

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Oleate and Palmitate fatty acids on the lipid profile of HepG2 cell line

Elham Jafarpour^{1*}, Habib olah Nazem¹, Elham Bahreini², Zolfaghar Lotfi¹

¹Department of Biology, payame noor University, Tehtan, Iran.

²Department of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Correspondence

Elham Jafarpour

Email:

Elham.Jafarpour@isfahan.pnu.ac.ir

How to cite

Jafarpour, E., Nazem, H., Bahreini, E., & Lotfi, Z. (2025). Effect of Oleate and Palmitate fatty acids on the lipid profile of HepG2 cell line. *Experimental Animal Biology*, 14(54), 19-29.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disorder characterized by the accumulation of lipid droplets (LDs) in hepatocytes. This study aimed to evaluate the effects of oleate (a monounsaturated fatty acid), palmitate (a saturated fatty acid), and their combination on fat accumulation, lipid profile, and the establishment of a NAFLD cell model using the HepG2 cell line. The IC₅₀ values of each fatty acid were determined using the MTT assay. Lipid droplet content was assessed by Oil Red O staining, microscopy, and semi-quantitative analysis. Levels of triglycerides (TG), cholesterol (Ch), and HDL were measured using Pars Azmun commercial kits, and data were analyzed with GraphPad Prism software. Results showed that palmitate treatment significantly increased LD accumulation and levels of TG, Ch, and HDL (41.1 ± 1.2 , 6.3 ± 0.3 , and 0.33 ± 0.4 , respectively) compared to the control group (17.5 ± 1.2 , 3.5 ± 0.7 , and 0.27 ± 0.4 , respectively). The combination of palmitate and oleate further elevated lipid droplet accumulation and levels of TG and Ch (43.5 ± 1.5 and 6.1 ± 0.9 , respectively). Contrary to previous studies, oleate did not exhibit a protective effect in this study and instead appeared to exacerbate palmitate-induced damage. These findings highlight the need for further investigation into the molecular mechanisms underlying the combined effects of saturated and unsaturated fatty acids in NAFLD progression.

KEYWORDS

Non-alcoholic fatty liver, Lipid droplets, Lipid Profile, palmitate, oleate.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

اثر اسیدهای چرب اولئات و پالمیتات بر پروفایل لیپیدی رده سلولی HepG2

الهام جعفرپور^{۱*}، حبیب‌اله ناظم^۱، الهام بحرینی^۲، ذوالفقار لطفی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۲گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه ایران، تهران، ایران.

چکیده

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یک اختلال مزمن کبدی است که با تجمع قطرات چربی (LDs) در سلول‌های کبدی مشخص می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر اولئات (اسید چرب غیراشباع)، پالمیتات (اسید چرب اشباع) و ترکیب آن‌ها بر تجمع چربی، پروفایل لیپیدی و ایجاد مدل سلولی NAFLD در رده سلولی HepG2 انجام شد. مقادیر IC50 برای هر یک از اسیدهای چرب با استفاده از آزمون MTT تعیین گردید. محتوای قطرات چربی از طریق رنگ‌آمیزی Oil Red O، بررسی میکروسکوپی و تحلیل نیمه کمی ارزیابی شد. مقادیر تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول (Ch) و HDL با استفاده از کیت پارس‌آزمون اندازه‌گیری و داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism تحلیل شدند. نتایج نشان داد که تیمار با پالمیتات منجر به افزایش قابل توجهی در تجمع قطرات چربی و سطوح TG، Ch و HDL به ترتیب $1/2 \pm 41/1$ ، $3 \pm 6/3$ و $4 \pm 0/33$ نسبت به سلول‌های کنترل $1/2 \pm 17/5$ ، $5 \pm 3/7$ و $27 \pm 0/4$ شد. ترکیب پالمیتات و اولئات نیز باعث افزایش بیش‌تر تجمع چربی و مقادیر TG و Ch به ترتیب $5 \pm 43/5$ و $1 \pm 6/9$ گردید. برخلاف مطالعات پیشین، اولئات در این پژوهش نه تنها اثر حفاظتی نداشت، بلکه موجب تشدید اثرات آسیب‌زای پالمیتات شد. این یافته‌ها بر لزوم انجام مطالعات بیش‌تر در زمینه مکانیسم‌های مولکولی اثرات ترکیبی اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در پیشرفت NAFLD تأکید دارد.

واژه‌های کلیدی

اولئات، پالمیتات، کبد چرب غیر الکلی.

نویسنده مسئول:

الهام جعفرپور

رایانامه:

Elham.Jafarpour@isfahan.pnu.ac.ir

استناد به این مقاله:

جعفرپور، الهام؛ ناظم، حبیب‌اله؛ بحرینی، الهام و لطفی، ذوالفقار (۱۴۰۴). اثر اسیدهای چرب اولئات و پالمیتات بر پروفایل لیپیدی رده سلولی HepG2. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۴ (۵۴)، ۱۹-۲۹.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یکی از شایع‌ترین اختلالات مزمن کبدی در جهان است که با تجمع غیرطبیعی چربی در سلول‌های کبدی بدون مصرف الکل همراه می‌باشد (Mashek, 2021). شیوع جهانی این بیماری حدود ۲۵ درصد تخمین زده شده و پیش‌بینی می‌شود با روند فزاینده چاقی و سندرم متابولیک، این میزان در سال‌های آینده افزایش یابد. NAFLD می‌تواند به طیفی از آسیب‌های کبدی از جمله استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH)، فیروز، سیروز کبدی و در نهایت سرطان هپاتوسلولار منجر شود. هم‌چنین، این بیماری ارتباط تنگاتنگی با دیابت نوع ۲، دیس‌لیپیدمی، بیماری‌های قلبی عروقی و نارسایی کلیوی دارد (Ebrahimi-Mameghani et al., 2024).

