

## پاسخ متفاوت سلولهای قلبی به اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع

دکتر ایرج خدادادی\*، دکتر آلفرد تامسر\*\*

دریافت: ۸۵/۳/۲ ، پذیرش: ۸۵/۱۲/۱۴

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** امروزه نقش چربیهای غذایی در شکل گیری بیماریهای قلبی-عروقی مورد قبول عموم پژوهشگران بوده و مکانیسم اثر آنها از طریق تنظیم بیان ژنها طی مرحله رونویسی به اثبات رسیده است. در این پژوهش به منظور مطالعه اثر این ترکیبات بر میزان رونویسی ژنها در سلولهای قلبی رده سلولی P19CL6 مورد استفاده قرار گرفت و اثر اسیدهای چرب و کلوپیرات بر میزان رونویسی برخی ژنهای مرتبط با متابولیسم چربیها از قبیل H-FABP, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  و PPAR $\gamma$  بر بیان گلوبال ژنهای (transcriptome) سلولهای قلبی با استفاده از روش cDNA microarray سنجیده شد.

**روش کار:** پس از کشت سلولها با اسیدهای چرب یا کلوپیرات، RNA سلولها استخراج و میزان بیان ژنهای H-FABP و PPAR( $\alpha, \beta, \gamma$ ) به روش RT-PCR سنجیده شد. همچنین بیان گلوبال ژنی سلولهای کشت شده به روش microarray مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** اسیدهای چرب بصورت معناداری موجب افزایش PPAR $\alpha$  و PPAR $\gamma$  در سلولهای P19CL6 گردیدند. از سوی دیگر نتایج حاصل از میکروآرای (microarray) نشان داد که اثرات لینولئیک و لینولنیک اسید و کلوپیرات مشابه هم اما متفاوت از اثر پالمیتیک و اولئیک اسید است.

**نتیجه نهائی:** این یافته ها نشانگر آن است که پاسخ سلولها به اسیدهای چرب غیر اشباع متفاوت از پاسخ مربوط به اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه می باشد.

**کلید واژه ها:** اسید چرب / ژن / کاردیومیوسیت / میکروآرای

### مقدمه:

و دیگر چربیهای موجود در مواد غذایی نه تنها از نظر تغذیه ای حائز اهمیت هستند بلکه با اتصال به فاکتورهای رونویسی در هسته سلولی موجب تنظیم مثبت و یا منفی در بیان ژنهایی می گردند که اغلب آنها پروتئینهایی را که در متابولیسم اسیدهای چرب و یا انتقال درون سلولی آنها، از قبیل پروتئین قلبی متصل شونده به اسید چرب (H-FABP)، ایفای نقش می کنند حاصل می نمایند (۷-۵). در همین راستا و بمنظور بررسی اثر اسیدهای چرب و فیبراتها بر سطح بیان ژنها مدل‌های آزمایشگاهی متعددی نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱-۸). رده سلولی P19CL6 بکار رفته در این پژوهش زیر شاخه ای از سلولهای P19 جنینی موش است

امروزه نقش اسیدهای چرب اشباع (SFA; saturated fatty acid) غذایی در گسترش بیماریهای قلبی-عروقی به اثبات رسیده است در حالی که اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA; polyunsaturated fatty acid) به عنوان عوامل بازدارنده بیماری شناخته می شوند (۴-۱). در واقع بسیاری از اثرات پیشگیرانه اسیدهای چرب غیر اشباع بر پیشرفت بیماریهای قلبی - عروقی با تنظیم بیان ژنها در طی مرحله رونویسی واز طریق کنترل غلظت و فعالیت فاکتورهای رونویسی مانند PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  و sterol regulatory element binding protein (SREBP) و حاصل می گردد (۷-۵). به عبارت دیگر اسیدهای چرب

\* استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (khodadadi@umsha.ac.ir)

\*\* استاد گروه تغذیه دانشکده زیست پزشکی و علوم مولکولی دانشگاه ساری انگلستان

شرکت Qiagen Ltd. (Crawley, UK) و لوازم یکبار مصرف کشت سلولی از Nunclon Products (Roskilde, Denmark) تهیه شد.

