مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۱، ۱۰۶-۹۹
Journal of Veterinary Research. 71,1:99-106, 2016
Original Article

مقایسه اثر اسیدهای چرب امگا-۳ دریایی و گیاهی در تصحیح مقاومت به انسولین القا شده به وسیله اسیدهای چرب اشباع در آدیپوسیت‌های کشت داده شده گاوی

مهدی اسلامی‌زاد مهدی دهقان بنادکی* مهدی گنج‌خانلو ملک شاکری
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، البرز- ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ مهر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۴ دی ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: گاوهای شیری امروزی به دلیل انتخاب ژنتیکی صورت گرفته در سال‌های گذشته به منظور تولید شیر بیشتر نسبت به گذشته به انسولین مقاومتر شده‌اند و همین امر باعث لیپولیز گسترده در بافت چربی و آزادسازی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر استریفیه به جریان خون می‌شود که سر منشأ بسیاری از ناهنجاری‌های دیگر می‌باشد. **هدف:** توانایی اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر منابع گیاهی و بلند زنجیر روغن ماهی در پیشگیری از مقاومت به انسولین در آدیپوسیت‌های کشت داده شده مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** در این آزمایش اسیدهای چرب روغن‌های مختلف صابونی شده و به منظور ایجاد ترکیب‌های مورد نظر از اسیدهای چرب با نسبت‌های مختلف باهم مخلوط شدند. ترکیب‌های مورد نظر عبارت بودند از: ۱) اسیدهای چرب کاملاً اشباع (SFA)، ۲) اسیدهای چرب اشباع + اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۶ / امگا-۳ از منابع گیاهی متوسط زنجیر با نسبت ۱ به ۱ (SFA-MC ۱:۱) و ۳) اسیدهای چرب اشباع + اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۶ / امگا-۳ از منابع دریایی بلند زنجیر با نسبت ۱ به ۱ (SFA-LC۱:۱). آدیپوسیت‌ها در حضور تیمارهای آزمایشی کشت داده شده و از اپی نفرین برای تحریک لیپولیز استفاده شد و با افزودن انسولین به همراه اپی نفرین توانایی آن در پیشگیری از لیپولیز سنجیده شد. برای تعیین شدت لیپولیز غلظت گلیسرول در محیط کشت اندازه‌گیری شد. **نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد که اسیدهای چرب اشباع مقاومت به انسولین را در آدیپوسیت‌ها القا کردند به طوری که در تیمار SFA انسولین در هیچ غلظتی از افزایش لیپولیز ناشی از اپی نفرین جلوگیری نکرد. اسیدهای چرب امگا-۳ از منبع روغن ماهی به طور مؤثری از توسعه مقاومت به انسولین در آدیپوسیت‌ها پیشگیری کرد به طوری که با افزایش غلظت انسولین در محیط کشت توانایی اپی نفرین در تحریک لیپولیز رو به کاستی نهاد. اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر از منابع گیاهی این توانایی را از خود نشان ندادند. **نتیجه گیری نهایی:** اسیدهای چرب امگا-۳ از منبع روغن ماهی حساسیت به انسولین را در آدیپوسیت‌های گاوی افزایش داد ولی اسیدهای چرب امگا-۳ منابع گیاهی این توانایی را نداشت.

واژه‌های کلیدی: روغن ماهی، مقاومت به انسولین، لیپولیز، اسیدهای چرب امگا-۳

مقدمه

هر گاوی بعد از زایمان یک دوره‌ای از تعادل منفی انرژی را تجربه می‌کند زیرا تولید شیر در این دوره با سرعت بیشتری نسبت به مصرف خوراک افزایش می‌یابد. گاوهای شیری نیز مانند بسیاری از گونه‌های دیگر، با افزایش اتکا به اسیدهای چرب غیر استریفیه موبلیزه شده از بافت چربی برای استفاده در تولید چربی شیر، با فرآیند شیردهی سازگاری پیدا می‌کنند (۱۶). افزایش اتکا به اسیدهای چرب غیر استریفیه در نشخوارکنندگان بیشتر از سایر گونه‌ها است، زیرا منابع گلوکز در این حیوانات محدود بوده و آنها برای تأمین گلوکز مورد نیاز نگهداری، آبستنی و تولید لاکتوز شیر به فرآیند گلوکونئوژنزیس وابسته هستند (۱۳). نشان داده شده است که برخی گاوهای شیری لیپولیز را خیلی بیشتر از آن چیزی که برای نگهداری و تولید شیر مورد نیاز است، افزایش می‌دهند.