این بیماری که بیش از ۵ درصد سلول‌های کبدی را درگیر می‌کند، ناشی از اختلال در تعادل بین تشکیل، حرکت و ترشح لیپوپروتئین‌ها یا اسیدهای صفاوی است و منجر به تجمع غیرطبیعی لیپیدها در هپاتوسیت‌ها می‌شود (Kumar et al., 2021). توسعه NAFLD تا حد زیادی به اختلال در تنظیم تعادل بین جذب و ذخیره‌سازی لیپیدها در سلول‌های کبدی نسبت داده می‌شود. هرگونه اختلال در این فرایندها می‌تواند منجر به تجمع بیش از حد قطرات چربی (LDs) در هپاتوسیت‌ها گردد. در این میان، نوع اسیدهای چرب موجود در رژیم غذایی نقش کلیدی در القا یا جلوگیری از این اختلال ایفا می‌کند (Calder, 2015).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد در خون، به‌ویژه اسیدهای چرب اشباع، می‌تواند به‌طور مستقیم بر عملکرد سلولی و سلامت کبد تأثیر بگذارد (Scorletti & Carr, 2022). اولئات و پالمیتات دو اسید چرب رایج در رژیم غذایی می‌باشند (Taheripak et al., 2024). پالمیتات، یک اسید چرب اشباع متداول، به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در بروز NAFLD شناخته شده است. پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که پالمیتات می‌تواند از طریق القای استرس اکسیداتیو، فعال‌سازی مسیرهای التهابی نظیر مسیر NF- κ B، اختلال در عملکرد میتوکندری و تحریک آپوپتوز سلول‌های کبدی، به پیشرفت آسیب کبدی و تجمع چربی کمک می‌کند (Lee et al., 2015). علاوه بر این، پالمیتات موجب افزایش تولید سرامیدها و دی‌آسیل‌گلیسرول‌ها می‌شود و این متابولیت‌ها نیز در ایجاد مقاومت به انسولین و پیشرفت NAFLD نقش دارند (Sarabhai et al., 2022). در مقابل، اولئات به‌عنوان

یک اسید چرب غیراشباع، خواص محافظتی قابل‌توجهی در برابر آسیب‌های ناشی از اسیدهای چرب اشباع دارد. این اسید چرب می‌تواند با افزایش فراخوانی اسیدهای چرب بداخل قطرات چربی خنثی، باعث کاهش استرس اکسیداتیو، مهار مسیرهای التهابی و بهبود متابولیسم لیپیدها می‌شود و از آسیب سلولی جلوگیری کند. شواهد حاکی از آن است که اولئات می‌تواند با مهار تجمع لیپیدهای سمی و حفاظت از عملکرد میتوکندری، اثرات مخرب پالمیتات را تعدیل نماید (Nissar et al., 2015). بنابراین، تفاوت ساختاری بین این دو اسید چرب ممکن است منجر به پاسخ‌های بیولوژیکی متمایز در سلول‌های کبدی شود، درحالی‌که اولئات می‌تواند با تنظیم متابولیسم لیپیدها به تعادل چربی و کاهش تولید ترکیبات مضر کمک کند (Yuzefovych et al., 2010). تجمع بیش از حد چربی در سلول‌های کبدی با مقاومت به انسولین، استرس اکسیداتیو و التهاب مرتبط است (Caussy et al., 2021). مطالعات نشان داده‌اند که اولئات با هدایت اسیدهای چرب آزاد به سمت لیپید دراپلت‌ها از تجمع اسید چرب آزاد در سیتوپلاسم و عوارض مخرب آن جلوگیری می‌کند و در نتیجه خطر بیماری‌های متابولیک را کاهش می‌دهد (Ricchi et al., 2009). با این حال، مکانیسم‌های دقیق این تفاوت‌ها نیازمند بررسی‌های بیش‌تر است.

با توجه به اهمیت نوع اسیدهای چرب در تنظیم متابولیسم لیپیدها و پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر پالمیتات بر پروفایل لیپیدی سلول‌های HepG2 و هم‌چنین ارزیابی تأثیر ترکیب آن با اولئات انجام شد. در این پژوهش تلاش شد تا مشخص شود آیا همراهی اولئات با پالمیتات می‌تواند از اثرات مخرب ناشی از اسید چرب اشباع بکاهد یا خیر. نتایج این پژوهش می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در توسعه NAFLD کمک کند و بینشی برای طراحی مداخلات درمانی یا تغذیه‌ای به‌منظور پیشگیری یا کاهش آسیب‌های ناشی از اسیدهای چرب اشباع در بیماری‌های کبدی فراهم نماید. علاوه بر این، یافته‌های حاصل ممکن است مسیر را برای مطالعات آینده با هدف توسعه رویکردهای هدفمند جهت بهبود سلامت کبد و مقابله با بیماری‌های متابولیک هموار سازد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های HepG2 از بانک سلول انسانی و حیوانی مرکز ذخایر

میزان مرگ سلول‌ها هم در سلول‌های تیمارنشده و هم تیمارنشده در مدت ۴۸ ساعت افزایش یافت. لذا مدت تیمار در این مطالعه ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد.

همانطور که پیش‌تر اشاره شد، در مرحله دوم، آزمون MTT براساس غلظت‌های ترکیبی از اسیدهای چرب اولئات و پالمیتات که در آزمون نخست دارای زنده‌مانی مشابه V_{50} ، V_{60} و V_{70} بودند، انجام شد. در این مرحله نیز غلظت IC_{50} (یا V_{50}) تیمار ترکیبی مشخص شد.

رنگ آمیزی Oil red O

رنگ Oil-Red-O یک لیزوکروم (رنگ چربی) محلول در چربی است که حلالیت بسیار بیش‌تری در مواد لیپیدی نسبت به حلال‌های رنگی هیدروالکلی رایج دارد. این ماده برای رنگ‌آمیزی لیپیدها، اسیدهای چرب، تری‌گلیسریدها و کلسترول در برش‌های بافتی و سلول‌های آدیپوسیت به کار می‌رود. در این رنگ‌آمیزی، قطرات لیپیدی موجود در سلول، به رنگ قرمز دیده می‌شوند. برای مشاهده قطرات چربی، از محلول Oil-Red-O 0.3% در ایزوپروپانول برای رنگ‌آمیزی سلول‌های HepG2 چرب شده و سلول‌های HepG2 چرب نشده (کنترل منفی) استفاده شد. برای این منظور، سلول‌ها پس از تثبیت با فرمالین (۱۵ دقیقه) و شست‌وشو با بافر PBS، به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ایزوپروپانول ۶۰ درصد آنکوبه شدند. ایزوپروپانول ۶۰ درصد با نرم کردن ملایم غشا و ایجاد یک محیط نیمه‌قطبی، ورود رنگ Oil Red O را به داخل سلول تسهیل کرده و ساختار لیپیدها را برای رنگ‌آمیزی دقیق حفظ می‌کند. پس از تخلیه ایزوپروپانول، محلول (۰/۳٪ Oil Red O در ایزوپروپانول) اضافه شد و سلول‌ها به مدت نیم ساعت در رنگ آنکوبه شدند. سپس، رنگ اضافه تخلیه، و چاهک‌ها شسته شدند. با استفاده از میکروسکوپ اینورت و بزرگنمایی ۴۰X، وجود قطرات قرمز رنگ چربی در سلول‌های چرب شده و سلول‌های چرب نشده (کنترل منفی) بررسی شد.