کشت سلولی: سلولهای P19CL6 خریداری شده (Riken Cell Bank; Ibaraki, Japan) در محیط  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰٪ FBS و پنی سیلین-استرپتومایسین (۱٪) کشت داده شدند (۱۲). سپس بمنظور تمایز به سلولهای کاردیومیوسیت، بمدت ۱۴ روز در محیط کشت حاوی DMSO ۱٪ و با دانسیته  $2 \times 10^6$  سلول در هر  $150 \text{ cm}^2$  کشت داده شده و پس از آن بمدت ۲۴ ساعت در محیطی عاری از FBS قرار گرفتند. در ادامه سلولها بمدت ۲۴ ساعت یکی از محیطهای کشت حاوی (الف) سرم آلبومین گاوی (BSA) بعنوان ناقل (BSA ۱۵ mM، ۰)، (ب) کمپلکس اسید چرب-BSA (BSA ۴ mM FA) (ج) کمپلکس کلو فیبرات-BSA (BSA ۱۵ mM / ۴ mM FA) را دریافت کردند. استخراج و تخلیص RNA: بمنظور استخراج RNA تام، سلولها با افزایش مستقیم معرف Trizol (۱ ml) بازای هر  $10 \text{ cm}^2$  از سطح کشت) لیز شده و هرگونه ناخالصی احتمالی از منشاء DNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده زدوده شد. با اینهمه بمنظور دستیابی به درجه خلوص مورد نیاز آزمایشات microarray، نمونه های حاصله با استفاده از ستونهای RNasy MinElute Cleanup مجدداً تخلیص و درجه خلوص و غلظت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, USA) در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نسبیتی از A260/A280 معادل ۲-۱/۸ بعنوان محدوده خلوص قابل قبول RNA در نظر گرفته شد (۱۵، ۱۶).

تعیین مقدار بیان ژنها: میزان رونویسی ژنها از طریق سنجش مقدار mRNA مربوطه بروش RT-PCR تعیین گردید و در برخی مواقع به دلیل مقدار بسیار پایین mRNA، سطح محصولات RT-PCR با اجرای PCR ثانویه (nested PCR) تا حصول مقادیر قابل اندازه گیری تر افزایش داده شد (۱۷، ۱۸). پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز هر دو مرحله با استفاده از نرم افزار Primer-3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) و بر اساس توالی ژن مورد نظر طراحی گردید. برای اندازه گیری

که می تواند در مجاورت دی متیل سولفوکسید (DMSO) بصورت مؤثری به سلولهای قلبی کاردیومیوسیت تمایز یابد (۱۲) و بر اساس اثر اسیدهای چرب و فیبراتها بر دیگر مدل‌های قلبی بنظر می رسد که این ترکیبات در سلولهای P19CL6 نیز بر مقدار mRNA ژنهای مرتبط با متابولیسم چربیها از قبیل PPAR $\alpha$ ، PPAR $\beta$ ، PPAR $\gamma$ ، H-FABP، همچنین از آنجا که اثر اسیدهای چرب به طول زنجیره و درجه اشباع شدگی آن بستگی دارد (۱۳، ۱۴) پیش بینی می گردد که اسیدهای چرب مختلف اثر متمایزی را بر بیان ژنهای یاد شده داشته باشند. علاوه بر این بمنظور دستیابی به تصویری جامع تر از تاثیر اسیدهای چرب و فیبراتها بر بیان ژنها، اثر این ترکیبات بر بیان گلوبال ژنهای سلولهای P19CL6 نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بنابراین هدف از این پژوهش تعیین اثر اسیدهای چرب شامل پالمیتیک (اشباع شده) (PA)، اولئیک (با یک پیوند غیر اشباع) (OA)، لینولئیک (LA; n-6 PUFA) و آلفا-لینولئیک (ALA; n-3 PUFA) اسید و کلو فیبرات بر میزان بیان ژنها در سلولهای P19CL6 است.