اواخر دوره آبستنی با کاهش تدریجی غلظت انسولین پلاسما مشخص می‌شود (۵). این حالت همچنین با وقوع یک حالت مقاومت به انسولین در بافت‌های محیطی همراه است که تا حدودی به علت افزایش غلظت هورمون رشد می‌باشد (۱۳) که در کل باعث ضعیف‌تر شدن نقش انسولین در بدن می‌شود. شروع مقاومت به انسولین باعث صرفه جویی در گلوکز، افزایش لیپولیز در بافت چربی و افزایش دسترسی به اسیدهای چرب غیر استریفیه برای اکسیداسیون و تولید چربی شیر خواهد شد. غلظت اسیدهای چرب غیراستریفیه خون طی دو هفته آخر آبستنی به تدریج شروع به افزایش نموده و در هنگام زایمان به اوج خود می‌رسد (۱۱). در واقع گاوهای شیری امروزی در نتیجه انتخاب ژنتیکی در مقایسه با گذشته نسبت به انسولین مقاوم‌تر شده‌اند (۲۲) و همین امر باعث بیشتر شدن شدت لیپولیز و آزادسازی اسیدهای چرب به جریان خون می‌شود. در اواخر آبستنی به ویژه در هفته آخر، مصرف خوراک نیز کاهش می‌یابد و منجر به بالانس منفی انرژی در هنگام زایمان می‌شود (۵) که موبلیزه شدن هر چه بیشتر چربی‌ها را از بافت چربی را به دنبال دارد.

مطالعات صورت گرفته در حیوانات تک معده‌ای بویژه در موش، حاکی از اثرات غیر قابل انکار اسیدهای چرب بر حساسیت و پاسخ بافت‌های بدن به انسولین می‌باشند. در همین راستا، نشان داده شده است که اسیدهای چرب اشباع باعث ایجاد حالت مقاومت به انسولین می‌شوند ولی اسیدهای چرب غیر اشباع بویژه آنهایی که به دسته امگا-۳ تعلق دارند از توسعه

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲، نمابر: ۰۲۶-۳۲۲۴۶۷۵۲ Email: dehghanb@ut.ac.ir

مقاومت به انسولین پیشگیری می‌کنند. (۲۲). در این مطالعه نشان داده شد که تأثیر اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیر به مراتب قوی تر از اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر است چرا که به نظر می‌رسد اسیدهای چرب امگا-۳ کوتاه زنجیر مانند اسید لینولنیک برای اینکه تأثیری در پیشگیری از مقاومت به انسولین داشته باشند بایستی به اسیدهای چرب بلند زنجیرتر تبدیل شوند.

توانایی اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۳ در پیشگیری از مقاومت به انسولین در نشخوارکنندگان هنوز مورد سوال می‌باشد. Pires و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات تزریق داخل شیردانی روغن دانه کتان (غنی از لینولنیک اسید) بر پاسخ بدن به انسولین را با اثرات روغن پیه در گاو مقایسه کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که، طی تست تحمل گلوکز، سرعت زدودگی گلوکز از خون در گاوهای دریافت کننده روغن دانه کتان نسبت به آنهایی که روغن پیه دریافت کرده بودند بیشتر بود که نشان دهنده پاسخ بهتر بدن به انسولین در این گروه می‌باشد. در این مطالعه همچنین سرعت زدودگی اسیدهای چرب غیر استریفیه از خون در تیمار روغن دانه کتان بیشتر بود. هرچند این محققین اظهار داشتند که این اثر را نمی‌توان تنها به بهبود پاسخ بافت چربی به انسولین و کاهش سرعت لیپولیز نسبت داد و ممکن است سرعت برداشت و متابولیسم اسیدهای چرب غیر استریفیه توسط کبد افزایش یافته باشد. در یک مطالعه دیگر Mashek و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات تزریق داخل وریدی امولسیون حاصل از روغن ماهی، دانه کتان و روغن پیه را به همراه ۴ روز گرسنگی به منظور القای لیپولیز شدید در گاو باهم مقایسه کردند. نتایج آنها نشان داد که در کل دوره آزمایشی ۴ روزه بین تیمارها از لحاظ غلظت گلیسرول و اسیدهای چرب غیر استریفیه پلاسما که شاخصی از لیپولیز می‌باشند تفاوتی وجود ندارد. هرچند تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به زمان‌های خاصی نزدیک انتهای دوره آزمایشی نشان داد که گاوهایی که تیمار روغن دانه بذرک و روغن ماهی را دریافت کرده بودند در (ساعت ۵۶ و ۸۰) دارای غلظت‌های پایین تری از گلیسرول خون نسبت به گاوهای دریافت کننده روغن پیه بودند. این محققین به این نتیجه رسیدند که غلظت پایین تر گلیسرول احتمالاً به دلیل توانایی بیشتر انسولین در جلوگیری از لیپولیز در بافت چربی گاوهای دریافت کننده روغن ماهی و روغن دانه کتان می‌باشد. در این مطالعه بین روغن ماهی و روغن دانه بذرک از لحاظ شاخص‌های مقاومت به انسولین تفاوتی وجود نداشت. به طور کلی، اثرات اسیدهای چرب مختلف بر پاسخ بافت چربی نشخوارکنندگان به انسولین کمتر مورد بررسی قرار گرفته و در اندک مطالعات انجام گرفته (۱۳،۲۰) نیز به دلیل اینکه شاخص‌های دقیقی از میزان لیپولیز در بافت چربی اندازه‌گیری نشده است نتیجه گیری‌های صورت گرفته از قطعیت کافی برخوردار نیستند. بنابراین نیاز به مطالعاتی که اختصاصاً روی بافت چربی صورت گرفته و شاخص‌های دقیق‌تری از اثرات اسیدهای چرب مختلف بر عملکرد بافت چربی را اندازه گیری نمایند احساس می‌شود. هدف مطالعه حاضر تعیین توانایی اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر (منابع گیاهی) و بلند زنجیر (روغن ماهی) در پیشگیری از مقاومت به انسولین القا شده به واسطه اسیدهای چرب اشباع می‌باشد.