اندازه‌گیری کلسترول و تری‌گلیسرید

با استفاده از بافر لیز NP40 که یک دترجنت غیر یونی است، غشای سیتوپلاسمی سلول‌های HepG2 چرب شده با پالمیتات تخریب گردید. NP40 به طور ملایم باعث حل‌شدن غشای سلولی و تخریب آن بدون دناتوره کردن پروتئین‌ها یا استخراج چربی‌های داخل سلولی می‌شود. این ویژگی باعث می‌شود

ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند و در محیط کشت DMEM F-12 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین، در شرایط استاندارد ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.

تعیین غلظت کاربردی پالمیتات و اولئات

به منظور تعیین غلظت‌های بهینه اسیدهای چرب پالمیتات و اولئات جهت چرب کردن سلول‌های HepG2، دو مرحله آزمون MTT طراحی و اجرا گردید. در مرحله نخست، هدف تعیین بازه غلظتی مؤثر برای هر یک از اسیدهای چرب به صورت جداگانه بود. در مرحله دوم، آزمون MTT براساس غلظت‌های ترکیبی از اسیدهای چرب که در آزمون نخست دارای زنده‌مانی مشابه بودند، انجام شد.

آزمون MTT بر پایه توانایی سلول‌های زنده در تبدیل ترکیب "۳-[۴،۵-۲،۵-bis(۴-methylthiazol-2-yl)]-۲،۵-dimethylthiazol-2-yl]-۲،۵-diphenyltetrazolium bromide" به کریستال‌های فورمازان توسط آنزیم‌های اکسیدو ردوکتاز وابسته به NAD(P)H انجام می‌شود. به طور خلاصه، ۲۵۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. سلول‌های کشت شده در چاهک‌ها با شیب غلظت پالمیتات (۰/۴-۱/۸ μM) و شیب غلظت اولئات (۰/۲-۱/۶ μM) تیمار شدند پس از هر دوره آنکوباسیون، محیط کشت حذف و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با محلول ۵۰٪ MTT و ۵۰٪ محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. پس از اتمام آنکوباسیون، کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در هر چاهک با استفاده از DMSO حل شده و جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. درصد زنده‌مانی نسبی سلول‌ها از طریق مقایسه میانگین OD نمونه‌ها با کنترل منفی (سلول‌های بدون تیمار) و براساس رابطه (۱) محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۱)} = \text{درصد زنده‌مانی نسبی}$$

$$\times 100 = (\text{میانگین OD نمونه} / \text{میانگین OD کنترل منفی})$$

* غلظتی از اسید چرب که در آن درصد زنده‌مانی سلول‌های تیمارنشده نسبت به سلول‌های تیمارنشده به ۵۰ درصد کاهش یابد، به عنوان IC_{50} (یا V_{50}) در نظر گرفته شد.

در این بخش از تست MTT زنده‌مانی سلول‌ها در دو بازه زمانی آنکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته ارزیابی شد. هر چند اختلاف چندانی در IC_{50} به دست آمده در دوبازه زمانی مشاهده نشد، اما

و اولئات در V_{50} برابر با $0.4 \mu M$ و $0.8 \mu M$ بود. یک الگوی وابسته به دوز و زمان برای تمامی تیمارها مشاهده شد، به‌طوری که افزایش دوز و طولانی‌تر شدن زمان قرارگیری منجر به کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی گردید. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثرات متفاوت اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع بر بقای سلولی و القای استرس متابولیک در سلول‌های HepG2 است.

اثر پالمیتات، اولئات و ترکیب پالمیتات/اولئات بر تجمع قطرات لیپیدی

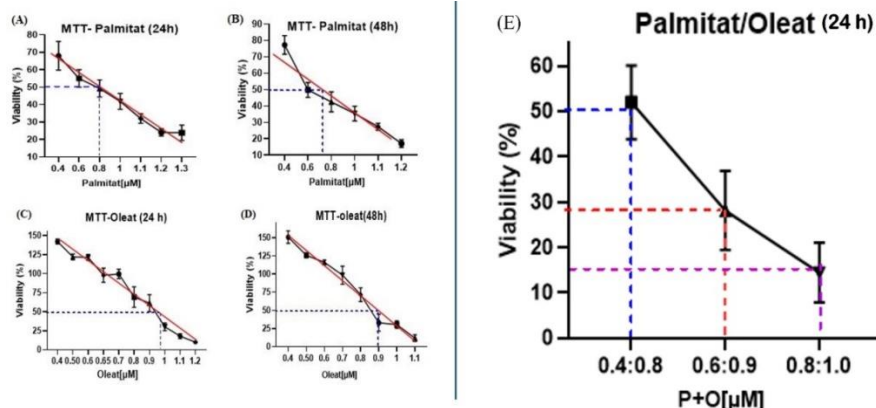
در شکل (۲) تجمع قطرات چربی در سلول‌های HepG2 را پس از تیمار با دوزهای مختلف اما غیرتوکسیک پالمیتات (P)، اولئات (O) و مخلوط پالمیتات/اولئات (P&O) به‌دنبال رنگ‌آمیزی با Oil Red O نشان می‌دهد. نواحی قرمز رنگ درون سلول‌ها بیانگر تجمع لیپیدها است که شدت آن تحت تأثیر نوع و غلظت اسید چرب قرار دارد. شکل‌های (۲-A, B, C) نشان می‌دهند که با افزایش دوز تیمار با پالمیتات (معادل غلظت‌های به‌دست‌آمده در زنده‌مانی‌های V_{50} ، V_{60} و V_{70})، تجمع قطرات چربی در سلول‌های HepG2 نیز افزایش می‌یابد. شکل‌های (۲-D, E, F) نیز اثر اولئات را در غلظت‌های تخمین زده شده در زنده‌مانی‌های V_{50} ، V_{60} و V_{70} نشان می‌دهند. با اینکه در تیمار با اولئات نیز افزایش دوز اسید چرب منجر به افزایش رنگ‌پذیری قطرات چربی در سلول‌ها شد، اما مقایسه دو اسید چرب نشان داد که در دوزهای یکسان، شدت رنگ‌پذیری در سلول‌های تیمار شده با اولئات کمتر از پالمیتات بود. این نتایج نشان می‌دهد که اولئات، به‌عنوان یک اسید چرب غیراشباع، در مقایسه با پالمیتات تأثیر ملایم‌تری بر تجمع چربی در سلول‌ها دارد.

