مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۷، تیر ۱۳۹۵، صفحه ۴۰-۳۴

# کاهش سمیت ناشی از اسیدپالمیتیک به واسطه تولید تری آسیل گلیسرول توسط اسیدلینولئیک در سلول های قلبی موش صحرایی

**الهام زاده هاشم (PhD)[1*]، فرشته پناهنده (MSc)[2]، محمدکاظم کوهی (PhD)[3]**

۱-گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۲-گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران شرق
۳-گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

**دریافت: ۹۴/۱۱/۵، اصلاح: ۹۵/۱/۳۰، پذیرش: ۹۵/۳/۱۲**

## خلاصه

**سابقه و هدف:** بیماریهای قلبی-عروقی ناشی از لیپوتوکسیسیتی به طور چشمگیری در جمعیت انسانی در حال افزایش می باشند. در این مطالعه، تاثیر اسید لینولئیک در کاهش لیپوتوکسیسیتی سلولهای قلبی موش صحرایی بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سلولهای بطنی قلب ۵ موش صحرایی در پلیت های ۲۴ خانه کشت و به صورت تصادفی در ۴ گروه به ترتیب گروه های کنترل (۰/۵mM از Bovine Serum Albumin) و درمانی با اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسیدلینولئیک (۰/۲۵mM) و ترکیب اسیدلینولئیک با اسید پالمیتیک (۰/۲۵+mM۰/۵mM) تحت درمان قرار گرفتند. چاهک های هر ردیف از پلیت به یک گروه اختصاص داده شد. میزان تری آسیل گلیسرول سلولی، دی آسیل گلیسرول سلولی، DNA Fragmentation و درصد زنده ماندن در زمانهای ۲۴و ۴۸ ساعت پس از کشت، ارزیابی شد. هر ۲ چاهک از هر گروه برای ارزیابی هر فاکتور استفاده شد و تمام مراحل به صورت سه بار تکرار انجام شد.

**یافته‌ها:** در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بـه ترتیـب، اضـافه کـردن اسـیدلینولئیک بـه اسـید پالمیتیـک باعـث کـاهش ۴/۶۵ ٪ و ۶/۱۵ ٪ میـزان DNA Fragmentation (p<۰/۰۰۱) و ۰/۳۶٪ و ۴/۸۸ ٪ محتوای دی آسیل گلیسرول سلولی (p>۰/۰۵)، افزایش ۴۰ ٪ و ۴۴ ٪ میزان تـری آسـیل گلیسـرول سـلولی (p<۰/۰۳) و ۶/۲۵ ٪ و ۱۰/۵۲ ٪ زنده مانی سلولی (p<۰/۰۱) در مقایسه با اسید پالمیتیک به تنهایی شد.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که اسیدلینولئیک به واسطه افزایش تولید تری آسیل گلیسرول، سمیت ناشی از اسیدپالمیتیک را بهبود می‌بخشند.