مواد و روش کار

اسیدهای چرب مورد نیاز برای انجام این تحقیق با استفاده از روش صابونی کردن و خالص سازی اسیدهای چرب از روغن‌های مختلف به دست آمد. برای این کار از روش Angélica و همکاران در سال ۱۹۹۸ استفاده شد. به طور خلاصه یک حجم از روغن مورد نظر به همراه دو حجم از هیدروکسید پتاسیم (۷N) و EDTA (۵mM) حل شده در الکل اتیلیک ۷۰٪ تحت اتمسفر ازت و در ۹۰°C به همراه هم زدن و با استفاده از بخار به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد تا نمک پتاسیمی اسیدهای چرب تشکیل شود. سپس محلول به دست آمده با استفاده از جریان آب، خنک شد. سپس ۰/۴ حجم از اسید کلریدریک (۱۲N) و یک حجم از هگزان به آن افزوده شد و مخلوط به دست آمده به شدت تکان داده شد تا فاز آلی حاوی اسیدهای چرب از فاز معدنی جدا شود. فاز آلی که حاوی هگزان و اسیدهای چرب حل شده در آن بود جدا و بعد از تبخیر هگزان در خلا، اسیدهای چرب خالص به دست آمد. روغن‌های مورد استفاده شامل روغن سویا، روغن آفتابگردان، روغن کانولا، روغن کتان، روغن ماهی و روغن زیتون بودند. نمونه‌های اسید چرب جداسازی شده از روغن‌های مختلف برای تعیین ترکیب آنها با استفاده از روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) به آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج ارسال شدند.

تیمارها: پس از تعیین ترکیب اسیدهای چرب استخراج شده از روغن‌های مختلف، ترکیب‌های مختلف به همراه برخی اسیدهای چرب خالص خریداری شده با نسبت‌های مختلف باهم مخلوط شدند تا تیمارهای (ترکیب‌های) مورد نظر برای افزوده شدن به محیط کشت ایجاد شوند. ترکیب اسیدهای مورد نظر شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. اسیدهای چرب کاملاً اشباع (SFA)

۲. اسیدهای چرب اشباع ۲۵٪: اسیدهای چرب یک غیراشباع ۲۵٪: اسیدهای چرب امگا-۶ + امگا-۳، ۵۰٪؛ که نسبت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ در آن ۱ به ۱ و منبع اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیر آن روغن ماهی (SFA-LC ۱:۱) بود

۳. اسیدهای چرب اشباع ۲۵٪: اسیدهای چرب یک غیراشباع ۲۵٪: اسیدهای چرب امگا-۶ + امگا-۳، ۵۰٪؛ که نسبت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ در آن ۱ به ۱ و منبع اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر آن روغن‌های گیاهی (SFA-MC ۱:۱) بود

برای تهیه پروفیل‌های از مخلوط اسیدهای چرب بدست آمده از روغن‌های مختلف و همچنین اسیدهای چرب خالص خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ آلمان استفاده شد. نحوه و مقدار مورد استفاده از

هر یک از اسیدهای چرب روغن‌های مختلف و اسیدهای چرب خالص در جدول ۲ آورده شده است.

غلظت اسـید چرب در محلول‌های تهیه شـده طوری بود که پس از اضافه شدن به محیط کشت، غلظت کل اسیدهای چرب محیط کشت به ۶۰۰ μM برسد.

