دقیقه در g ۲۵ 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 و محلول به مدت ۳ دقیقه در g ۱۵ سانتریفیوژ گردید. محیط کشت M (Sigma-Aldrich; cat. no. ۱۹۹ M5017) به همراه تورین، کراتین ، کارنیتین و FCS 4% (Fetal CalfSerum) به پلت سلولی مرحله قبل اضافه شد.

شمارش سلول ها و افزودن اسید های چرب: سلول ها شمارش شدند و به تعداد مورد نظر (حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول) به همراه محیط کشت M۱۹۹ به همراه تورین، کراتین ، کارنیتین و FCS 4% به پلت های ۲۴ خانه انتقال داده شد و به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. پلت های ۲۴خانه با بافر شستشوی حاوی کلسیم و منیزیم شستشو داده شد. نهایتا اسید های چرب مورد نظر اسید پالمیتیک (Sigma-(۰/۵mM Aldrich; cat. no. P0500)، اسید اولئیک (Sigma-Aldrich; cat. no. O1008) (۰/۵mM) و ترکیب اسید اولئیک + اسید پالمیتیک (۰/۵mM mM ۰/۵+) به عنوان گروه های درمانی و ۰/۵mM از Bovine Serum Albumin(Sigma- (BSA) Aldrich; cat. no. A9418) به عنوان گروه کنترل در این مرحله به محیط کشت سلول ها اضافه شدند. قابل ذکر است که تمام اسید های چرب مورد استفاده، نیز به صورت اتصال یافته با (BSA) استفاده شدند. سلول ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (حاوی ۹۵٪ O_2 و ۵٪ CO_2، دما ^{0C} ۳۷) کشت داده شدند و در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت، جهت ارزیابی میزان تری گلیسرید سلولی، دی گلیسرید سلولی، DNA Fragmentation و درصد زنده مانی نمونه گیری به عمل آمد.

استخراج لیپید سلولی: لیپید سلولی طبق روش پیشنهادی Bligh and Dyer استخراج شد (۱۱). در این روش سلول های هر چاهک در حضور متانول و اسید استیک خراشیده شدند و داخل لوله آزمایش ریخته شدند. سپس بعد از اضافه کردن کلروفرم/ متانول مخلوط شدند و به ترتیب کلروفرم و بعد ۲ میلی لیتر محلول کلرید سدیم اضافه شد و سانتریفیوژ گردید. فاز پایینی جمع آوری شد و در لوله مجزایی قرار داده شد. به فاز بالایی، کلروفرم اضافه شد و مشابه مرحله ی قبل سانتریفیوژ شد. فاز پایینی مجدداً جمع آوری شد و به لوله های حاوی این فاز اضافه گردید. محتوای لوله ها هوا دهی شدند و ۰/۵ میلی لیتر کلروفرم/ متانول به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

هر یک اضافه شد و نمونه ها تا زمان اندازه گیری فاکتور های مورد نظر در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

اندازه گیری تری‌گلیسرید سلولی: تری گلیسرید سلولی طبق روش پیشنهادی Neri and Frings اندازه گیری شد (۱۲).۵۰ میکرو لیتر از لیپید استخراج شده، ۲۰۰ میکرو لیتر ایزو پروپانول اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. سپس محلولی از هیدروکسید پتاسیم به عنوان محلول صابونی‌کننده 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 ۶۵°c قرار داده شد و جذب نوری نمونه ها در ۴۱۰ نانو متر در مقابل لوله شاهد با دستگاه اسپکترو فتومتر (Shimadzu, Japan) قرائت شده و با استفاده از منحنی استاندارد و نیز اعمال ضریب رقت، مقدار تری گلیسرید محاسبه گردید.

اندازه گیری دی گلیسرید سلولی: دی‌گلیسرید سلولی طبق روش پیشنهادی Baldanzi و همکاران اندازه گیری شد. پلیت های سیلیکاژل (TLC Silica Gel 60 F254, Merck, Germany) با استفاده از متانول فعال شدند. به ۵۰ میکرو لیتر از لیپید استخراج شده، میکرو لیتر ۵۰ از کلروفرم اضافه شد و روی پلیت های 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 شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کوماسی ۰/۰۰۳ درصد تهیه شده در Nacl (۱۰۰mM) و متانول ۳۰ درصد رنگ شد. با استفاده از نرم افزار Power Scan 2012 باند های تشکیل شده در مقابل باند حاصل از استاندارد کمی شدند.