**واژه‌های کلیدی: اسیدلینولئیک، لیپوتوکسیسیتی، اسید پالمیتیک، عضله قلبی رت، تری آسیل گلیسرول، دی تری آسیل گلیسرول.**

## مقدمه

سلولهای قلبی ظرفیت محدودی برای سنتز اسیدهای چرب دارند و بنابراین به دریافت اسیدهای چرب از گردش خون نیازمند هستند (۱). اما عدم تناسب میان دریافت سلولی این اسیدهای چرب با توانایی استفاده از آنها، منجر به تجمع لیپید می شود(۴-۲). مطالعات نشان دادند که افزایش میزان اسیدهای چرب آزاد منجر به کاهش اکسیداسیون اسید چرب و افزایش سنتز لیپیدهای سمی مانند دی آسیل گلیسرول (Diacylglycerol; DAG) در بافت قلب خواهد شد (۵). به عوارض ناشی از افزایش میزان اسیدهای چرب آزاد و تجمع لیپید، لیپوتوکسیسیتی می‌گویند. لیپوتوکسیسیتی در میوسیت ها می تواند باعث اختلالات سلولی، انقباض و انبساط ناقص یا هردو، تغییر مسیر سیگنال های کلیدی و مرگ سلولی شود (۶). در رابطه با تاثیر اسیدهای چرب در بروز یا پیشگیری از لیپوتوکسیسیتی نظرات متفاوتی وجود دارد. داشتن یک یا چند باند دوگانه در ترکیب اسید چرب غیر اشباع می تواند درجات مختلفی از نقش حفاظتی در مقابل لیپوتوکسیسیتی را نشان دهد (۸و۷). افزایش اسیدهای چرب اشباع، باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد و کاهش قدرت دفاع آنتی اکسیدانی شده و در نهایت منجر به القاء آپوپتوزیس خواهد شد (۱۰و۹). آپاپتوزیس و لیپوتوکسیسیتی القاشده توسط اسیدهای چرب اشباع، در سلول های اندوتلیال (۱۱) و سلولهای اسکلتی (۱۲) و سلولهای HIT-T15 (۱۳) مطالعه شده است. درحالیکه اسیدهای چرب غیراشباع اثرات آنتاگونیزه کننده بر علیه لیپوتوکسیسیتی القا شده با اسیدهای چرب اشباع دارند(۱۵و۱۴). اسید پالمیتیک و استئاریک باعث آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول عصبی شدند، ولی اسید اولئیک و آراشیدونیک این اثرات را بر روی سلول عصبی نداشتند (۱۶). در مطالعه Cheon و همکاران، اسید پالمیتیک در حالت وابسته به دوز منجر به افزایش مرگ سلولی شد. اما اسیدآراشیدونیک لیپوتوکسیسیتی حاصل از اسیدپالمیتیک را در غلظت ۶۲ میکرومولار مهار کرد (۱۷). همچنین اثرات حفاظتی اسیدهای چرب غیر اشباع در سلولهای قلبی و هپاتوسیتها مشخص شده است (۱۹و۱۸). به نظر می‌رسد که تجمع اسیدپالمیتیک به تنهایی یا دیگر سیگنالهای میانجی حاصل از متابولیتهای آن مانند دی آسیل گلیسرول (DAG) ممکن است مسئول القاء آپوپتوز ناشی از اسیدپالمیتیک در سلول عضلانی قلبی باشند(۲۲-۲۰). تاکنون تاثیر اسیدچرب لینولئیک (n-6)، بر سلول های قلبی در

* مسئول مقاله: دکتر الهام زاده هاشم
آدرس: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دامپزشکی، بخش فارماکولوژی و سم شناسی. تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۸۲۶۶۸
E-mail: e.zadehhashem@urmia.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]

مقابل اسیدپالمیتیک مورد مطالعه قرار نگرفته است. از این رو مطالعه تاثیر این دسته از اسید های چرب بر شاخصه های لیپوتوکسیسیتی در سلول های قلبی، می تواند گام موثری در خصوص یافتن تاثیر این اسید چرب بر وضعیت سلول های عضله قلبی مذکور و احتمالا تاثیر این اسید چرب در کاهش بیماری های قلبی مبتلا به لیپوتوکسیسیتی باشد. لذا در این مطالعه، تاثیر اسید لینولئیک در کاهش لیپوتوکسیسیتی سلولهای قلبی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی و کشت سلول های بطنی قلب موش صحرایی بالغ:** در این مطالعه تجربی، سلولهای قلبی رت بالغ طبق روش Piper and Volz جداسازی و کشت شد (۲۳). سلولهای جدا شده از قلب هر موش صحرایی شمارش شدند و به تعداد مورد نظر (حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول) به همراه محیط کشت M۱۹۹ به همراه تورین، کراتین، کارنیتین و FCS 4% ( Fetal Calf Serum) به هر یک از چاهک های پلیت های ۲۴خانه انتقال داده شد. به بیان بهتر سلول های قلبی هر موش در یک پلیت ۲۴ چاهکی (به تعداد مساوی سلول برای هر چاهک) ریخته شد و به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. سلول های هر چاهک با بافر شستشوی حاوی کلسیم و منیزیم شستشو داده شد و چاهک ها به صورت تصادفی در ۴ گروه به ترتیب گروه های کنترل (۰/۵mM از Bovine Serum Albumin) و درمانی با اسید پالمیتیک (۰/۵mM)، اسیدلینولئیک (۰/۲۵mM) و ترکیب اسیدلینولئیک+اسید پالمیتیک (۰/۲۵ mM +۰/۵mM) تقسیم شدند. طوری که چاهک های هر ردیف از پلیت به یک گروه اختصاص داده شد. هر ۲ چاهک از هر گروه برای ارزیابی هر متغیر استفاده شد و تمام مراحل به صورت سه بار تکرار انجام شد. در نهایت ۵ موش برای این مطالعه استفاده شد. قابل ذکر است که تمام اسیدهای چرب مورد استفاده، نیز به صورت کونژوگه با Bovine Serum Albumin(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، ۴۸ ساعت، جهت ارزیابی متغیرهای زیر (میزان تری آسیل گلیسرول سلولی، دی آسیل گلیسرول 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(۲۴). در این روش سلول های هر چاهک در حضور متانول و اسید استیک خراشیده شدند. 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. سپس محتوای لوله ها هوادهی شدند و ۰/۵ میلی لیتر کلروفرم/متانول به هر یک اضافه شد.