اتصال اسـیدهای چرب بـه آلبومین: برای اینکه اسـیدهای چرب در محیط کشـت سـلولی از کارائی کافی برخوردار باشند بایستی به آلبومین متصل شـوند. این کار بعد از مخلوط کردن اسـیدهای چرب از روغن‌های مختلـف و حصول ترکیب‌های مورد نظر، با اسـتفاده از روش Cousin و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام گرفت. ابتدا محلول ۰/۱ نرمال هیدروکسید سـدیم تهیه شـد تا بعد از حرارت دادن این محلول تا ۷۰°C در حمام آب گرم محلول ۱۰۰mM اسیدهای چرب در هیدروکسید سدیم تهیه شود. در ظرفی دیگر در حمام آب گرم آب مقطر تا دمای ۵۵°C حرارت داده شـد تا محلول ۲/۷۵mM آلبومین در آب تهیه شـود. سپس محلول اسید چرب و آلبومین به نسبت ۱ به ۹ باهم مخلوط شدند و محلول بدست آمده به مدت ۲ دقیقه ورتکس شـد. غلظت اسیدهای چرب و آلبومین در محلول بدست آمده به ترتیب ۱۰mM و ۲/۴۷۵mM می‌باشـد. این محلول بعد از اضافه شدن به محیط کشت رقیق شده و غلظت اسیدهای چرب و آلبومین در آن به ترتیب به۶۰۰mM و ۱۵۰ تقلیل پیدا می‌کند که غلظت‌های مورد نظر می‌باشند.

نمونه‌گیری از بافت چربی گاو و جداسازی سلول‌های چربی: نمونه بافت چربی گاوی بلافاصله بعد از کشتار از ناحیه دم گاو به صورت استریل گرفته شد و پس از ضد عفونی آن در محل با استفاده از محلول بتادین آیوداین ۵٪ و سه بار شستشو در محلول ۱X PBS در داخل محلول ۱X PBS حاوی ۵٪ پنی سیلین/استرپتومایسین و ۵mg/l آمفوتریسین B به آزمایشگاه کشت بافت انتقال داده شد. در آزمایشگاه بافت دوباره ۶ بار در محلول HEPES-phosphate buffer حاوی آنتی بیوتیک‌های گفته شـده شستشو داده شد. سـپس بافت در داخل ظرف اسـتریل (میکروپلت‌های شش خانه‌ای) قرار داده شـد و به منظور قطعه قطعه کردن آن از HBSS و کلاژناز (mg/ ۱/۲۵ml به ازای هر g ۰/۵بافت) استفاده شد. نمونه بافت به همراه محلول فـوق بـه ویال‌هـای ۵۰ml منتقـل و در ۳۷°C و ۵٪ CO۲ به مدت یک ساعت همراه با چند مرحله ورتکس انکوباسیون شدند. سپس ۵ml محیط کشـت DMEM حاوی ۱۰٪ سـرم جنین گاوی به آن اضافه شـد. بعد از انجام پی پتاژ به منظور پراکنده شـدن توده‌های سلولی، نمونه‌های هضم شده با استفاده از توری فلزی درون ظرف استریل فیلتر شدند. سوسپانسیون سلولی به دسـت آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و آدیپوسـیت‌های بالغ به دسـت آمده که به صورت لایه چربی در سـطح شناور بودند با استفاده از آسپیراسیون جداسازی شدند. آدیپوسیت‌های جدا شـده درون فلاسـک‌های ۲۲۵cm حاوی محیط کشـت DMEM ۱۰٪ کشـت داده شـدند و فلاسـک‌ها به صورت وارونه (Ceiling Culture) درون انکوباتور در شرایط دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵٪ و Co۲ ۵٪ به منظور نگهداری و تکثیر سـلول‌ها انکوباسیون شدند. پس از سانتریفیوژ محتوی فلاسک‌ها، آدیپوسیت‌های شناور جداسازی شده و درون میکروپلت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند به طوری که هر خانه حاوی سلول‌های جدا شده از تقریباً ۲۵۰mg-۱۵۰ بافت چربی باشد. در مرحله بعدی روی این سلول‌ها تست پاسخ به انسولین انجام شد (۶)

انجام تست پاسخ به انسولین در آدیپوسیت‌ها: مرحله اول انکوباسیون فقط برای اندازه‌گیری مقدار گلیسـرول آزاد شده از آدیپوسیت‌ها در شرایط پایه (عدم افزودن هورمون) بود. آدیپوسیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در حضور ترکیب‌های مورد نظر از اسـیدهای چرب در دمای ۳۷°C کشت داده شدند و بعد از ۴۸ سـاعت نمونه‌ای از محیط کشـت به منظور اندازه‌گیری مقدار گلیسرول آن گرفته شد.

مرحله دوم انکوباسیون به منظور اندازه‌گیری مقدار گلیسرول آزاد شده در شـرایط تحریـک آدرنرژیک انجام گرفت. در ایـن مرحله از غلظت M 10^{-6} اپی نفرین برای تحریک لیپولیز در سلول‌ها استفاده شد (۶). به منظور تحریک آدیپوسـیت‌ها با اپی نفرین، ۴۸ ساعت بعد از شروع انکوباسیون، آدیپوسیت‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C در حضور اپی نفرین کشت داده شـده و سپس نمونه‌ای از محیط کشـت برای اندازه‌گیری گلیسرول گرفته شد.