اندازه گیری پروتئین تام : براساس روش پیشنهادی Bradford پروتئین سلولی اندازه گیری شد (۱۴). در این روش با استفاده از معرف Bradford و استاندارد های تهیه شده از BSA ، میزان پروتئین سلولی با دستگاه اسپکترو فتومتر (Shimadzu, Japan) درطول موج ۵۹۵ نانو متر قرائت گردید.

ارزیابیDNA Fragmentation سلولی: DNA Fragmentation سلولی طبق روش پیشنهادی Sandau ارزیابی شد (۱۵). سلول های هر چاهک به میکروتیوب مجزا منتقل شد و هر چاهک با ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر Lysis شسته شد و به سلول های موجود در میکرو تیوب مربوطه اضافه شد و در دمای c° ۴ قرار داده شد. میکرو تیوب ها به مدت ۲۰ دقیقه در g ۲۷۰۰۰ با دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 c° ۴ قرار داده شدند. جهت 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 c° ۹۰ قرار گرفت. در نهایت DPA reagent به آن ها اضافه شد و ۲۴-۱۲ ساعت بعد، OD مربوط به s و p در طول موج ۶۰۰ nm با دستگاه اسپکترو فتومتر (Shimadzu, Japan) قرائت شد.

OD s / (OD p +OD s( ) ×)**۱۰۰**
=%DNA Fragmentation

ارزیابی زنده مانی سلول با روش رنگ آمیزی تریپان بلو: زنده مانی سلولی طبق روش پیشنهادی Pienata and Lehrارزیابی شد (۱۶). به هر چاهک تریپسین- EDTA ۰/۲۵٪ اضافه شد و پلیت به مدت ۵-۴ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. سپس به هر چاهک محیط کشت حاوی ۱۰ ٪ FBS اضافه شد و بعد از رقیق سازی، µL ۱ از سوسپانسیون سلولی به یک میکرو تیوب انتقال داده شد و ۱۲۵۰ میکرو لیتر از تریپان بلو ۰/۴٪ و ۷۵۰ میکرو لیتر PBS به میکرو تیوب اضافه شد. میکروتیوب را کاملا مخلوط کرده و ۱۵-۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی به لام هموسیتومتر انتقال داده شد. در زیر میکروسکوپ تعداد سلول ها در ۴ مربع گوشه ای شمرده شد (سلول زنده (سلولی که رنگ نگرفته است) و مرده (سلولی که رنگ آبی گرفته است) جداگانه شمرده شد) و درصد سلول های زنده محاسبه شد.

آنالیز آماری داده های موجود با نرم افزار Sigma Stat (version 3.5)، با آزمون آماری One-way

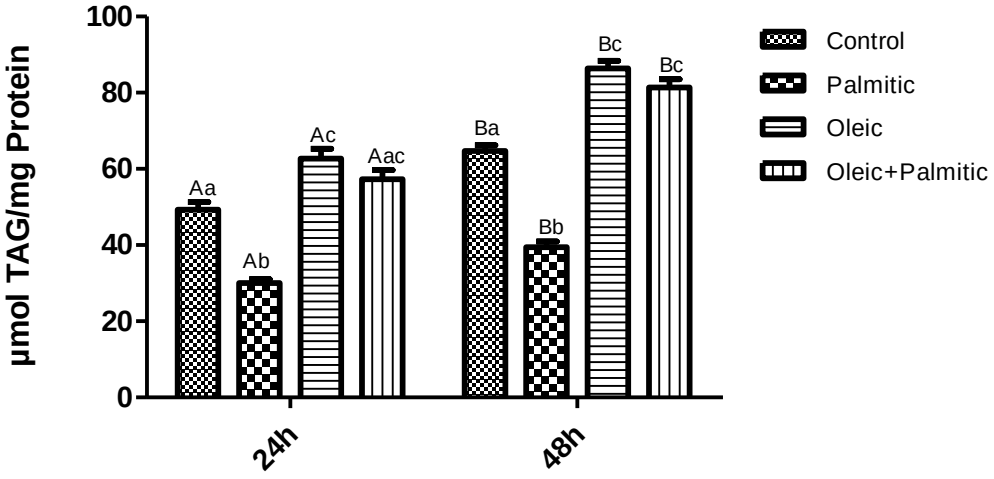
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