### روش کار:

این پژوهش بصورت مطالعه مداخله ای - تجربی اجرا گردید. پنی سیلین - استرپتومایسین، سرم آلبومین گاوی (BSA)، پالمیتیک، اولئیک، لینولئیک و آلفا-لینولئیک اسید، کلو فیبرات و دی متیل سولفوکسید از Sigma-Aldrich Ltd. (Pool, UK) معرف Trizol، محیط کشت  $\alpha$ -MEM و FBS از Invitrogen Corporation (Paisley, UK) خریداری گردید. پودر آگاروز برای الکتروفورز و کیت nested PCR از طریق Promega Corporation (Southampton, UK) تهیه شد در حالیکه MWG (Milton Keynes, UK) پرایمرهای الیگنوکلئوتیدی را فراهم ساخت. کیت Ready-To-Go RT-PCR، اسلایدهای microarray و رنگهای فلورسانس Cy3-dCTP و Cy5-dCTP از Amersham Biosciences (Chalfont St. Giles, UK) خریداری گردید و شش شرکت Corning Life Sciences (Schiphol-Rijk, Netherlands) کیت ProntoPlus را برای آزمایشات microarray تامین نمود. همچنین کیتهای RNasy MinElute Cleanup، RNase-free DNase و MinElute PCR Purification از

سلولهای P19CL6 بمدت ۱۴ روز در حضور ۱٪ DMSO کشت داده شده و پس از آن یک روز در محیطی عاری از سرم (FBS) قرار گرفتند. سلولها سپس بمدت ۲۴ ساعت با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات انکوبه شده و RNA تام آنها استخراج گردید. زنجیره های cDNA با استفاده از mRNA موجود در RNA تام سلولی سنتز و مطابق طرح مقایسه ای حلقه مانند ابتدا با رنگهای فلورسانس نشاندار شده و پس از تخلیص cDNA بر روی اسلایدها هیبرید شدند (۱۵).

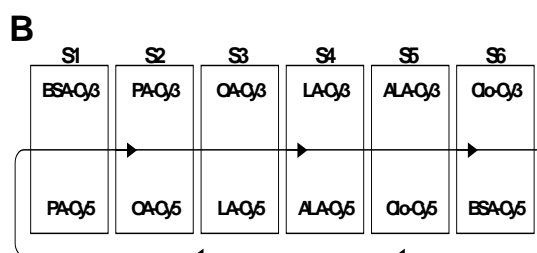
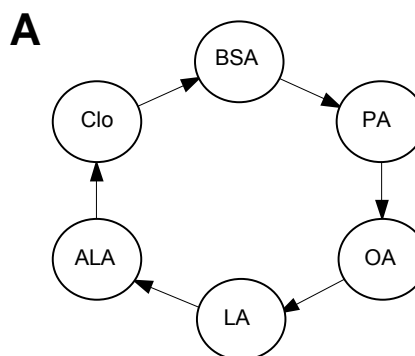
تصاویر اسلایدهای حاصله بوسیله اسکنر Affymetrix 428 (Santa Clara, USA) با نرم افزار BlueFuse (BlueGenome Ltd., Great Shalford, UK) بررسی شد و متعاقب آن اطلاعات بدست آمده به کمک نرم افزار GeneSpring-7 (Silicon Genetics, Redwood City, USA) مورد تجزیه و تحلیل بیشتر قرار گرفت. پس از آن، یافته های حاصل از مقایسه نمونه ها به کمک نرم افزار LLAMA (Live Linear Analysis of Microarray) به فرم خطی تبدیل گردید تا امکان مقایسه مستقیم بین محیط کشتهای مختلف فراهم شود (۲۱). سرانجام نتایج بدست آمده از LLAMA تحت برنامه clustering اینترنتی (http://rana.lbl.gov/) برای ایجاد یک ارتباط شجره ای بین نوع محیط کشت بکار رفته و میزان بیان ژنها بکار گرفته شد.

### نتایج:

میزان بیان mRNA مربوط به ژنهای PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  و H-FABP در سلولهای P19CL6 بروش RT-PCR اندازه گیری و بصورت نیمه-کمی نسبت به بیان ژن GAPDH محاسبه گردید. آنالیز واریانس یکطرفه برای تعیین میزان تاثیر اسیدهای چرب و کلوفیبرات بر رونویسی ژنها نشان داد که این ترکیبات اثر قابل ملاحظه ای بر بیان ژنهای H-FABP و PPAR $\beta$  ندارند، اگرچه میزان رونویسی ژنهای PPAR $\alpha$  و PPAR $\gamma$  بطور چشمگیری تحت تاثیر اسیدهای چرب افزایش یافته است، بعلاوه، مقدار mRNA دو ژن اخیر در حضور تمامی اسیدهای چرب (اما نه کلوفیبرات) به کار رفته در آزمایش افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد (جدول ۱).