چربی‌های ذخیره‌شده داخل سلول مثل تری‌گلیسرید و کلسترول استریفیه بدون تغییر ساختار آزاد و قابل اندازه‌گیری باشند. با آنکوباسیون ۲۰ تا ۳۰ دقیقه‌ای، سلول‌ها لیز شده و پروتئین‌های محلول از سلول‌ها استخراج گردیدند. با سانتریفوژ سوسپانسیون حاصل در $8000 g$ به مدت ۱۰ دقیقه، و جدا کردن محلول رویی، عصاره‌های سلولی جمع‌آوری و به میکروتیوب‌های جداگانه ای منتقل شدند. با اتوانالایزر (BT 3000/3500 Biotechnica) و کیت سنجش کلسترول و تری‌گلیسرید شرکت پارس آزمون (کیت CHOD-PAP برای کلسترول و GPO-PAP برای تری‌گلیسرید)، محتوای کلسترول و تری‌گلیسرید سلول‌های چرب شده و چرب نشده (کنترل منفی) اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری کیت‌های فوق‌الذکر آنیمی و به روش رنگ‌سنجی بود و در واحد میلی گرم در یک میلیون سلول گزارش شد.

نتایج

تأثیر تیمارها بر زنده‌مانی سلولی

زنده‌مانی سلول‌های HepG2 تحت تأثیر پالمیتات، اولئات و مخلوط پالمیتات/اولئات (P&O) در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). مقادیر IC_{50} برای تیمار با پالمیتات در زمان‌های ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب $0.72 \mu M$ و $0.8 \mu M$ (شکل ۱-A, B) و در مورد اولئات، مقادیر IC_{50} در همان بازه‌های زمانی به ترتیب $1 \mu M$ و $0.9 \mu M$ به دست آمد (شکل ۱-C, D). درصد زنده‌مانی سلول‌ها به‌دنبال تیمار با غلظت‌های ترکیبی V_{50} ، V_{60} و V_{70} هر دو اسید چرب به ترتیب به ۱۵٪ (V_{15})، ۳۰٪ (V_{30}) و ۵۰٪ (V_{50}) کاهش یافت (شکل ۱-E). در تیمار P&O غلظت‌های معادل دو اسید چرب پالمیتات



شکل ۱. اثر پالمیتات (A و B)، اولئات (C و D) و مخلوط پالمیتات/اولئات (O&P) بر روی زنده‌مانی سلول‌های HepG2 در فواصل ۲۴ و ۴۸ ساعته با استفاده از روش سنجش MTT

تیمارهای اولئات می‌شوند و تأثیر قوی تر پالمیتات را در القای ذخیره چربی برجسته می‌کنند.

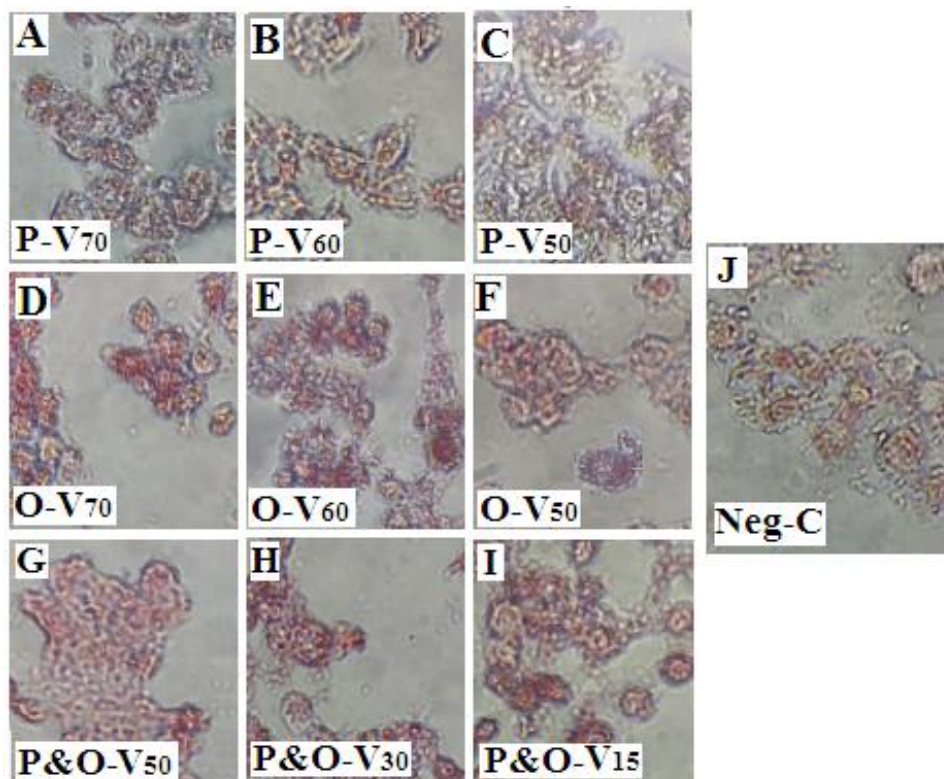
نمودار شکل (۳-B) تجمع قطرات لیپیدی را در سلول‌های تحت درمان تیمار ترکیبی P&O در دوزهای مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت این ترکیب، تجمع چربی در سلول‌ها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. بالاترین سطح قطرات لیپیدی با دوزهای بالاتر ترکیب P&O مشاهده شد که نشان‌دهنده یک اثر هم افزایی بالقوه در تقویت تجمع چربی است.