ANOVA و T-Test انجام شد. سطح معنی داری داده ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

تری گلیسرید سلولی: میزان تری گلیسرید سلولی در همه گروه ها، در زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه مشابه در زمان ۲۴ ساعت افزایش قابل توجهی را نشان داد (P< ۰/۰۱). تری گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، درگروه اسید پالمیتیک، کمتر ازگروه های دیگربوده(P< ۰/۰۱) و میزان تری گلیسرید در گروه اسید اولئیک به مراتب بیش از تری گلیسرید مشاهده شده در گروه کنترل و اسید پالمیتیک بود (P< ۰/۰۱). هم چنین میزان تری گلیسرید در گروه اسید اولئیک نسبت به میزان تری گلیسرید در گروه ترکیبی بیش تر بود، اما این اختلاف، از لحاظ آماری معنی دار نبود (P> ۰/۰۵; نمودار ۱).

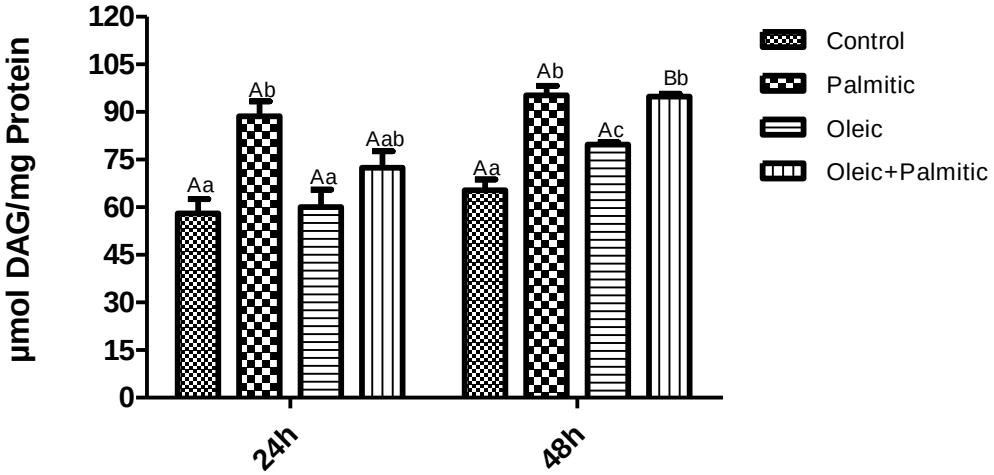


نمودار۱: مقادیر تری گلیسرید سلولی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با Palmitic، Oleic و Oleic + Palmitic در زمان ۲٤ و ٤٨ ساعت. c و b ، a اختلاف آماری را بین گروه ها در یک زمان مشخص نشان می دهند و B و A اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲٤ و ٤٨ ساعت نشان می دهند.

دی گلیسرید سلولی: دی گلیسرید سلولی، در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید اولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش یافت، البته این افزایش از نظر آماری فقط در گروه ترکیبی معنی دار بود (P<۰/۰۵). میزان دی گلیسرید سلولی در زمان ۲۴ ساعت در گروه کنترل کم ترین و در گروه اسید پالمیتیک بیش ترین بود. هم چنین میزان دی گلیسرید سلولی گروه اسید اولئیک مشابه با گروه کنترل و گروه ترکیبی بود که فقط با گروه اسید پالمیتیک اختلاف بارزی داشت (P =۰/۰۳). میزان دی گلیسرید سلولی گروه اسید اولئیک در زمان ۴۸ ساعت، مابین میزان دی گلیسرید گروه کنترل و گروه اسید پالمیتیک قرار داشت و با گروه های مذکور اختلاف چشم گیری داشت (P< ۰/۰۱). در این زمان، میزان دی گلیسرید گروه اسید پالمیتیک نسبت به گروه ترکیبی اختلاف چشم گیری نداشت (P> ۰/۰۵; نمودار ۲).