نیمه-کمی میزان بیان ژنها ژل آگاروز (۲٪) محتوی ethidium bromide تهیه و محصولات PCR بروش الکتروفورز جداسازی شدند. سپس از ژلها عکسبرداری صورت گرفت و تصاویر تهیه شده به کمک نرم افزار Scion Image (http://www.scioncorp.com/) دیجیتال تبدیل و مقدار بیان ژنها نسبت به بیان ژن GAPDH (ژن کنترل) تعیین گردید (۱۹).

آزمایشات microarray: بمنظور بررسی بیان گلوبال ژنی در سلولها، اسلایدهایی که بر روی آنها probe مربوط به ۷۵۰۰ ژن مختلف نشانده شده است مورد استفاده قرار گرفت تا امکان مقایسه همزمان میزان رونویسی ۷۵۰۰ ژن مختلف در سلولهای قلبی فراهم گردد. همچنین برای ایجاد امکان مقایسه بین نمونه ها، فرم مقایسه ای حلقه مانندی (شکل ۱) با هیبریداسیون دوسویه (dual-hybridisation) و به کمک نرم افزار اینترنتی (MARIE:ExGen; http://exgen.ma.umist.ac.uk) طراحی (۲۰) و هیبریداسیون بدین شرح به انجام رسید.



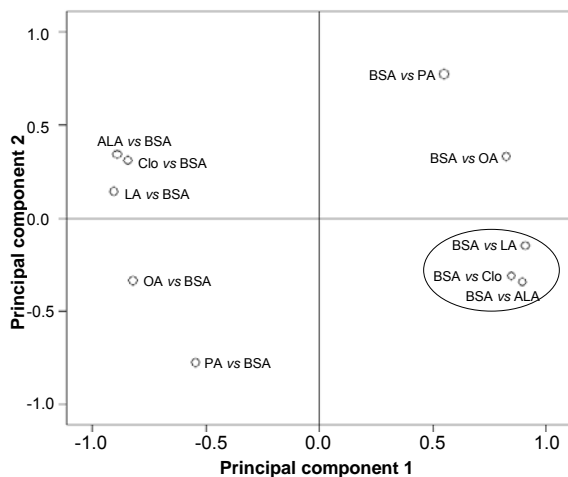
شکل ۱: طراحی حلقه مانند برای مقایسه بیان گلوبال ژنی در سلولهای کشت شده با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات بروش microarray. (A) طرح حلقه مانند برای مقایسه ۶ محیط کشت مختلف. نمونه ابتدای هر بردار با Cy3 و نمونه هدف واقع در انتهای بردار با Cy5 نشاندار شده است. (B) نمونه ها و نوع رنگ فلورسانس بکار رفته بر روی هر اسلاید را نشان می دهد. ALA: آلفا-لینولنیک اسید، BSA: سرم آلبومین گاوی، Clo: کلوفیبرات، LA: لینولنیک اسید، OA: اولئیک اسید، PA: پالمیتیک اسید.

جدول ۱: مقایسه میزان نسبی بیان ژنهای PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  و H-FABP در سلولهای P19CL6 کشت شده با اسیدهای چرب و کلوفیبرات

بیان ژنها نسبت به GAPDH (میانگین $\pm$ انحراف معیار)						
ژن	BSA	PA	OA	LA	ALA	کلوفیبرات
H-FABP	۱/۲۲ $\pm$ ۰/۱۱	۱/۱۵ $\pm$ ۰/۱۸	۱/۲۷ $\pm$ ۰/۱۲	۱/۲۲ $\pm$ ۰/۲۷	۱/۲۷ $\pm$ ۰/۲۳	۱/۲۳ $\pm$ ۰/۱۶
PPAR $\alpha$	۱/۲۷ $\pm$ ۰/۱۴	<sup>a</sup> ۱/۷۰ $\pm$ ۰/۴۰	<sup>b</sup> ۱/۸۹ $\pm$ ۰/۱۹	<sup>b</sup> ۱/۹۹ $\pm$ ۰/۱۶	<sup>b</sup> ۲/۰۴ $\pm$ ۰/۲۴	۱/۴۹ $\pm$ ۰/۱۵
PPAR $\beta$	۰/۹۷ $\pm$ ۰/۳۷	۱/۰۹ $\pm$ ۰/۱۶	۱/۱۶ $\pm$ ۰/۲۳	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۳۳	۱/۳۵ $\pm$ ۰/۱۷	۱/۱۱ $\pm$ ۰/۱۷
PPAR $\gamma$	۱/۲۱ $\pm$ ۰/۲۳	<sup>a</sup> ۱/۷۸ $\pm$ ۰/۲۱	<sup>b</sup> ۱/۹۶ $\pm$ ۰/۲۲	<sup>b</sup> ۲/۱۴ $\pm$ ۰/۲۶	<sup>a</sup> ۱/۸۰ $\pm$ ۰/۲۶	۱/۲۴ $\pm$ ۰/۲۰