نمودار شکل (۳-C)، میزان تجمع قطرات لیپیدی را در سلول‌های کبدی تحت تیمار با پالمیتات، اولئات و ترکیب پالمیتات/اولئات در دوز IC_{50} مقایسه می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که ترکیب پالمیتات اولئات به طور معنی‌داری تجمع لیپید بیش‌تری را نسبت به تیمارهای منفرد با پالمیتات یا اولئات ایجاد می‌کند ($P < 0.0001$). این تفاوت معنی‌دار حاکی از یک تعامل هم‌افزا بین این دو اسید چرب است که ممکن است منجر به افزایش ذخیره چربی در سلول‌های کبدی شود.

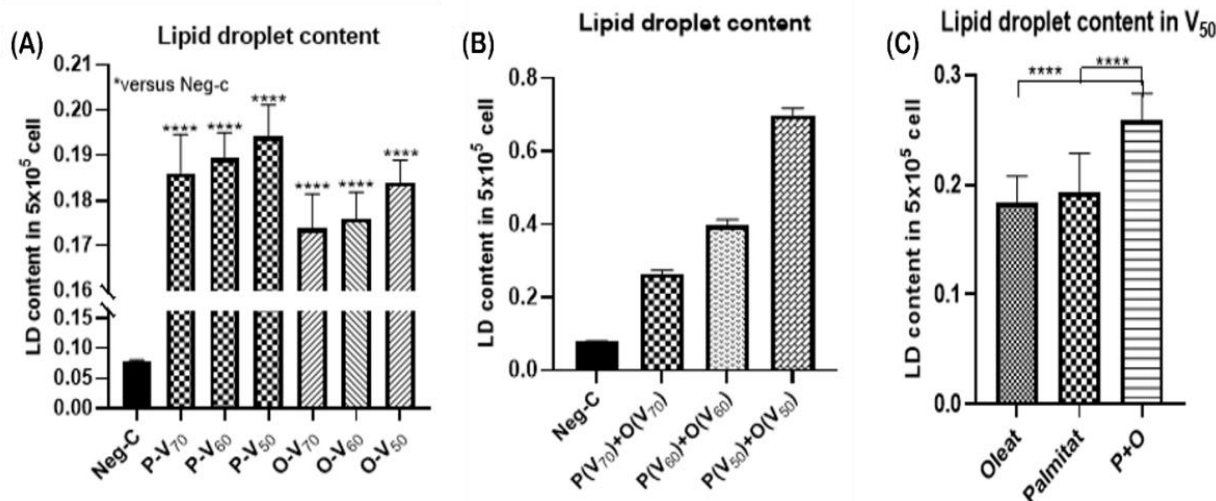
شکل‌های (۲-G, H, I) سلول‌های تیمار شده با مخلوط P&O را در غلظت‌های معادل V_{15} , V_{30} و V_{50} نشان می‌دهند. تایج حاکی از آن است که تیمار ترکیبی P&O باعث افزایش قابل توجه تجمع قطرات چربی در مقایسه با تیمارهای منفرد با پالمیتات یا اولئات شده است. در مقابل، شکل J-2 مربوط به گروه کنترل منفی، حداقل رنگ‌پذیری با رنگ Oil Red O را نشان می‌دهد که بیانگر سطح پایه و پایین تجمع چربی در سلول‌های تیمار نشده است.

اثر پالمیتات و ترکیب پالمیتات/اولئات بر پروفایل لیپیدی

نمودار شکل (۳-A) تجمع قطرات لیپیدی را در سلول‌های HepG2 تیمار شده با غلظت‌های مختلف P و O در دوزهای V_{50} ، V_{60} و V_{70} نشان می‌دهد. مقایسه با کنترل منفی (Neg-C) نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تجمع قطرات لیپیدی برای همه تیمارها است ($P < 0.0001$). مشاهده شد که تیمارهای پالمیتات در هر سه دوز منجر به تجمع بیش‌تر قطرات لیپیدی در مقایسه با



شکل ۲. رنگ‌آمیزی Oil Red O و تجمع قطرات چربی در سلول‌های HepG2 چرب شده با دوزهای مختلف پالمیتات (معادل A: V_{50} ، B: V_{60} و C: V_{70})، اولئات (معادل D: V_{50} ، E: V_{60} و F: V_{70})، تیمار ترکیبی پالمیتات و اولئات (معادل G: V_{50} ، H: V_{60} و I: V_{70}) و کنترل منفی (تیمار نشده) (J) را نشان می‌دهد. تصویر میکروسکوپی ($40\times$) از سلول‌های چربی با غلظت‌های مختلف پالمیتات (P)، اولئات (O) و پالمیتات و اولئات (O&P).



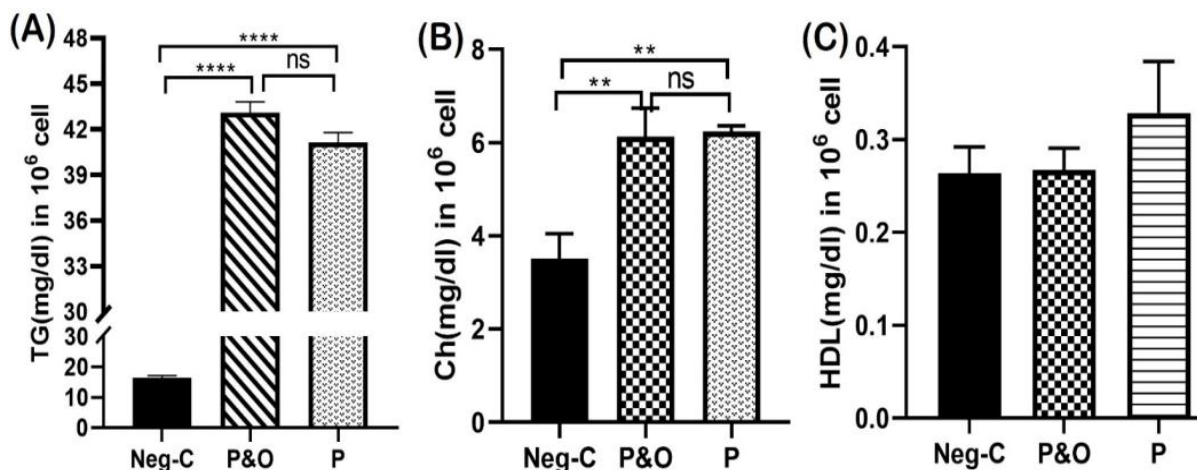
شکل ۳. نتایج کمی رنگ‌آمیزی Oil Red O را نشان می‌دهد. (A) مقایسه سطوح ذخایر قطرات چربی سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پالمیتات و اولئات (معادل زنده‌مانی‌های V_{70} و V_{60} ، V_{50})؛ (B) مقایسه سطوح ذخایر قطرات چربی سلول‌ها پس از تیمار ترکیبی با اولئات و پالمیتات (معادل زنده‌مانی‌های V_{70}/V_{70} و V_{60}/V_{60} ، V_{50}/V_{50})؛ (C) مقایسه سطوح ذخایر قطرات چربی در تیمار با غلظت‌های معادل V_{50} اولئات، پالمیتات و P&O. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. **** $P < 0.0001$ ، *** $P < 0.001$ ، ** $P < 0.01$ ، * $P < 0.05$.