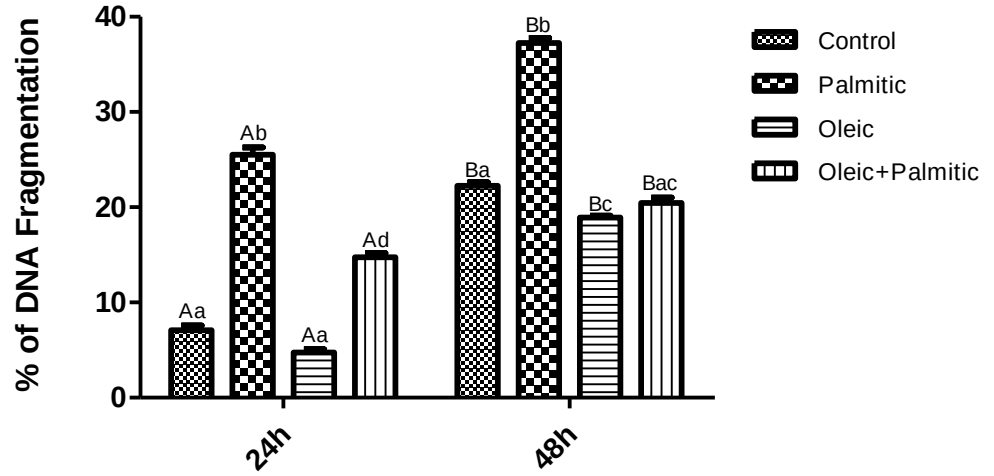
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]



نمودار۲: مقادیر دی گلیسرید سلولی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با Palmitic، Oleic و Oleic + Palmitic در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.c و b ، a اختلاف آماری را بین گروه ها در یک زمان مشخص نشان می دهند و B و A اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می دهند.

DNA fragmentation: درصد DNA fragmentation، در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید اولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش چشم گیر یافت (P< ۰/۰۵). در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، اسید پالمیتیک، درصد DNA fragmentation را در مقایسه با سایر گروه ها، افزایش داد (P< ۰/۰۰۱)، در حالی که با اضافه کردن اسید اولئیک به اسید پالمیتیک (گروه ترکیبی)، درصد DNA fragmentation در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک کاهش یافت (P< ۰/۰۰۱). بر خلاف زمان ۲۴ ساعت، درصد DNA fragmentation بین گروه کنترل و گروه اسید اولئیک در زمان ۴۸ ساعت،اختلاف معنی داری داشت(P< ۰/۰۰۱; نمودار ۳).



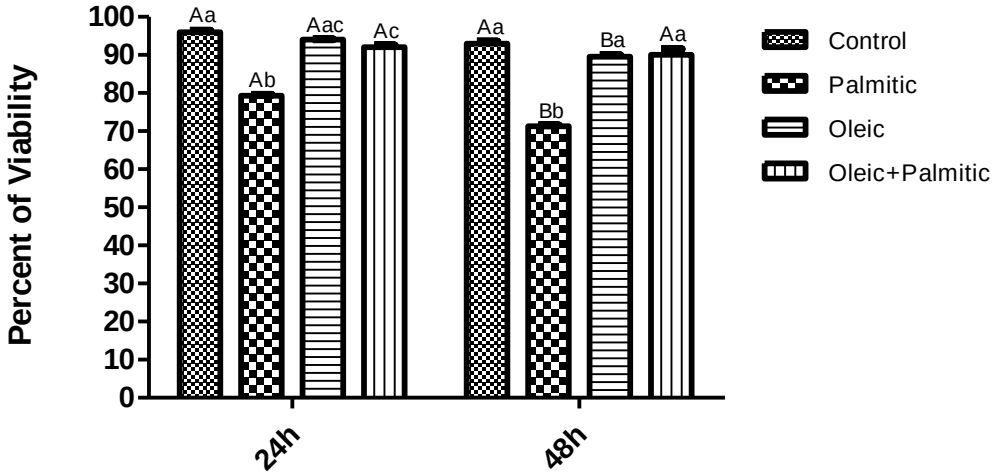
نمودار۳: درصد DNA fragmentation در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با Palmitic، Oleic و Oleic + Palmitic در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت.c و b ، a اختلاف آماری را بین گروه ها در یک زمان مشخص نشان می دهند و B و A اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می دهند.