در مرحله سـوم میزان پاسخ آدیپوسیت‌ها به انسولین سنجیده شد. به عبارت دیگر میزان توانایی انسـولین برای کاهش لیپولیز در حضور عوامل لیپولایتیک اندازه‌گیری شد. در این مرحله انسولین در ۳ غلظت مورد استفاده قرار گرفت. آدیپوسـیت‌ها ۴۸ ساعت بعد از شـروع انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در حضور اپی نفرین به همراه غلظت‌های مختلف انسولین (۲۰nM، ۴۰، ۸۰) در دمای ۳۷°C کشت داده شده و سپس نمونه‌ای از محیط کشت برای اندازه‌گیری گلیسرول برداشته شد. برای اندازه‌گیری غلظت گلیسرول در نمونه‌ها از روش اسپکتروفوتومتری Paolo Bondioli و Della Bella در سـال ۲۰۰۵ استفاده شـد که در آن بر مبنای اکسیداسیون گلیسرول با پریودات سـدیم و تشـکیل فرمالدهید و به دنبال آن واکنش فرمالدهید با آمونیوم استات عمل می‌شود که در نهایت منجر به تولید مشتقی به نام ۳، ۵- دی اسـتیل-۱،۴ دی هیدرولوتیدین می‌شود. سپس جذب این ماده در دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۴۱۰nm قرائت می‌شود.

محاسـبات و آنالیز آماری: داده‌های حاصـل از مرحله اول از داده‌های مرحله دوم و سوم کسر شد تا به ترتیب میزان افزایش لیپولیز در آدیپوسیت‌ها در حضور عوامل لیپولایتیک و توانایی انسولین در مهار لیپولیز تحریک شده ناشـی از اپی نفرین تعیین شـود. داده‌های به دسـت آمده در این مرحله با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + HT_{ij}\ e_{ijkl}$$

Y_{ijk}= مقدار هر مشاهده

μ= میانگین کل

T_i= اثر ثابت تیمار

H_j= اثر غلظت انسولین

HT_{ij} = اثر متقابل تیمار و هورمون‌ها

e_{ijkl}= اثرات باقیمانده

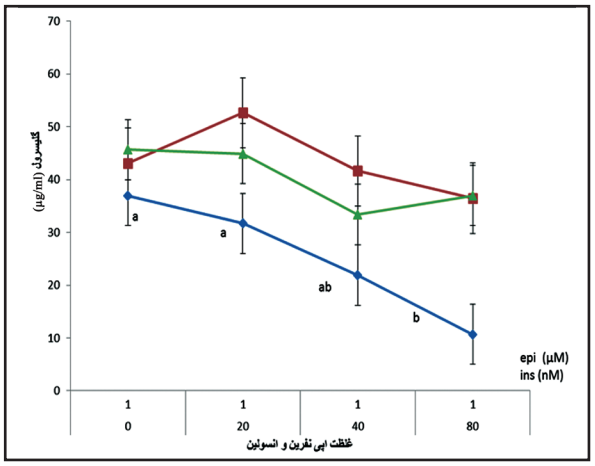
نتایج

در جدول ۱ ترکیب اسیدهای چرب استخراج شده از منابع مختلف روغن و در جدول ۲ نحوه ترکیب این پروفیل‌ها برای به دست آوردن تیمارهای مورد نظر برای اضافه شدن به محیط کشت نشان داده شده است.

به طور کلی و بدون در نظر گرفتن اثر عوامل لیپولایتیک (اپی نفرین) و آنتی لیپولایتک (انسولین) در مدل آماری، در تیماری که حاوی نسبت ۱:۱ اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳ از منبع روغن ماهی بود، شدت لیپولیز پایین تر بود (لیپولیز کل در جدول ۳). نتایج مرحله اول کشت سلولی نشان داد که لیپولیز پایه در هر سه تیمار اسیدهای چرب یکسان است. با افزوده شدن اپی نفرین به محیط کشت آدیپوسیت‌ها، شدت لیپولیز به طور متوسط در تمام تیمارها، ۴۱/۹۳ واحد افزایش نشان داد. هر چند در تیماری که حاوی اسیدهای چرب روغن ماهی بود شدت این افزایش کمتر بود (۳۶/۹۶ در برابر ۴۳/۱۴ و ۴۵/۶۸ به ترتیب برای تیمارهای SFA-LC ۱:۱، SFA-MC ۱:۱ و SFA) ولی از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار نبود (p=۰/۲۷). با توجه به اعداد جدول ۱ و نمودار ۱ ملاحظه می‌شود که به طور کلی با افزایش غلظت انسولین در کنار اپی نفرین در محیط کشت از قدرت اپی نفرین در افزایش لیپولیز کاسته شده است. در جدول ۱ مقایسات بین تیماری لیپولیز نشان داده شده و در نمودار ۱ مقایسات داخل هر تیمار و غلظت‌های مختلف انسولین صورت گرفته است. جدول ۱ نشان می‌دهد که توانایی انسولین در هر غلظتی (۲۰nM، ۴۰ و ۸۰) برای مقابله با اثرات لیپولایتیک اپی نفرین در تیمار حاوی اسیدهای چرب روغن ماهی بیشتر بود و این توانایی با افزایش غلظت انسولین حتی بیشتر هم می‌شود (نمودار ۱). ولی در دو تیمار دیگر علیرغم کاهش عددی، انسولین هیچ تأثیر معنی‌داری در مهار اثرات لیپولایتیک اپی نفرین ندارد.