سلولهای P19CL6 در حضور اسیدهای چرب یا کلوفیبرات (۰/۴ mM) کشت داده شده و میزان بیان ژنها طی سه نمونه بیولوژیکی و با استفاده از RT-PCR اندازه گیری گردید. محصولات حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز جداسازی شده و از ژل تصویربرداری بعمل آمد. پس از تخمین نیمه-کمی میزان بیان ژنها، آنالیز واریانس یکطرفه بمنظور تعیین اثر اسیدهای چرب و کلوفیبرات بر میزان رونویسی ژنها انجام گردید. یافته ها بصورت Mean $\pm$ SD و تفاوت معنادار در بیان ژنها در حضور اسیدهای چرب یا کلوفیبرات نسبت به محیط کشت حاوی BSA بصورت  $P < 0.05$  <sup>a</sup> و  $P < 0.001$  <sup>b</sup> نشان داده شده است. ALA: آلفا-لینولنیک اسید، BSA: سرم آلبومین گاوی، Clo: کلوفیبرات، LA: لینولنیک اسید، OA: اولئیک اسید، PA: پالمیتیک اسید.

نتیجه مشابهی نیز از طریق principal component analysis (PCA) بدست آمد (شکل ۳) که بیانگر این نکته است که اثرات LA، ALA و کلوفیبرات ارتباط نزدیکی با یکدیگر داشته ولی متفاوت از اثرات پالمیتیک (PA) و اولئیک اسید (OA) میباشد.



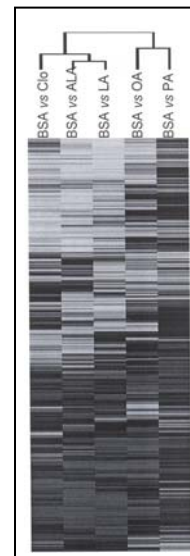
شکل ۳: نمودار principal component analysis (PCA) حاصل از مقایسه بیان گلوبال ژنها در سلولهای P19CL6 کشت شده با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات. منحنی نشانگر مشابهت اثر نمونه ها است. PC1 و PC2 به ترتیب معرف ۶۶٪ و ۱۹٪ از توتال واریانس می باشند. ALA: آلفا-لینولنیک اسید، BSA: سرم آلبومین گاوی، Clo: کلوفیبرات، LA: لینولنیک اسید، OA: اولئیک اسید، PA: پالمیتیک اسید

### بحث:

بمنظور تعیین اثر اسیدهای چرب و کلوفیبرات بر بیان ژنها در سلولهای P19CL6، ابتدا منحصراً میزان بیان mRNA برخی ژنهای وابسته به متابولیسم چربیها از قبیل PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  و H-FABP —

هر چند که این یافته ها بعنوان نتایج مقدماتی در بهترین حالت نیمه-کمی حاصل شده و تا حدودی می تواند نشانگر پاسخهای بیولوژیک سلولی باشد با اینهمه برای حصول به نتایج جامع تری از تاثیر اسیدهای چرب و کلوفیبرات بر بیان گلوبال ژنی آزمایشات microarray طراحی و به انجام رسید.

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمایشات microarray نشان داد که سطح بیان ژنها در سلولهایی که لینولنیک (LA) و یا آلفا-لینولنیک اسید (ALA) دریافت کرده اند شبیه به هم بوده و ارتباط نزدیکی را با اثر حاصل از کلوفیبرات نشان می دهد (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز شجره ای حاصل از آزمایشات microarray برای مقایسه میزان بیان گلوبال ژنها در سلولهای P19CL6 کشت شده با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات. نمونه ها بر اساس میزان شباهت در بیان گلوبال ژنها دو به دو مقایسه و به فرم شجره ای دسته بندی گردیدند. هر خط افقی بیانگر یک ژن بوده و محیط کشتهای مختلف بصورت ستونی نشان داده شده اند. ALA: آلفا-لینولنیک اسید، BSA: سرم آلبومین گاوی، Clo: کلوفیبرات، LA: لینولنیک اسید، OA: اولئیک اسید، PA: پالمیتیک اسید.