زنده مانی سلولی: درصد زنده مانی سلولی، در گروه اسید پالمیتیک، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سه گروه دیگر، دارای کم ترین مقدار بود (P< ۰/۰۰۱). در زمان های مذکور، سلول های زنده در گروه ترکیبی،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

بیش تر از گروه اسید پالمیتیک (P< ۰/۰۱)، در گروه اسید اولئیک بیش تر از گروه ترکیبی (P> ۰/۰۵) و در گروه کنترل بیشتر از گروه اسید اولئیک (P> ۰/۰۵) مشاهده شدند. درصد زنده مانی سلول ها، در گروه های درمانی با اسید پالمیتیک و اسید اولئیک در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت کاهش چشم گیری یافت (P = ۰/۰۰۹)، اما این کاهش در گروه کنترل و گروه ترکیبی چشم گیر نبود (P = ۰/۰۶; نمودار ۴).



نمودار٤: درصد زنده مانی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با Palmitic، Oleic و Oleic + Palmitic در زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت.c و b ، a اختلاف آماری را بین گروه ها در یک زمان مشخص نشان می دهند و B و A اختلاف آماری را در یک گروه، در زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت نشان می دهند.

پروتئین تام: میزان پروتئین درسلول های عضلانی قلب رت بالغ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون درگروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسید اولئیک و اسیداولئیک + اسید پالمیتیک به شرح جدول ۱ می باشد.

جدول ۱: اندازه گیری میزان پروتئین تام در گروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسید اولئیک و اسید اولئیک + اسید پالمیتیک در زمان ٤٨ ساعت. مقادیر به صورت Mean±SE نمایش داده شده است.

گروه ها	میزان پروتئین تام (µg/ml)
کنترل	۱/۲۷ ± ۰/۲۷
اسید پالمیتیک	۱/۷۲ ± ۰/۰۶
اسیداولئیک	۱/۷۵± ۰/۱۹
اسید اولئیک + اسید پالمیتیک	۱/۵۹± ۰/۱۱

بحث و نتیجه گیری

اسید چرب غیر اشباع اولئیک در تجویز هم زمان با اسید چرب اشباع پالمیتیک، باعث کاهش محتوای DAG سلولی، افزایش میزان تری گلیسرید سلولی، هم چنین باعث کاهش میزان DNA Fragmentation و جلوگیری از مرگ سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک شد.

به نظر می رسد که اثرات محافظتی اسید های چرب غیر اشباع نظیر اسید اولئیک در جلوگیری از لیپو توکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک، به دلیل تبدیل پالمیتات به تری گلیسرید و فعال کردن مسیرهای مرتبط با ابقاء سلولی باشد (۱۷). جهت ارزیابی این که آیا اسید اولئیک در تجویز توام با اسید پالمیتیک، می تواند باعث افزایش تشکیل تری گلیسرید در سلول های مذکور شود یا نه، در مطالعه ی حاضر میزان تری گلیسرید سلولی در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون اندازگیری گردید. مقدار تری گلیسرید سلولی در گروه اسید اولئیک بیشتر از گروه اسید