گروه‌های تحت تیمار نسبت به کنترل منفی افزایش یافت. این افزایش در گروه تیمار شده با پالمیتات نسبت به ترکیب پالمیتات/اولئات بارزتر بود، اما تغییرات مشاهده‌شده در سطوح HDL از نظر آماری معنی‌دار نبودند.

این نتایج نشان می‌دهد که پالمیتات به‌عنوان یک اسید چرب اشباع، نقش برجسته‌تری در افزایش سطح لیپیدهای داخل سلولی دارد، درحالی‌که ترکیب آن با اولئات ممکن است به دلیل تعاملات متابولیکی، بر افزایش چربی‌های ذخیره‌شده در سلول‌ها اثر هم‌افزایی داشته باشد.

شکل (۴) تغییرات پروفایل لیپیدی را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های HepG2 با پالمیتات و ترکیب پالمیتات/اولئات منجر به افزایش معنی‌دار سطح تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول (Ch) نسبت به گروه کنترل منفی شد ($P < 0.05$). علاوه بر این، ترکیب پالمیتات/اولئات در مقایسه با پالمیتات به‌تنهایی تأثیر بیش‌تری بر افزایش تجمع تری‌گلیسیرید و کلسترول داشت، اگرچه این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

هم‌چنین، بررسی سطوح HDL نشان داد که این شاخص در



شکل ۴. تغییرات در پروفایل لیپیدی سلول‌های HepG2 پس از درمان با پالمیتات (P) و ترکیب پالمیتات/اولئات (P&O). (A) تری‌گلیسیرید، (B) کلسترول، (C) HDL. **** $P < 0.0001$ ، *** $P < 0.001$ ، ** $P < 0.01$ ، * $P < 0.05$.

بحث و نتیجه گیری

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، که با تجمع چربی در سلول‌های کبدی مشخص می‌شود، یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیک مزمن است (Kumar et al., 2021). چاقی و اضافه وزن از مهم‌ترین عوامل خطر در پیشرفت این بیماری محسوب می‌شوند و اختلال در پروفایل لیپیدی، به‌ویژه افزایش تری‌گلیسیرید و کلسترول، با شدت بیماری ارتباط مستقیمی دارد (Wang et al., 2024). در این مطالعه، تیمار سلول‌های HepG2 با پالمیتات، اولئات و ترکیب پالمیتات/اولئات منجر به افزایش تجمع قطرات چربی و افزایش قابل‌توجه سطح تری‌گلیسیرید و کلسترول شد.

در سلول‌های تیمار شده با پالمیتات، تجمع چربی به‌طور معناداری افزایش یافت که نشان‌دهنده تأثیر شدید این اسید چرب اشباع بر ذخیره‌سازی لیپیدها در سلول‌های کبدی است. تجمع بیش‌ازحد چربی در کبد می‌تواند به استئاتوز کبدی منجر شده و در صورت پیشرفت، باعث اختلال در عملکرد سلولی و التهاب شود (Geng et al., 2021). مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که اسیدهای چرب اشباع، از جمله پالمیتات، از طریق افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب، اثرات مخربی بر متابولیسم لیپیدها دارند (Zhao et al., 2020).

در مقابل، سلول‌های تیمار شده با اولئات، در مقایسه با پالمیتات، تجمع کم‌تری از قطرات چربی را نشان دادند. این یافته نشان می‌دهد که اولئات، به‌عنوان یک اسید چرب غیراشباع، تأثیر ملایم‌تری بر ذخیره‌سازی چربی دارد (Chen et al., 2018). به دلیل ساختار غیراشباع خود، اولئات معمولاً استرس اکسیداتیو و التهاب کم‌تری در سلول‌های کبدی ایجاد می‌کند، که می‌تواند به کاهش تجمع چربی کمک کند (Sarabhai et al., 2022; Yang et al., 2017). علاوه بر این، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که اسیدهای چرب غیراشباع می‌توانند حساسیت به انسولین را بهبود بخشند و اثرات متابولیکی مطلوب‌تری داشته باشند (Flachs et al., 2014).

جالب توجه است که ترکیب پالمیتات/اولئات (P&O) در مقایسه با پالمیتات یا اولئات به‌تنهایی، منجر به افزایش بیش‌تری در تجمع چربی شد. این یافته‌ها بیانگر یک اثر هم‌افزایی بین پالمیتات و اولئات است که به ذخیره‌سازی بیش‌تر چربی در سلول‌های کبدی منجر می‌شود. پالمیتات، از طریق تحریک سنتز

لیپید، افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب، می‌تواند محیطی ایجاد کند که در آن سلول‌ها به‌طور جبرانی چربی بیش‌تری ذخیره کنند (Yuzefovych et al., 2010). از سوی دیگر، اولئات با وجود تأثیر ملایم‌تر بر تجمع چربی، در ترکیب با پالمیتات می‌تواند مسیرهای متابولیکی لیپوژنز را فعال کند و به‌طور غیرمستقیم باعث افزایش ذخیره‌سازی چربی شود (Bionaz et al., 2012; Gurvitz & Rottensteiner, 2006).