مؤثر نیست، همانگونه که این امر در سلولهای مخاطی (rat) colon و سلولهای اندوتلیال (انسان) به اثبات رسیده است (۳۱،۳۲).

اگرچه افزایش سنتز mRNA خاص PPAR $\alpha$  بوسیله کلوفیبرات در دیگر سیستمهای سلولی پیشتر به اثبات رسیده است (۳۳-۳۵) در این مطالعه تغییر قابل ملاحظه ای در میزان بیان ژن ایزوفرمهای مختلف PPAR در سلولهای P19CL6 کشت داده شده با کلوفیبرات مشاهده نگردید. عدم پاسخ دهی ژن PPAR $\alpha$  به حضور کلوفیبرات، آنگونه که در این پژوهش مشاهده شد، می تواند ناشی از زمان کوتاه انکوباسیون باشد چرا که انکوباسیونهای طولانی تر استفاده شده در دیگر مطالعات عموماً با افزایش بیان ژن PPAR $\alpha$  همراه بوده است (۳۳،۳۵،۳۶).

گذشته از بررسی اثر اسیدهای چرب و کلوفیبرات بر میزان بیان ژنهای H-FABP، PPAR $\alpha$ ، PPAR $\beta$  و PPAR $\gamma$ ، اثر این ترکیبات بر بیان گلوبال ژنی سلولهای P19CL6 نیز با استفاده از روش cDNA microarray مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در نتایج حاصل از آنالیز clustering و PCA مشهود است LA، ALA و کلوفیبرات اثر مشابهی را بر سلولها داشته اند و بنظر می رسد که OA اثری متفاوت از آنها را بر جای گذاشته اند. این مشاهدات در تایید مطالعات قبلی است که نشان می دهد اسیدهای چرب اشباع شده و غیر اشباع غذایی اثر متفاوتی را بر بیان ژنها اعمال می نمایند (۴۱-۳۷) که این امر می تواند ناشی از تفاوت در تمایل SFA و PUFA به اتصال و فعال سازی فاکتورهای رونویسی باشد (۴۲،۶). همچنین اثر کلوفیبرات بر وضعیت بیان گلوبال ژنی سلولها شباهت بسیاری به اثرات LA و ALA داشته و موید این نکته است که اثر PUFA شبیه کلوفیبرات بوده و متفاوت از اسیدهای چرب اشباع (SFA) و یا اسیدهای با یک پیوند غیر اشباع (MUFA) است.

### نتیجه نهائی:

با توجه به مشاهدات انجام شده می توان نتیجه گرفت که هر دو آزمایش RT-PCR و microarray نشان دادند که کشت سلولهای P19CL6 با اسیدهای چرب و یا کلوفیبرات بر میزان بیان ژنها مؤثر است. آزمایشات PCR اثبات نمود که تحت شرایط آزمایشی به کار رفته اسیدهای چرب بر فراوانی مقسدار PPAR $\alpha$

PCR اندازه گیری گردید و متعاقب آن سطح بیان گلوبال ژنی سلولها بروش microarray آنالیز شده و مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه اندازه گیری میزان بیان ژنها با استفاده از RT-PCR، تفاوت معناداری را در بیان نسبی ژن H-FABP در سلولهای کشت شده با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات نشان نداد. اگرچه مطالعات قبلی حاکی از آن است که اسیدهای چرب یا کلوفیبرات بیان ژن H-FABP را در کاردیومیوسیت ها افزایش می دهند (۲۳،۲۲،۹)، گروهی دیگر از مطالعات تغییری در میزان mRNA مربوط به H-FABP را حتی پس از مصرف غذای پر چرب گزارش نکرده اند (۲۵،۲۴،۱۱). گزارشات متناقض مشابهی نیز در مورد میزان بیان ژن H-FABP در سلولهای عضلات اسکلتی ارائه شده است که بیانگر عدم تغییر مؤثر در محتوای سلولی H-FABP پس از یک هفته مصرف غذای پر چرب است (۲۶،۲۴)، در حالیکه مصرف طولانی مدت (۴ هفته) بطور چشمگیری بیان این ژن را افزایش می دهد (۲۶). بنابراین عدم تغییر در میزان ژن H-FABP، آنگونه که در این پژوهش مشاهده گردید، احتمالاً بدلیل زمان نسبتاً کوتاه انکوباسیون سلولها (۲۴ ساعت) است. پس چنین استنتاج می گردد که پاسخ ژن H-FABP به حضور اسیدهای چرب یا کلوفیبرات آهسته بوده و برای مشاهده هر گونه تاثیر این ترکیبات بر ژن H-FABP احتمالاً انکوباسیونی طولانی تر از ۲۴ ساعت مورد نیاز است.