**اندازه گیری تری آسیل گلیسرول سلولی:** تری آسیل گلیسرول سلولی طبق روش پیشنهادی Neri and Frings اندازه گیری شد (۲۵). در این روش با استفاده از ایزوپروپانول، محلول صابونی‌کننده، محلول پریدات و معرف استیل استن جذب نوری نمونه‌ها در ۴۱۰ نانومتر در مقابل لوله شاهد قرائت شد.

**اندازه گیری دی آسیل گلیسرول سلولی:** دی آسیل گلیسرول سلولی طبق روش پیشنهادی Baldanzi و همکاران اندازه گیری شد (۲۶). پلیت های سیلیکاژل ( Thin Layer chromatography Silicagel 60 F254, Merck) با استفاده از متانول فعال شدند. پس از لکه گذاری پلیت در تانک حاوی حلال قرار داده شد و در نهایت رنگ شد. با استفاده از نرم افزار Power Scan 2012 لکه های تشکیل شده از هر گروه، در مقابل لکه مشخص حاصل از استاندارد دی آسیل گلیسرول کمی شدند.

**اندازه گیری پروتئین تام:** براساس روش پیشنهادی Bradford پروتئین سلولی اندازه گیری شد (۲۷). در این روش با استفاده از معرف Bradford و استانداردهای تهیه شده از BSA ، میزان پروتئین سلولی در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

**ارزیابی DNA Fragmentation سلولی:** DNA Fragmentationسلولی طبق روش پیشنهادی Sandau ارزیابی شد (۲۸). سلولهای هر چاهک به میکروتیوب مجزا منتقل شد و هر چاهک با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر Lysis شسته شد و به سلولهای موجود در میکروتیوب مربوطه اضافه شد و در دمای ۴ °C قرار داده شد. مایع رویی(s)، از پلت (p) جدا شد و در میکروتیوب دیگری ریخته شد و در هر دو، تری کلرواستیک اسید (Trichloroacetic acid:TCA) اضافه شد و در دمای ۴ ° C 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 ۹۰ °C قرار گرفت. در نهایت Diphenylamine (DPA) reagent به آنها اضافه شد و ۲۴-۱۲ ساعت بعد، OD مربوط به s و p در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

$$\text{DNA Fragmentation \%} = (\text{OD s} / (\text{OD p} + \text{OD s})) \times ۱۰۰$$

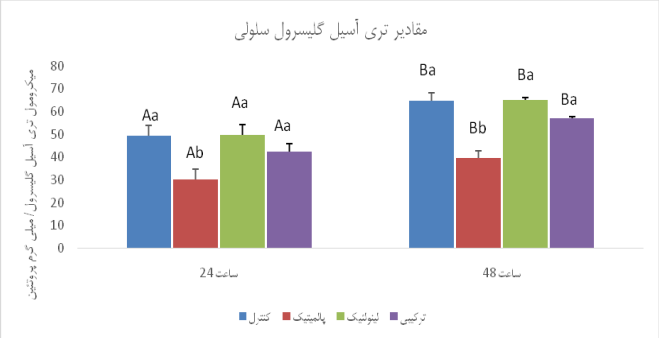
**ارزیابی زنده مانی سلول:** زنده مانی سلولی طبق روش پیشنهادی Pienata and Lehr و با روش رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد (۲۹).