این ترکیب احتمالاً با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ متابولیکی، از جمله گیرنده‌های فعال‌شونده با تکثیر پراکسی‌زوم (PPAR γ) که در تنظیم متابولیسم لیپیدها نقش دارند (Gurvitz & Rottensteiner, 2006; Coll et al., 2006; Wu et al., 2012) بر افزایش تجمع چربی اثر می‌گذارد. علاوه بر این، مسیر پروتئین متصل‌شونده به عنصر تنظیم‌کننده استرول 1c (SREBP-1c) که در سنتز لیپیدها نقش دارد، ممکن است تحت تأثیر این ترکیب قرار گیرد (Chu et al., 2013; Tarling et al., 2004). بنابراین، هم‌افزایی بین پالمیتات و اولئات ممکن است مکانیسم‌های تنظیمی متابولیسم لیپید را تقویت کرده و باعث افزایش قابل‌توجه ذخیره چربی در سلول‌های کبدی شود.

یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر قابل‌توجه پالمیتات و ترکیب پالمیتات/اولئات بر پروفایل لیپیدی سلول‌های HepG2 است. به‌طور خاص، درمان با پالمیتات و ترکیب پالمیتات/اولئات منجر به افزایش قابل‌توجهی در سطح تری‌گلیسیرید و کلسترول شد. علاوه بر این، مشاهده شد که ترکیب پالمیتات/اولئات نسبت به پالمیتات به‌تنهایی تأثیر بیش‌تری بر تجمع تری‌گلیسیرید و کلسترول داشت، اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند. پالمیتات ممکن است از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ SREBP-1c موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز لیپیدها، از جمله ژن‌های دخیل در سنتز تری‌گلیسیرید و کلسترول شود (Li et al., 2014). در عین‌حال، اولئات ممکن است با فعال کردن PPAR α و PPAR γ که تنظیم‌کننده‌های کلیدی در متابولیسم چربی هستند، تجمع چربی را کاهش دهد (Ye et al., 2029). با این‌حال، زمانی که پالمیتات و اولئات با هم ترکیب می‌شوند، اثرات متضاد این دو اسید چرب به نظر می‌رسد که از طریق مکانیسم‌های جبرانی در مسیرهای سیگنالینگ تقویت می‌شوند، که منجر به افزایش تجمع لیپیدها در سلول‌های HepG2 می‌شود.

اسید چرب اشباع با زنجیره‌ای خطی و بدون خمیدگی، قابلیت بالاتری برای بسته‌بندی و تجمع در سلول دارد. این تفاوت ساختاری نقش مهمی در میزان تجمع لیپید ایفا می‌کند (Eynaudi et al., 2021). مطالعه حاضر همچنین نشان داد که ترکیب پالمیتات و اولئات باعث افزایش بیش‌تر تجمع چربی نسبت به تیمارهای فردی می‌شود، که حاکی از تعامل هم‌افزایی بین این دو اسید چرب است. در نهایت، این یافته‌ها می‌توانند به درک بهتر اثرات متابولیک اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع بر روی کبد و نقش آن‌ها در پیشرفت یا پیشگیری از NAFLD کمک کنند و بینش‌های ارزشمندی را برای طراحی استراتژی‌های تغذیه‌ای و درمانی به‌منظور مدیریت اختلالات متابولیک کبدی ارائه دهند. با این حال، مطالعات بیش‌تری برای بررسی دقیق‌تر اثرات پالمیتات و اولئات بر فرایندهای مولکولی کبدی مورد نیاز است.

پیشنهادهای پژوهش‌های آینده

- ۱- بررسی مکانیسم‌های مولکولی دقیق‌تر یا استفاده از مدل‌های حیوانی برای درک بهتر اثرات این اسیدهای چرب بر استئاتوز کبدی و سایر بیماری‌های متابولیک.
- ۲- تحلیل تأثیر اسیدهای چرب بر متابولیسم چربی در مدل‌های دیابتی.
- ۳- مطالعه اثرات اسیدهای چرب بر التهاب و استرس اکسیداتیو در مدل‌های حیوانی.
- ۴- بررسی رابطه اسیدهای چرب با ریسک فاکتورها در بیماری‌های قلبی عروقی.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

در نهایت، نتایج این مطالعه تأثیرات متمایز پالمیتات و ترکیب پالمیتات/اولئات را بر سطوح HDL در سلول‌های HepG2 نشان داد. به‌طور خاص، درمان با پالمیتات به‌تنهایی منجر به افزایش سطوح HDL شد، درحالی‌که در گروهی که با ترکیب پالمیتات/اولئات درمان شدند، این مقادیر مشابه با مقادیر گروه کنترل منفی باقی ماند. اگرچه این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند، اما قابل توجه هستند. پالمیتات ممکن است از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با استرس اکسیداتیو، مانند مسیر NF- κ B فاکتور هسته‌ای کاپا-زنجیره سبک-افزایش‌دهنده سلول‌های B فعال و مسیرهای پروتئین کیناز C (PKC)، سنتز و ترشح VLDL را افزایش دهد (Fratantonio et al., 2015). با توجه به ارتباط بین VLDL با سطوح LDL و استرس اکسیداتیو در *in Vivo*، افزایش آن در این مطالعه قابل توجه است. از آنجایی که HDL دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است، افزایش آن ممکن است به دلیل مکانیسم‌های جبرانی برای مقابله با استرس اکسیداتیو باشد (Gao et al., 2006; Morgantini et al., 2011). به‌طور کلی، این یافته‌ها بینش‌های ارزشمندی را در مورد اثرات متابولیک اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع بر پروفایل لیپیدی در سلول‌های کبدی ارائه می‌دهند.

نتایج این مطالعه به‌وضوح نشان می‌دهد که مصرف بیش از حد اسیدهای چرب اشباع ممکن است به استئاتوز کبدی و آسیب سلولی منجر شود. در مقابل، تیمار با اولئات، به‌عنوان یک اسید چرب غیراشباع، باعث تجمع کم‌تری از چربی شد، که می‌تواند به دلیل ساختار مولکولی خاص آن باشد. به‌طوری‌که وجود پیوند دوگانه در اولئات باعث ایجاد خمیدگی در زنجیره کربنی آن می‌گردد و این خمیدگی، از فشردگی و استریفیکاسیون مؤثر آن در لیپید دراپلت‌ها جلوگیری می‌کند. در مقابل، پالمیتات به‌عنوان یک

منابع

- Bionaz, M., Thering, B. J., & Loores, J. J. (2012). Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: Saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. *British Journal of Nutrition*, 107(2), 179-191.
- Calder, P. C. (2015). Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 39, 18S-32S.
- Caussey, C., Aubin, A., & Loomba, R. (2021). The relationship between type 2 diabetes, NAFLD, and cardiovascular risk. *Current diabetes reports*, 21(5), 15.
- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., & Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life sciences*, 203, 291-304.