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

پالمیتیک در زمان ۲۴ ساعت بود. زمانی که اسید اولئیک همزمان با اسید پالمیتیک به محیط کشت سلولی اضافه گردید، افزایش در میزان تری گلسیرید در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. شبیه این الگو در زمان ۴۸ نیز تکرار گردید. نتایج مطالعه ی اخیر نشان داد که اسید اولئیک باعث تشویق تشکیل تری گلیسرید در سلول های مورد مطالعه گردید. مقدار تری گلیسرید سلولی در زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت در تمامی گروه ها کاهش چشم گیری پیدا کرده بود که این احتمالا در نتیجه ی مرگ سلولی در زمان ۴۸ساعت در مقایسه با زمان ۲۴ساعت و جدا شدن سلول های مورد مطالعه از کف چاهک های پلیت های کشت سلول می باشد.اولین گام در غیر سمی کردن اسید چرب سمی پالمیتیک، استریفیکاسیون این اسید چرب به تری گلسیرید بوده، که این چربی خنثی به راحتی و بدون ایجاد خطر زیاد می تواند در سلول ذخیره گردد و گام بعدی در از بین بردن اثرات سمی این اسید چرب، القاء اکسیداسیون اسید چرب در میتوکندری به واسطه ی تحریکات ناشی از MUFA می باشد (۵). هم چنین به نظر می رسد که به دنبال تیمار سلول با اسیدهای چرب اشباع، یک یا چندین مرحله از مراحل تشکیل تری گلیسرید که در شبکه ِ آندو پلاسمی اتفاق می افتد دچار نقص می شود، در حالی که در تیمار با اسید های چرب دارای یک پیوند غیر اشباع چنین نقصی دیده نمی شود(۱۸). در مطالعات مشابه دیگر نیز نشان داده شد که اسید های چرب غیر اشباع منجر به تشکیل قطرات لیپید در سیتوزول سلول های C2C12 می شوند، درحالیکه اسیدهای چرب اشباع به تنهایی منجر به شکل گیری این قطرات لیپیدی نمی شوند. اما در تجویز هم زمان با اسید های چرب غیر اشباع، در شکل گیری قطرات لیپیدی خنثی که همان تری گلیسرید هستند، شرکت می کنند (۱۹). اثر بیو لوژیکی تجمع تری گلیسرید روی لیپو توکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک بحث برانگیز می باشد. مطالعات اولیه گزارش کرده اند که تجمع تری گلیسرید سیگنال های خطرناکی در توسعه پاتوژنزیز مرتبط با متابولیسم غیرنرمال لیپید ایجاد می کند (۲۰). تجمع تری گلیسرید در سلول های بتای پانکراس در ارتباط نزدیک با اختلال ترشح انسولین می باشد (۲۰). در مقابل گزارش شده است که اسیدهای چرب که توانایی بالا در سنتز تری گلیسرید دارند، در پیشگیری از آپاپتوزیس وابسته به اسید پالمیتیک به وسیله تجزیه اسید پالمیتیک به ذخایر تری گلیسرید شرکت می کنند (۲۱). کنوپ و همکاران نشان دادند که رابطه معکوسی میان درصد سلول های بتای مرده پانکراس و محتوای تری گلیسرید سلولی آن ها وجود دارد (۲۱). هم چنین گزارشاتی مبنی بر این وجود دارد که اسید های چرب غیر اشباع، آپاپتوزیس القا شده با اسید پالمیتیک را در سلول های غیر چربی به وسیله شرکت دادن اسید پالمیتیک در تشکیل تری گلیسرید محافظت می کنند. این تجمع در واقع دفاع اولیه سلولی در مقابل لیپو توکسیسیتی می باشد (۲۱). در مطالعه ی حاضر اضافه کردن اولئات به پالمیتات باعث کاهش بیش تری در غلظت دی گلیسرید داخل سلولی در زمان ۲۴ساعت نسبت به ۴۸ ساعت، در مقایسه با گروه اسیدپالمیتیک گردید که این اختلاف در هیچ کدام از دو زمان مذکور، قابل توجه نبود. قبلا نشان داده شده بود که اسید پالمیتیک در مقایسه با اسید اولئیک به نسبت بیشتری به دی گلیسرید در داخل سلول های عضلانی تبدیل می گردد (۲۲). در تایید این نظریه، چاوز و همکاران نشان دادند که اضافه کردن پالمیتات به محیط کشت سلول های عضلانی C2CI22 باعث تجمع دی گلیسرید داخل سلولی شده، در حالی که اضافه کردن اسید اولئیک چنین اثری را ایجاد نکرد (۲۳). تجویز اسید چرب غیر اشباع می تواند حالت کریستال مایع در ترکیب دی گلیسرید ایجاد کند و توانایی واکنش پذیری این ترکیب با پروتئین های لازم جهت تبدیل این ترکیب به تری گلیسرید را فراهم کند (۲۳). در بین اسید های چرب غیر اشباع نیز توانایی و ظرفیت تبدیل دی گلیسرید به تری گلیسرید متفاوت است. هم چنین نشان داده شده است که اسید های چرب غیراشباع نظیر اسید اولئیک در شرایط تغذیه ای نامناسب (رژیم غذایی نا متعادل و بیش از حد) به تعادل وزن بدن کمک می کنند. با این ویژگی اسید های چرب غیر اشباع می توانند در رژیم های درمانی برای مدیریت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