داده های موجود با نرم افزار Sigma Stat-v3.5، با آزمون آماری One-way ANOVA بین گروه های مختلف و آزمون آماری T-Test در یک گروه در دو زمان ۲۴ و ۴۸ تجزیه و تحلیل شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

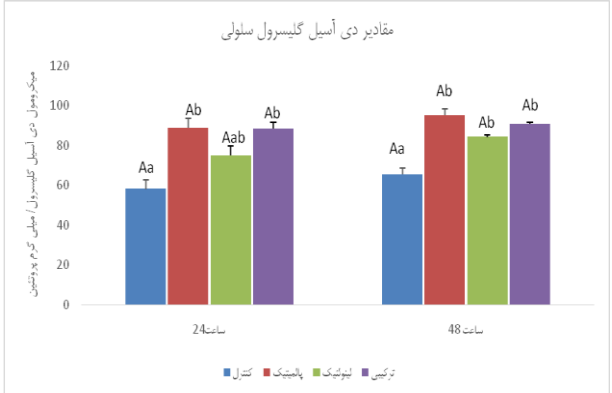
**تری آسیل گلیسرول سلولی:** تری آسیل گلیسرول سلولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، درگروه اسید پالمیتیک، کمتر از گروههای دیگر بود ($p<۰/۰۰۴$). همچنین با اضافه کردن اسیدلینولئیک به اسیدپالمیتیک در گروه ترکیبی، میزان تری آسیل گلیسرول این گروه نیز نسبت به گروه اسیدپالمیتیک افزایش معنی داری یافت ($p<۰/۰۲$)، طوری که با میزان تری آسیل گلیسرول در گروه کنترل و گروه اسیدلینولئیک اختلاف آماری نداشت ($p>۰/۰۵$; نمودار ۱). میزان تری آسیل گلیسرول سلولی در گروه کنترل، اسیدپالمیتیک، اسیدلینولئیک و ترکیبی به ترتیب، در زمان ۴۸ ساعت (۶۴/۶۸، ۳۹/۴۸، ۶۵/۰۴و ۵۶/۹۷ میکرومول/میلی گرم پروتئین) بود که نسبت به گروه مشابه در زمان ۲۴ ساعت (۴۹/۳۰، ۳۰، ۴۹/۵۵و ۴۲/۴۰ میکرومول/میلی گرم پروتئین) افزایش معنی داری را نشان داد ($p<۰/۰۳$; نمودار۱).

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]




**نمودار۱. مقادیر تری آسیل گلیسرول سلولی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت**

**دی آسیل گلیسرول سلولی:** میزان دی آسیل گلیسرول سلولی بر اساس میکرومول/میلی‌گرم پروتئین در زمان ۲۴ ساعت در گروه کنترل کمترین (۵۸/۰۹ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) و در گروه اسیدپالمیتیک (۸۸/۶۳ میکرومول/میلی گرم پروتئین) بیشترین بود. همچنین میزان دی آسیل گلیسرول سلولی گروه اسیدلینولئیک (۷۴/۸۸) بیشتر از گروه کنترل و کمتر از گروه اسیدپالمیتیک (۸۸/۶۳ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) و گروه ترکیبی (۸۸/۳۱ میکرومول/میلی گرم پروتئین) بود، اما با هیچکدام اختلاف معنی داری نداشت ($p>0/05$). میزان دی آسیل گلیسرول گروه ترکیبی نیز، بین میزان دی آسیل گلیسرول گروه اسیدپالمیتیک و گروه اسیدلینولئیک قرار داشت که با هیچکدام اختلاف معنی داری نداشت. در زمان ۴۸ ساعت، فقط میزان دی آسیل گلیسرول سلولی گروه کنترل (۶۵/۳۹ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) با بقیه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. در این زمان، میزان دی آسیل گلیسرول گروه اسیدپالمیتیک (۹۵/۲۱ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه ترکیبی (۹۰/۷۸ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) و گروه اسیدلینولئیک (۸۴/۱۶ میکرومول/میلی‌گرم پروتئین) بیشتر بود، ولی با هیچ یک از گروه های مذکور، اختلاف معنی داری نداشت (نمودار ۲). دی آسیل گلیسرول سلولی، در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسیدلینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش اندکی یافت که از نظر آماری معنی دار نبود (نمودار ۲).