اسیدهای چرب یا کلوفیبرات تاثیر قابل ملاحظه ای بر میزان رونویسی ژن PPAR $\beta$  در سلولهای P19CL6 نداشتند در حالیکه مقدار mRNA مربوط به ژنهای PPAR $\alpha$  و PPAR $\gamma$  در حضور اسیدهای چرب و بدون در نظر گرفتن طول زنجیره و یا درجه اشباع شدگی آن افزایش معناداری یافت. بنابراین، مشاهدات انجام شده در این آزمایش در توافق با مطالعات گذشته است که نشان داد چربیهای غذایی و فیبراتها بیان ژنهای PPAR $\alpha$  و PPAR $\gamma$  را در بافتهای مختلف افزایش می دهند (۲۷-۳۰). برخلاف افزایش چشمگیر مشاهده شده در میزان PPAR $\alpha$  و PPAR $\gamma$ ، انکوباسیون سلولها با اسیدهای چرب یا کلوفیبرات تاثیری بر میزان PPAR $\beta$  نداشت. این مشاهده نیز در تایید نتایج گزارش یافته پیشین است که نشان می دهد مصرف غذای چرب بر سطح بیان ژن PPAR $\beta$

- plasmic fatty acid binding protein in rat skeletal muscles and heart. *Eur J Appl Physiol* 2002;87:193-201
10. Marti A, Vaquerizo J, Zulet MA, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. Down-regulation of heart HFABP and UCP<sub>2</sub> gene expression in diet-induced (cafeteria) obese rats. *J Physiol Biochem* 2002;58:69-74
  11. Garnier A, Poizat C, Keriell C, Cuchet P, Vork MM, de Jong YF, et al. Modulation of fatty acid-binding protein content of adult rat heart in response to chronic changes in plasma lipid levels. *Mol Cell Biochem* 1993; 123:107-112
  12. Habara-Ohkubo A. Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Struct Funct* 1996;21:101-110
  13. Ntambi JM, Bene H. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Mol Neurosci* 2001;16:273-278
  14. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 41-78
  15. Yu J, Othman MI, Farjo R, Zareparsi S, MacNee SP, Yoshida S, et al. Evaluation and optimization of procedures for target labelling and hybridization of cDNA microarrays. *Mol Vis* 2002;8:130-137
  16. Brown TA. Gene cloning and DNA analysis: An introduction, 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.
  17. Newton CA, Graham A. PCR. 2nd ed. Oxford: BIOS Scientific, 1997
  18. McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR. PCR2: A Practical Approach. New York, USA: Oxford University, 1995
  19. Ullmannova V, Haskovec C. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biol* 2003;49:211-216
  20. Vinciotti V, Khanin R, D'Alimonte D, Liu X, Cattini N, Hotchkiss G, et al. An experimental evaluation of a loop versus a reference design for two-channel microarrays. *Bioinformatics* 2005;21:492-501
  21. Wit E, McClure J. Statistics for microarrays: design, analysis, and inference. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004
  22. Chang W, Rickers-Haunerland J, Haunerland NH. Induction of cardiac FABP gene expression by long chain fatty acids in cultured rat muscle cells. *Mol Cell Biochem* 2001;221:127-132
  23. van der Lee KA, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PH, Glatz JF, Reneman RS, et al. Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res* 2000;41:41-47

PPAR $\gamma$  (اما نه H-FABP یا PPAR $\beta$ ) تاثیر دارند. از سوی دیگر آزمایشات microarray نشان داد که اثر LA، ALA از گروه اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA) و کلوفیبرات شبیه هم بوده و متمایز از اثری است که PA و OA دارند. بعلاوه بنظر می رسد که نحوه تاثیر کلوفیبرات در مقایسه با SFA شباهت بیشتری را به PUFA نشان می دهد.