بحث

تیمار اسیدهای چرب اشباع (SFA) به منظور شبیه سازی شرایط تعادل منفی انرژی در گاوهای شیری در اوایل شیردهی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت که نشان داده شده در این دوره اسیدهای چرب به طور گسترده از بافت چربی به جریان خون آزاد می‌شوند که عمدتاً اسیدهای چرب اشباع بوده و عامل اصلی مقاومت به انسولین در طی این دوره



تصویر ۱. اثر آنتی لیپولایتیک انسولین در غلظت‌های مختلف در آدیپوسیت‌های کشت داده شده. SFA L-C ۱:۱ SFA S-C ۱:۱ SFA

می‌باشند (۱۷،۱۸). در دو تیمار دیگر نیز اسیدهای چرب اشباع البته با نسبت کمتر به منظور القای مقاومت به انسولین مورد استفاده قرار گرفت تا در کنار آن توانایی اسیدهای چرب امگا-۳ از منابع مختلف برای پیشگیری از این حالت مورد ارزیابی قرار گیرد.

به طور کلی اسیدهای چرب امگا-۳ از منبع روغن ماهی غلظت گلیسرول را در محیط کشت آدیپوسیت‌ها نسبت به اسیدهای چرب امگا-۳ از منابع گیاهی (اسید لینولنیک) و اسیدهای چرب اشباع پایین نگه داشتند. با توجه به این که بین تیمارها از لحاظ لیپولیز پایه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۳) می‌توان نتیجه گرفت که این اثر کلی اسیدهای چرب روغن ماهی در نتیجه افزایش توانایی انسولین در مهار اثر اپی نفرین در تحریک لیپولیز می‌باشد. با توجه به اینکه در هر سه تیمار ۵۰٪ اسیدهای چرب مورد استفاده از نوع اشباع بودند انتظار مشاهده حالت مقاومت به انسولین در آدیپوسیت‌ها وجود داشت زیرا در یک مطالعه (۲۰) نشان داده شده است که ۴ ساعت انکوباسیون آدیپوسیت‌ها با ۳۰۰µM پالمیتات، برای ایجاد مقاومت به انسولین کافی می‌باشد که این غلظت نزدیک به غلظت اسیدهای چرب مورد استفاده در این مطالعه می‌باشد. همچنین این نتایج با نتایج Pires و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد که با پایین آوردن غلظت اسیدهای چرب غیر استریفیه پلاسمای گاو با استفاده از نیکوتینیک اسید، موجب بهتر شدن پاسخ بدن آنها به انسولین در طی محدودیت غذایی شده و نتیجه‌گیری کردند که اسیدهای چرب غیر استریفیه پلاسما عامل بسیار مهمی در توسعه مقاومت به انسولین می‌باشد. با توجه به نمودار ۱ مشاهده می‌شود که در آدیپوسیت‌های کشت داده شده در حضور تیمارهای SFA-MC ۱:۱ و SFA، حالت مقاومت به انسولین به وضوح دیده می‌شود به طوری که انسولین در هیچ غلظتی توانایی مهار لیپولیز ناشی از اپی نفرین را ندارد. ولی در تیمار SFA-LC ۱:۱، با افزایش غلظت انسولین در محیط کشت به تدریج از شدت لیپولیز کاسته می‌شود که نشان دهنده پاسخ خوب آدیپوسیت‌ها به انسولین می‌باشد. با اینکه اسید لینولنیک نیز به

جدول ۱. ترکیب اسیدهای چرب روغن‌های مورد استفاده.