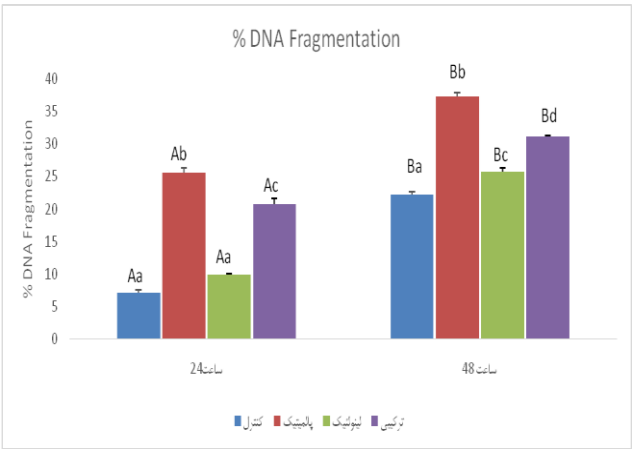

**نمودار۲. مقادیر دی آسیل گلیسرول سلولی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت**

**DNA fragmentation:** در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، اسیدپالمیتیک، درصد DNA fragmentation را در مقایسه با سایر گروه‌ها، افزایش داد ($p<0/001$)، در حالیکه با اضافه کردن اسیدلینولئیک به اسیدپالمیتیک (گروه ترکیبی)، درصد DNA fragmentation در مقایسه با گروه اسیدپالمیتیک به ترتیب در دو زمان مذکور، حدود ۵ و ۶ درصد کاهش یافت ($p<0/001$). برخلاف زمان ۲۴ ساعت، که درصد DNA fragmentation بین گروه کنترل و گروه اسیدلینولئیک به ترتیب ۷/۹ و ۹/۹۵ بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت، در زمان ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۲/۲۵ و ۲۵/۷۵ بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/001$;نمودار۳). درصد DNA fragmentation، در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسیدلینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش معنی داری یافت ($p<0/001$; نمودار ۳).

**زنده مانی سلولی:** درصد زنده مانی سلولها، در گروه‌های درمانی با اسید پالمیتیک و اسیدلینولئیک در زمان ۴۸ ساعت به ترتیب ۷۱/۲۵ و ۸۳/۱۵ بود که نسبت به زمان ۲۴ ساعت که به ترتیب ۷۹/۲۵ و ۸۸/۱۵ بود، کاهش معنی داری یافت ($p=0/003$)، اما این کاهش در گروه کنترل و گروه ترکیبی معنی دار نبود (نمودار ۴).

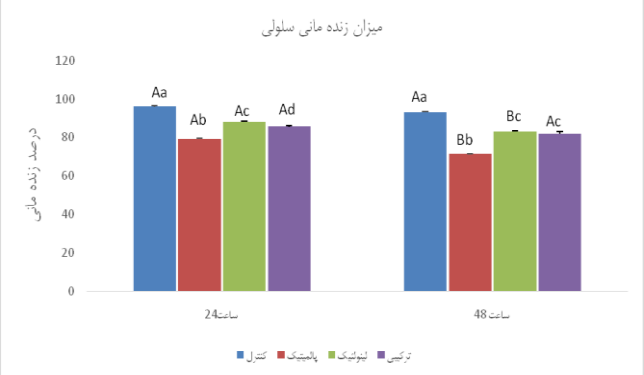
درصد زنده مانی سلولی، در گروه اسیدپالمیتیک، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سه گروه دیگر، دارای کمترین مقدار بود ($p<0/01$). در زمان های مذکور، درصد سلول های زنده در گروه ترکیبی به ترتیب ۸۵/۵ و ۸۱/۷۷ بود که بیشتر از گروه اسیدپالمیتیک ($p<0/01$) و در گروه کنترل بیشتر از گروه اسیدلینولئیک ($p<0/001$) مشاهده شدند. درصد زنده مانی سلولی گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت کمتر از گروه اسیدلینولئیک بود، اما این اختلاف فقط در زمان ۲۴ ساعت از نظر آماری معنی دار بود ($p<0/02$; نمودار۴).

**پروتئین تام:** میزان پروتئین درسلولهای عضلانی قلب رت بالغ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون درگروه های کنترل و درمانی با اسید پالمیتیک، اسیدلینولئیک و اسیدلینولئیک+اسیدپالمیتیک به ترتیب ۲/۲۷±۰/۲۷، ۲/۷۲±۰/۰۶، ۲/۰۷±۰/۱۹ و ۲/۳۷±۰/۰۵ میکروگرم/میلی لیتر می باشد.