چاقی و در نتیجه عواقب ناشی از چاقی نظیر بیماری های قلبی- عروقی مفید واقع شوند (۲۴). از علائم آپوپتوزیس تقسیم شدن و تکه تکه شدن DNA ژنومیک به خصوص در مناطق نوکلئوزوم می باشد (۲۵). تکه تکه شدن DNA باعث ایجاد الگوی DNA Fragmentation خواهد شد. هر چند که در لاین سلولی HD-60 تفاوت معنا داری در میزان آپوپتوزیس بین گروه پالمیتات (۷۵ میکرو مولار) و اولئات (۷۵ میکرو مولار) بعد از ۴۸ ساعت مشاهده نگردید (۲۶) اما در سلول های هپاتوسیت موش صحرایی تیمارشده با اسید پالمیتیک (۰/۲۵ میلی مولار) باعث افزایش معنا داری در مرگ سلولی شد (۲۷). نتیجه ی مطالعه ی حاضر نشان داد که اسید پالمیتیک باعث افزایش معنا داری در میزان DNA Fragmentation در مقایسه با گروه کنترل شد و نیز اضافه کردن اسید اولئیک به اسید پالمیتیک باعث کاهش معنی دار درصد DNA Fragmentation نسبت به گروه اسید پالمیتیک شد. ولی نتایج مطالعه ی حاضر با نتایج Declan و همکاران هم خوانی نداشت. هر چند که در مطالعه ی دکلان و همکاران احتمالا دوز اسید اولئیک جهت خنثی کردن اثرات مخرب پالمیتیک پایین بوده است (۲۶). در مطالعه ی حاضر درصد زنده مانی سلول های بطنی قلبی در گروه پالمیتیک به طور معنا داری کمتر از گروههای کنترل، گروه اسید اولئیک و گروه ترکیبی در تمام طول دوره ی کشت سلولی بود. به تازگی مشخص شده است که آپوپتوزیس سلول های بطنی قلب نقش مهم و مرکزی در ایجاد و پیشرفت نارسایی قلبی دارد (۲۸).اسید پالمیتیک مرگ سلولی و آپوپتوزیس را القا می کند (۲۸). آپوپتوزیس ناشی از تیمار با اسید های چرب اشباع در دیگر سلول ها نیز نشان داده شده است(۲۹). مکانیسم ایجاد مرگ سلولی در زمان تجویز اسید پالمیتیک به طور کامل مشخص نشده است، هر چند که چندین نظریه در مورد مکانیسم اسید های چرب اشباع گزاش شده است. بعد از اضافه کردن اسید پالمیتیک، میزان سنتز سرامید افزایش داشت که این مولکول باعث القاء آپوپتوزیس می باشد (۳۰). بنا بر این بالا رفتن میزان اسید پالمیتیک در سلول با افزایش غلظت سرامید در ارتباط بوده که این باعث القاء مرگ سلولی می شود (۳۱). دومین نظریه در مورد مرگ سلولی ناشی از افزایش اسید پالمیتیک داخل سلولی، این است که اسید پالمیتیک ممکن است در اثر عدم متابولیزه شدن کامل باعث القاء مرگ سلولی می شود. اسید های چرب در اثر متابولیزه شدن ناقص تبدیل به ترکیبات سمی می گردند (۳۲). در مطالعه ی اخیر تجویز هم زمان اسید اولئیک و اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از اسید پالمیتیک گردید. نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که اسید اولئیک باعث کاهش محتوای دی گلیسرید سلولی، افزایش میزان تری گلیسرید سلولی، همچنین باعث کاهش میزان DNA Fragmentation و جلوگیری از مرگ سلولی در مقایسه با اسید پالمیتیک شد. تجویز هم زمان اسیداولئیک با اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک بر روی سلول های مذکور گردید. بر اساس دانش نویسندگان، این اولین گزارش از اثرات مفید اسید اولئیک بر روی سلول های بطنی کشت داده شده قلب موش صحرایی بالغ می باشد.

References

1. Mangiapane EH, Salter AM. Diet lipoproteins and coronary heart disease a biochemical perspective. 2th ed. UK Nottingham Uni Publication.1999;P.234

2. Ulloth JE,Casiano CA, Deleon M. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. J Neurochem 2003; 84: 655-68.

3. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. J Am Coll Cardiol 2009; 54: 585-94.