### سپاسگزاری:

بدینوسیله بر خود لازم می دانیم که از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و دانشگاه علوم پزشکی همدان که امکان اجرای این پروژه را فراهم ساختند سپاسگزاریم.

### منابع:

1. Dyerberg J, Eskesen DC, Andersen PW, Astrup A, Buemann B, Christensen JH, et al. Effects of *trans*- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males. An 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 1062-1070
2. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. *Nutr Res* 2004;24:761-772
3. Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci* 2004;107:1-11
4. Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2004; 175:333-343
5. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev* 2004;62:333-339
6. Khan SA, Vanden Heuvel JP. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J Nutr Biochem* 2003;14:554-567
7. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 2001;131:1129
8. Cameron-Smith D, Burke LM, Angus DJ, Tunstall RJ, Cox GR, Bonen A, et al. A short-term high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am J Clin Nutr* 2003;77: 313-318
9. Clavel S, Farout L, Briand M, Briand Y, Jouanel P. Effect of endurance training and/or fish oil supplemented diet on cyto-

24. Veerkamp JH, van Moerkerk HT. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol Cell Biochem* 1993; 123:101-106
25. Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998;1391:287-306
26. Roepstorff C, Helge JW, Vistisen B, Kiens B. Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2004;63:239-244
27. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, et al. Regulation of PPAR $\gamma$  gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996;97:2553-2561
28. Moral R, Solanas M, Manzanares EM, Haro D, Escrich E. Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver CPT-I, mitochondrial HMG-CoA synthase and PPAR $\alpha$  mRNA expression in rats fed a low or high corn oil diet. *Int J Mol Med* 2004;14:283-287
29. Chambrier C, Bastard JP, Rieusset J, Chevillotte E, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, et al. Eicosapentaenoic acid induces mRNA expression of PPAR $\gamma$ . *Obes Res* 2002;10:518-525
30. Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:266-286
31. Delage B, Bairras C, Buaud B, Pallet V, Cassand P. A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and b-catenin. *Int J Cancer* 2005;116:839-846
32. Ye P, Hu X, Zhao Y. The increase in plasminogen activator inhibitor type-1 expression by stimulation of activators for peroxisome proliferator-activated receptors in human endothelial cells. *Chin Med Sci J* 2002;17:112-116
33. Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H, Matsui J, Yamato K, Suda T. Clofibrate, a peroxisome-proliferator, enhances reverse cholesterol transport through cytochrome P450 activation and oxysterol generation. *Tohoku J Exp Med* 2003;201:251-259
34. Akbiyik F, Ray DM, Bozkaya H, Demirpence E. Ligand- and species-dependent activation of PPAR $\alpha$ . *Cell Physiol Biochem* 2004;14:269-276
35. Amsaguine-Safir S, Bianchi A, Collet P, Huin-Schohn C, Jeanvoine A, Becuwe P, et al. Induction of the expression of the PPAR $\alpha$  by clofibrate in jerboa tissues. *Microsc Res Tech* 2003;61:185-190
36. Akbiyik F, Cinar K, Demirpence E, Ozsullu T, Tunca R, Haziroglu R, et al. Ligand-induced expression of PPAR $\alpha$  and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest* 2004;34:429-435
37. Siculella L, Sabetta S, Damiano F, Giudetti AM, Gnoni GV. Different dietary fatty acids have dissimilar effects on activity and gene expression of mitochondrial tricarboxylate carrier in rat liver. *FEBS Lett* 2004; 578: 280-284
38. Giudetti AM, Sabetta S, di Summa R, Leo M, Damiano F, Siculella L, et al. Differential effects of coconut oil- and fish oil-enriched diets on tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Lipid Res* 2003;44:2135-2141
39. Garcia-Pelayo MC, Garcia-Peregrin E, Martinez-Cayuela M. Differential translational effects of myristic acid and eicosapentaenoic acid on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Reuber H35 hepatoma cells. *Exp Biol Med* 2004; 229:781-786
40. Zhao A, Yu J, Lew JL, Huang L, Wright SD, Cui J. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol* 2004;23:519-526
41. Weigert C, Brodbeck K, Staiger H, Kausch C, Machicao F, Haring HU, et al. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2004;279:23942-23952
42. Gilde AJ, van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003;178:425-434