اسید چرب	منبع روغن					
	ماهی	کانولا	آفتابگردان	زیتون	سویا	بذرک
C۱۴:۰	۳/۷۳	-	-	-	-	-
C۱۶:۰	۱۸/۳۷	۵/۹۲	۶/۲	۱۰/۴۷	۲/۶۷	۵/۳۴
C۱۶:۱	۷/۰۹	-	-	۰/۴۹	-	-
C۱۸:۰	۴/۴۲	-	۵/۳	۳/۶۷	۰/۷۹	۵/۶۷
C۱۸:۱	۳۷/۱۷	۶۱/۲۳	۲۷/۳۷	۵۵/۱۰	۲۸/۳۹	۲۱/۵۱
C۱۸:۲	۲/۴۸	۲۲/۷۸	۶۰/۱۹	۲۷/۰۱	۵۹/۹۵	۱۳/۱۴
C۱۸:۳	۱/۷۲	۷/۲۸	۰/۸۱	۳/۲۶	۸/۰۸	۵۴/۳۵
C۱۸:۴	۱/۹۱	-	-	-	-	-
C۲۰:۱	۵/۹۸	-	-	-	-	-
C۲۰:۴	۱/۷۳	-	-	-	-	-
C۲۰:۵	۱۱/۰۴	-	-	-	-	-
C۲۲:۱	۴/۰۰	-	-	-	-	-
C۲۲:۵	۰/۲	-	-	-	-	-
C۲۲:۶	۰/۱۵	-	-	-	-	-
مجموع اسیدهای چرب اشباع	۲۶/۵۲	۸/۷۱	۱۱/۵	۱۴/۱۴	۳/۴۶	۱۱/۰۱
مجموع اسیدهای چرب یک غیر اشباع	۵۴/۲	۶۱/۲۳	۲۷/۳۷	۵۵/۱	۲۸/۳۹	۲۱/۵۱
مجموع اسیدهای چرب امگا-۶ با چند باند دوگانه	۴/۲۱	۲۲/۷۸	۶۰/۱۹	۲۷/۰۱	۵۹/۹۵	۱۳/۱۴
مجموع اسیدهای چرب امگا-۳ با چند باند دوگانه	۱۳/۱۵	۷/۲۸	۰/۸۱	۳/۲۶	۸/۰۸	۵۴/۳۵
سایر	۱/۹۲	-	۰/۱۳	-	۰/۱۲	-
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۲. ترکیب اسیدهای چرب از منابع مختلف به منظور حصول ترکیب‌های مورد نظر.

اسید چرب از منبع روغن (درصد مولی)	تیمار		
	۱:۱ LC	۱:۱ MC	SFA
ماهی	۹۰/۹	-	-
کانولا	-	۵	-
آفتابگردان	-	۱۰	-
زیتون	-	۸	-
سویا	-	۱۸	-
بذرک	-	۴۲	-
پالمیتات خالص	-	۱۷	۵۰
لینولئات خالص	۹/۱	-	-
استئارات خالص	-	-	۵۰
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

دسته اسیدهای چرب امگا-۳ تعلق دارد ولی این اسید چرب در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع که عامل اصلی مقاومت به انسولین می‌باشند هیچ تأثیر مفیدی در کاهش مقاومت به انسولین نداشت.

مطالعات متعددی در موش نشان داده‌اند که اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیرتر در مقایسه با اسید لینولنیک در پیشگیری از مقاومت به انسولین مؤثرتر عمل می‌کنند (۸،۹،۲۱). Masson و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که به طور کلی اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر در مقایسه با گروه کنترل باعث بهتر شدن وضعیت مقاومت به انسولین شدند ولی زمانی که اسید لینولنیک به همراه اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیرتر در جیره مورد استفاده قرار گرفت اثرات این اسیدهای چرب بسیار قوی‌تر از زمانی بود که اسید لینولنیک به تنهایی در جیره مورد استفاده قرار گرفت. Ghafoorunissa و همکاران در سال ۲۰۰۵ الف و ب با تغذیه مقادیر بالای سوکروز به موش‌ها مقاومت به انسولین را در آنها القا کرده و اثر اسیدهای چرب امگا-۳ بلند و متوسط زنجیر (آیکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید) را در پیشگیری از این حالت مورد آزمون قرار دادند. کشت آدیپوسیت‌های جدا شده از این موش‌ها در آزمایشگاه نشان داد که استفاده از ۲/۶g اسیدهای چرب بلند زنجیر و ۱۱g اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر در کیلوگرم جیره در مقایسه با گروه کنترل که حاوی اسیدهای چرب امگا-۶ بود مورد نیاز است تا وضعیت لیپولیز و اثرات آنتی لیپولایتیک انسولین در این حیوانات بهبود یابد که نشان دهنده مؤثرتر بودن اسیدهای چرب بلند زنجیرتر امگا-۳ در بهبود وضعیت مقاومت به انسولین می‌باشد.