4. Nolan CJ, Larter CZ. Lipotoxicity why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? J Gastroenterol Hepatol 2009; 24: 830-40.

5. Gordon GB. Saturated free fatty acid toxicity II lipid accumulation ultrastructural alterations and toxicity in mammalian cells in culture. Exp Mol Pathol 1997; 27:262-76.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

6. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 519-29.
7. 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: 830-40.
8. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic B-cell turnover and function. Diabetes 2003; 52:726-33.
9. Listenberger LL, Han X, Lewis SL, Cases S, Farese RV Jr,Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 3077-82.
10. Piper HM, Volz A. In cell culture techniques in heart and vessel research. 4th ed. Springer Verlag Heidelberg Publication.1990; P.158-77.
11.Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-7.
12.Neri BP, Frings C S. Improved method for determination of triglyceride in serum. Clin Chem 1973; 19: 1201-2.
13.Baldanzi G, Alchera E, Imarisio C, Gaggianesi M, Dal Ponte C, Nitti M, et al. Negative regulation of diacylglycerol kinase theta mediates adenosine dependent hepatocyte preconditioning. Cell Death Differ 2010; 17: 1059-68.
14.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: 248- 54.
15.Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. Kidney Int 1997; 52: 378-86.
16.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.
17.Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. Curr Hypertens Rep 2005; 7: 412-7.
18.Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, Mcmillin JB, Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitateinduced cardiomyocyte apoptosis. J Biol Chem 2001; 276: 38061-7.
19.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; 21:13.
20.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; 145:3566-77.
21.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; 50:315–21.
22.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 2011; 120:195-206.
23.Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. Arch Biochem Biophys 2003; 419:101-9.
24.Youshari N, Ebrahimimameghani M, Asgharijafarabadi M, Youshari N. Association between dietary fructose and lipid profile in non-alcoholic fatty liver disease. J Babol Uni Med Sci 2014; 6:23-30.
25.Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146: 3-15.
26.Declan A, Healy R, William G. Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line. Clin Sci 2003; 104: 171-9.
27.Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J. Effect of a linolenic acid on endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis of

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. Lipids Health Dis 2011; 10:122.

28.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.

29.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; 287:14364-76.

30.Obeid LM, Hannun YA. Ceramide a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. J Cell Biol 1995; 58: 191-8.

31.Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. Biochim Biophys Acta 2002; 1585: 114-25.

32.Hendrickson SC, Louis JD, Lowe JE, Abdelaleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. Mol Cell Biochem 1997; 166: 85-9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]

The Evaluation of Oleic Acid in the Prevention of Lipotoxicity Induced by Palmitic Acid in Rat Cultured Cardiomyocytes

*Zadehhashem E[1 *], Kazemkoohi M[2]*

(Received: January 9, 2016 Accepted: May 8, 2016)

Abstract

***Introduction*:** In a variety of experimental systems, saturated and unsaturated fatty acids differ significantly in their contributions to lipotoxicity. It was reported that oleic acid prevented the lipotoxicity in rat hepatocytes. The objective of the present experiment was to evaluate the effects of oleic acid on the induced lipotoxicity by palmitic acid in cultured cells of rat heart muscle.

***Materials & methods*:** Rat ventricular heart muscle cells were isolated and seeded into 24-well-plates. Cells were treated with one dose of palmitic acid (0.5 mmol/L), oleic acid (0.5 mmol/L), palmitic + oleic acid (0.5 mmol/L + 0.5 mmol/L) or left as control. Triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), DNA fragmentation and percent of viability were measured at 24, 48 hoursafter adding fatty acids.

***Findings*:** Result showed that when oleic acid co-administrated with palmitic it would decrease DAG ($P > 0.05$) and DNA fragmentation ($P < 0.05$) and increase TAG ($P < 0.05$) and viability ($P < 0.05$) in comparison with palmitic alone.

***Discussion & conclusions*:** In conclusion, oleic acid would improve the lipotoxicity indices of palmitic acid in primary adult rat cardiomyocytes culture.

***Keywords*:** Oleic acid, Lipotoxicity, Palmitic acid, Cardiac cell

1. Dept of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Dept of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran
** Corresponding author Email: e.zadehhashem@urmia.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.55]