**نمودار۳. درصد DNA fragmentation در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت**

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]




**نمودار۴. درصد زنده مانی در کشت اولیه سلول های عضلات قلبی موش صحرایی بالغ در گروه های کنترل، درمانی با اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و گروه ترکیبی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت**

a ،b و c اختلاف آماری را بین گروه ها (کنترل با درمانی) در یک زمان مشخص (۲۴ یا ۴۸ ساعت) نشان می دهند و A و B اختلاف آماری را در هر گروه (کنترل یا درمانی) در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۴۸ ساعت نشان می دهند و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، تجویز همزمان اسیدلینولئیک با اسید پالمیتیک در سلول های قلبی، منجر به افزایش معنی دار میزان تری آسیل گلیسرول در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت شد. اثرات محافظتی اسیدهای چرب غیر اشباع در جلوگیری از لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسید پالمیتیک به دلیل تبدیل پالمیتات به تری آسیل گلیسرول می باشد (۳۰). در مطالعات مشابه دیگر نیز نشان داده شد که اسیدهای چرب غیراشباع منجر به تشکیل قطرات لیپید در سیتوزول سلولهای C2C12 می شوند، درحالیکه اسیدهای چرب اشباع به تنهایی منجر به شکل گیری این قطرات لیپیدی نمی شوند (۱۷). اثر بیولوژیکی تجمع تری آسیل گلیسرول روی لیپوتوکسیسیتی ناشی از اسیدپالمیتیک بحث برانگیز می باشد (۳۱). تجمع تری آسیل گلیسرول در سلول های بتای پانکراس در ارتباط نزدیک با اختلال ترشح انسولین می باشد (۳۱). در مقابل گزارش شده است که اسیدهای چرب که توانایی بالا در سنتز تری آسیل گلیسرول دارند، در پیشگیری از آپاپتوزیس وابسته به اسیدپالمیتیک به وسیله تجزیه اسیدپالمیتیک به ذخایر تری آسیل گلیسرول شرکت می کنند(۳۲). Cnop و همکاران نشان دادند که رابطه معکوسی میان درصد سلولهای بتای مرده پانکراس و محتوای تری آسیل گلیسرول سلولی شان وجود دارد (۳۳). همچنین گزارشاتی مبنی بر این وجود دارد که اسیدهای چرب غیراشباع، آپاپتوزیس القاشده با اسیدپالمیتیک را در سلول های غیرچربی به وسیله شرکت دادن اسیدپالمیتیک در تشکیل تری آسیل گلیسرول محافظت می کنند. این تجمع در واقع دفاع اولیه سلولی در مقابل لیپوتوکسیسیتی می باشد(۲۲). همچنین، احتمالا یکی از مکانیسم های مهار کننده اثرات نامطلوب اسید چرب اشباع توسط اسیدچرب غیراشباع کاهش تجمع پالمیتات به صورت DAG می باشد (۳۴). در مطالعه حاضر، تجویز همزمان اسیدلینولئیک با اسید پالمیتیک در سلول های قلبی، منجر به کاهش میزان دی-آسیل گلیسرول در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت شد که البته این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود.