- Chu, X., Liu, L., Na, L., Lu, H., Li, S., Li, Y., & Sun, C. (2013). Sterol regulatory element-binding protein-1c mediates increase of postprandial stearic acid, a potential target for improving insulin resistance, in hyperlipidemia. *Diabetes*, 62(2), 561-571.
- Coll, T., Jové, M., Rodríguez-Calvo, R., Eyre, E., Palomer, X., Sánchez, R. M., ... & Vázquez-Carrera, M. (2006). Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor- κ B activation. *Diabetes*, 55(10), 2779-2787.
- Ebrahimi-Mameghani, M., Asghari, S., Naeini, F., Taghizadeh, M., Hamed-Shahraki, S., & Amirkhizi, F. (2024). Assessing the clinical and biochemical efficacy of alpha-lipoic acid in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 114, 106050.
- Eynaudi, A., Díaz-Castro, F., Bórquez, J. C., Bravo-Sagua, R., Parra, V., & Troncoso, R. (2021). Differential effects of oleic and palmitic acids on lipid droplet-mitochondria interaction in the hepatic cell line HepG2. *Frontiers in nutrition*, 8, 775382.
- Flachs, P., Rossmeisl, M., & Kopecky, J. (2014). The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res*, 63(Suppl 1), S93-118.
- Fratantonio, D., Speciale, A., Ferrari, D., Cristani, M., Saija, A., & Cimino, F. (2015). Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/Bach1 and NF- κ B pathways. *Toxicology letters*, 239(3), 152-160.
- Gao, H., Bryzgalova, G., Hedman, E., Khan, A., Efendic, S., Gustafsson, J. A., & Dahlman-Wright, K. (2006). Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Molecular endocrinology*, 20(6), 1287-1299.
- Geng, Y., Faber, K. N., De Meijer, V. E., Blokzijl, H., & Moshage, H. (2021). How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease?. *Hepatology international*, 15(1), 21-35.
- Gurvitz, A., & Rottensteiner, H. (2006). The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1392-1402.
- Kumar, S., Duan, Q., Wu, R., Harris, E. N., & Su, Q. (2021). Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. *Advanced drug delivery reviews*, 176, 113869.
- Lee, J. J., Lambert, J. E., Hovhannisyanyan, Y., Ramos-Roman, M. A., Trombold, J. R., Wagner, D. A., & Parks, E. J. (2015). Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *The American journal of clinical nutrition*, 101(1), 34-43.
- Li, W., Li, Y., Wang, Q., & Yang, Y. (2014). Crude extracts from *Lycium barbarum* suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation. *BioMed Research International*, 2014(1), 196198.
- Mashek, D. G. (2021). Hepatic lipid droplets: A balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD. *Molecular metabolism*, 50, 101115.
- Morgantini, C., Natali, A., Boldrini, B., Imaizumi, S., Navab, M., Fogelman, A.M., Ferrannini, E., & Reddy, S.T. (2011). Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes*, 60(10), 2617-2623.
- Nissar, A. U., Sharma, L., & Tasduq, S. A. (2015). Palmitic acid induced lipotoxicity is associated with altered lipid metabolism, enhanced CYP450 2E1 and intracellular calcium mediated ER stress in human hepatoma cells. *Toxicology Research*, 4(5), 1344-1358.
- Ricchi, M., Odoardi, M.R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L.I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., & Lonardo, A. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(5), 830-840.
- Sarabhai, T., Koliaki, C., Mastrototaro, L., Kahl, S., Pesta, D., Apostolopoulou, M., Wolkersdorfer, M., Bönner, A.C., Bobrov, P., Markgraf, D.F., & Herder, C. (2022). Dietary palmitate and oleate differently modulate insulin sensitivity in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 65(2), 301-314.
- Scorletti, E., & Carr, R. M. (2022). A new perspective on NAFLD: focusing on lipid droplets. *Journal of hepatology*, 76(4), 934-945.
- Taheripak, G., Sabeti, N., Najar, N., Razavi, Z., Saharkhiz, S., & Alipourfard, I. (2024). SIRT1 activation attenuates palmitate induced apoptosis in C2C12 muscle cells. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 354.
- Tarling, E., Salter, A., & Bennett, A. (2004). Transcriptional regulation of human SREBP-1c (sterol-regulatory-element-binding protein-1c): a key regulator of lipogenesis.
- Wang, J., Li, H., Wang, X., Shi, R., Hu, J., Zeng, X., Luo, H., Yang, P., Luo, H., Cao, Y., & Cai, X. (2024). Association between triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio and nonalcoholic fatty liver disease and liver fibrosis in American adults: an observational study from the National Health and Nutrition Examination Survey 2017–2020. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1362396.
- Wu, H. T., Chen, W., Cheng, K. C., Ku, P. M., Yeh, C. H., & Cheng, J. T. (2012). Oleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor δ to compensate insulin resistance in steatotic cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(10), 1264-1270.

- Yang, S. C., Lin, S. H., Chang, J. S., & Chien, Y. W. (2017). High fat diet with a high monounsaturated fatty acid and polyunsaturated/saturated fatty acid ratio suppresses body fat accumulation and weight gain in obese hamsters. *Nutrients*, 9(10), 1148.
- Ye, G., Gao, H., Wang, Z., Lin, Y., Liao, X., Zhang, H., Chi, Y., Zhu, H., & Dong, S. (2019). PPAR α and PPAR γ activation attenuates total free fatty acid and triglyceride accumulation in macrophages via the inhibition of Fatp1 expression. *Cell death & disease*, 10(2), 39.
- Yuzefovych, L., Wilson, G., & Racheck, L. (2010). Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(6), E1096-E1105.
- Zhao, Y. C., Zhao, G. J., Chen, Z., She, Z. G., Cai, J., & Li, H. (2020). Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging driver of hypertension. *Hypertension*, 75(2), 275-284.