از علائم آپاپتوزیس تقسیم شدن و تکه تکه شدن DNA می باشد (۳۵). تکه تکه شدن DNA باعث ایجاد الگوی DNA Fragmentation خواهد شد. اسیدهای چرب غیراشباع اثرات آنتاگونیزه کننده بر علیه لیپوتوکسیسیتی القا شده با اسیدهای چرب اشباع دارند (۳۶). تیمار سلول های بتای انسانی با اسیدهای چرب غیراشباع به صورت کامل از آپوپتوزیس ناشی از اسیدهای چرب اشباع پیشگیری کرد (۳۶). De Vries و همکاران گزارش کردند که تیمار ۱۶ ساعته سلولهای بطنی قلبی موش صحرایی با پالمیتات باعث القاء معنی‌دار DNA Fragmentation در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۹). هر چند که در لاین سلولی HD-60 تفاوت معنی‌داری در میزان آپاپتوز بین گروه پالمیتات و اولئات بعد از ۴۸ ساعت مشاهده نگردید (۳۷). در سلولهای هپاتوسیت موش صحرایی تیمار با اسید پالمیتیک باعث افزایش معناداری در مرگ سلولی شد (۳۸). اضافه کردن همزمان اسید لینولنیک به اسید پالمیتیک باعث جلوگیری از آپوپتوزیس ناشی از پالمیتات شد (۳۸). همچنین پالمیتات منجر به افزایش DNA Fragmentation در سلول های C2C1 در غلظت ۰/۵ میلی مولار شد (۱۷). مطالعه حاضر نیز، نشان داد که افزودن اسیدلینولئیک به اسیدپالمیتیک منجر به کاهش معنی دار DNA Fragmentation در مقایسه با گروه اسید پالمیتیک شد. زنده مانی سلولی در گروه اسیدپالمیتیک، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سه گروه دیگر، دارای کمترین مقدار بود. اما با اضافه کردن اسیدلینولئیک به اسیدپالمیتیک در زمان های مذکور، درصد سلولهای زنده بیشتر از گروه اسیدپالمیتیک بود. اسید پالمیتیک مرگ سلولی و آپاپتوزیس را القا می کند (۱۵و۱۱). آپوپتوزیس ناشی از تیمار با اسیدهای چرب اشباع در سلولهای مختلف نشان داده شده است (۱۹و۱۸). مکانیسمی که در آپاپتوز ناشی از پالمیتات در سلول قلبی نقش دارد، القاء سنتز سرآمید می باشد (۳۹). در مطالعه ای نشان داده شد که اسید اولئیک در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع، نقش محافظتی در مقابل التهاب و مرگ سلولی دارد (۴۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز همزمان اسیدلینولئیک با اسیدپالمیتیک باعث جلوگیری از بروز اثرات سمی اسید پالمیتیک بر روی سلولهای قلبی می گردد. این اولین گزارش از اثرات مفید اسیدلینولئیک در پیشگیری از لیپوتوکسیسیتی، بر روی سلولهای بطنی قلبی موش صحرایی بالغ می باشد.

## تقدیر و تشکر×

بدینوسیله از گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و دانشگاه تهران تقدیر و تشکر می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]

# Palmitic Acid-Induced Toxicity Reduction Due to Production of Triacylglycerol in Cardiac Muscle Cells by Linoleic Acid

**E. Zadeh Hashem (PhD)[1*], F. Panahandeh (MSc)[2], MK. Koohi (PhD)[3]**

1.Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R.Iran
2.Department of Biochemistry, Payame Noor University Branch of Tehran-Shargh, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, I.R.Iran

**J Babol Univ Med Sci; 18(7); Jul 2016; PP: 34-40**
**Received: Jan 25th 2016, Revised: Apr 18th 2016, Accepted: Jun 1th 2016**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Lipotoxicity-induced cardiovascular diseases are increasing significantly in human populations. The effect of linoleic acid in reducing lipotoxicity of cardiac muscle cells was investigated in this study.

**METHODS:** In this empirical study, ventricular muscle cells from the hearts of five adult rats were cultured in 24-well plates. They were randomly treated in four groups including one control group (0.5 mM bovine serum albumin (BSA)) and three treatment groups treated with palmitic acid (0.5 mM), linoleic acid (0.25 mM) and a combination of linoleic acid and palmitic acid (0.25 mM + 0.5 mM). Wells in each row of plates were dedicated to one group. Level of cellular triacylglycerol, cellular diacylglycerol, DNA Fragmentation and survival rate was evaluated 24 and 48 hours after culturing. Each two wells belonging to each group were used to evaluate every factor and all the steps were repeated three times.

**FINDINGS:** Compared with palmitic acid treatment alone, adding linoleic acid to palmitic acid decreased the level of DNA Fragmentation by 4.65% and 6.15% ($p<0.001$) and decreased cellular diacylglycerol content by 0.36% and 4.88% ($p>0.05$). It also increased the level of cellular triacylglycerol by 40% and 44% ($p<0.03$) and increased cellular survival by 6.25% and 10.52% ($p<0.01$), respectively 24 and 48 hours after cultivation.

**CONCLUSION:** Results of the study revealed that linoleic acid reduces the palmitic acid-induced toxicity by producing triacylglycerol.

**KEY WORDS:** *Linoleic Acid, Lipotoxicity, Palmitic Acid, Rat Cardiac Muscle, Triacylglycerol, Diacylglycerol.*

**Please cite this article as follows:**

Zadeh Hashem E, Panahandeh F, Koohi MK. Palmitic Acid-Induced Toxicity Reduction Due to Production of Triacylglycerol in Cardiac Muscle Cells by Linoleic Acid. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(7):34-40

***Corresponding author: E. Zadeh Hashem (PhD)**
**Address:** Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R.Iran
**Tel:** +98 44 31942668
**E-mail:** e.zadehhashem@urmia.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]

## References

1.Augustus A, KakoY, Goldberg I. Routes of FA delivery to cardiac muscle : modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derrived FA. Am J physiol Endo crinol Metasb. 2003; 284(2):331-9.

2.Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani-Dehkordi F .Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effect of Chronic Administration of Hesperetin in Diabetic Rats. J Babol Univ Med Sci. 2010; 12(4): 21-6.[In Persian]

3.Fallahi F, Roghani M, Bagheri A. Time-dependent hypoglycemic and hypolipidemic effect of Allium ascalonicum L. feeding in diabetic rats. J Babol Univ Med Sci. 2010; 12(1): 16-23.[In Persian].

4. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M, Ashrafi K. The Effect of Hydroalcoholic Extract of Allium Latifolium on the Liver Phosphatidate Phosphatase and Serum Lipid Profile in Hyperlipidemic Rats. J Babol Univ Med Sci. 2013; 15(4): 37-46.[In Persian].

5.Adam R, Wende E. Lipotoxicity in the heart. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - MOL CELL BIOL L Journal . 2010; 1801(3); 266–71.

6.Jennifer L, Peura E, Jean S. Lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle. Heart Metabolism. 2006; 30: 4-6.

7.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.

8.Zamani M, Katebi M, Hassanshahi J,Zamani F, Soleimani M. Effect of Olive Oil on Brain Temporal Cortex Following Ischemia-Reperfusion. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(5):49-55.[In Persian].

9.Nolan CJ Larter CZ. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it?. J Gastroenterol Hepatol. 2009; 24(5): 703-6.

10.Yamasaki M, Chujo H, Nou S, Tachibana H, Yamada K. Alleviation of the cytotoxic activity induced by trans10, cis12-conjugated linoleic acid in rat hepatoma dRLh-84 cells by oleic or palmitoleic acid. Cancer Lett. 2003; 196(2): 187–96.

11.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.

12. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L: Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(6):1096–05.

13.Cho YS, Kim CH, Kim KY, Cheon HG. Protective effects of arachidonic acid against palmitic acid-mediated lipotoxicity in HIT-T15 cells. Mol Cell Biochem. 2012; 364(1–2):19–28.

14.Rockenfeller P, Ring J, Muschett V, Beranek A, Buettner S, Carmona-Gutierrez D, et al. Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis. Cell Cycle (Georgetown, Tex). 2010;9(14):2836–42.

15.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.

16.Almaguel FG, Liu JW, Pacheco FJ, Casiano CA Leon MD. Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. J Neurosci Res. 2009; 87(5):1207–18.

17. Cheon HG and 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.

18.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(5):830–40.

19.De Vries JE, Vork MM, Roemen THM, 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.

20.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.

21.Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009;12(2):110–16.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]

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 (Lond). 2011;120(5):195-206.
23.Piper HM. Cell culture techniques in heart and vessel research. Springer; 1990.p.158-77.
24.Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959; 37(8): 911-7.
25.Neri BP, Frings CS. Improved method for determination of triglyceride in serum. Clin Chem. 1973; 19(10): 1201-2.
26.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(6): 1059-68.
27.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.
28.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.
29.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.
30.Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the Heart. Curr Hypertens Rep. 2005;7(6):412–7.
31. 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.
32.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.
33.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.
34.Marotta M, Roberts M, Noe V, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001; 280(2):229-37.
35.Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. Am J Pathol. 1995; 146: 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.Healy DA, Watson RW, Newsholme P. 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(2): 171-9.
38.Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J.. Effect of α-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. Lipids Health Dis. 2011 Jul 25;10:122.
39.Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;279(5): 2124–32.
40.Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. Br J Nutr. 2009;102(11):1557-63.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.5.1 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.7.34 ]