در مطالعات صورت گرفته در نشخوارکنندگان هنوز برتری اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیر نسبت به اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر

جدول ۳. اثر تیمارها بر پاسخ آدیپوسیت‌ها به انسولین. [۱]کلیه مقادیر نشان دهنده غلظت گلیسرول در محیط کشت سلول‌های چربی براساس میکروگرم در میلی لیتر می‌باشند. [۲]مقادیر نشان دهنده غلظت گلیسرول در محیط کشت بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در حضور تیمار می‌باشند. [۳] مقادیر نشان دهنده افزایش غلظت گلیسرول به دنبال انکوباسیون یک ساعته آدیپوسیت‌ها در حضور اپی نفرین (۱ μmol) ۴۸ ساعت بعد از شروع انکوباسیون می‌باشند. [۴] مقادیر نشان دهنده افزایش غلظت گلیسرول به دنبال انکوباسیون یک ساعته آدیپوسیت‌ها در حضور اپی نفرین (۱ μmol) و غلظت‌های مختلف انسولین (۲۰، ۴۰ و ۸۰ نانومولار) ۴۸ ساعت بعد از شروع انکوباسیون می‌باشند.

	تیمار				
	SFA-LC ۱:۱	SFA-MC ۱:۱	SFA	اشتباه استاندارد	p-value
لیپولیز کل۱	۲۵/۳۸ [a]	۴۳/۴۹ [b]	۴۰/۲۴ [b]	۳/۰۱	<۰/۰۰۰۱
لیپولیز پایه ۲	۲۶/۳۷	۲۸/۴۸	۲۷/۲۱	۲/۷۲	۰/۵۶
لیپولیز تحریک شده ۳	۳۶/۹۶	۴۳/۱۴	۴۵/۶۸	۷/۹۴	۰/۲۷
لیپولیز تحریک شده و مهار شده					
۲۰ mmol انسولین ۴	۳۱/۶۹ [a]	۵۲/۶۵ [b]	۴۴/۹۳ [ab]	۶/۱۳	۰/۰۲۴
۴۰ mmol انسولین	۲۱/۹۰ [a]	۴۱/۶۴ [b]	۳۳/۴۰ [ab]	۶/۱۳	۰/۰۳۳
۸۰ mmol انسولین	۱۰/۷۰ [a]	۳۶/۴۴ [b]	۳۶/۹۶ [b]	۶/۱۳	۰/۰۰۶

به اثبات نرسیده است. Mashek و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که تزریق داخل وریدی امولسیون حاصل از روغن ماهی، روغن دانه کتان در مقایسه با روغن پیه باعث بهتر شدن پاسخ به انسولین در بافت چربی و کاهش غلظت گلیسرول و اسیدهای چرب غیراستریفیه پلاسمای گاو شدند ولی این دو منبع روغن جز در ساعات پایانی آزمایش، تفاوتی باهم نداشتند. علت اینکه در مطالعه حاضر اسیدهای چرب امگا-۳ متوسط زنجیر اثری در مقابله با مقاومت به انسولین نداشتند را احتمالاً می‌توان به عدم توانایی آدیپوسیت‌ها در تبدیل آنها به اسیدهای چرب بلند زنجیرتر نسبت داد چرا که اسیدهای چرب متوسط زنجیر برای تأثیرگذاری بر سیستم متابولیکی بایستی ابتدا به اسیدهای چرب بلند زنجیرتر تبدیل شوند (۱۴). توانایی این تبدیل در آدیپوسیت‌ها در محیط کشت هنوز مورد سوال می‌باشد و برتری اسیدهای چرب بلند زنجیر بر اسیدهای چرب متوسط زنجیر چه در حیوانات تک معده‌ای و چه در نشخوارکنندگان تنها در آزمایشات درون تنی به اثبات رسیده است. اسیدهای چرب متوسط زنجیر به طور گسترده در نقاط مختلفی در داخل بدن مانند غده پستان، بیضه‌ها، جفت، مغز بافت چربی و کبد (غیر نشخوارکنندگان) به اسیدهای چرب بلند زنجیرتر تبدیل می‌شوند (۱۵) و این می‌تواند علت تأثیرگذاری یکسان اسیدهای چرب متوسط و بلند زنجیر در هنگام تغذیه به گاو باشد. هر چند در نشخوارکنندگان مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا بازدهی واقعی طویل سازی اسیدهای چرب متوسط زنجیر تعیین گردد.

نتیجه گیری نهایی: نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان داد که مشابه گزارشات موجود در آزمایشات درون تنی (in vivo) در گاو، در آدیپوسیت‌های گاوی کشت داده شده نیز اسیدهای چرب اشباع، عامل مهمی در توسعه مقاومت به انسولین می‌باشند. همچنین با توجه به نتایج پژوهش حاضر اسیدهای چرب امگا-۳ از منابع دریایی در پیشگیری از توسعه مقاومت به انسولین ناشی از اسیدهای چرب اشباع، فوق العاده مؤثر عمل می‌کنند در حالیکه اسیدهای چرب امگا-۳ منابع گیاهی چنین اثر پیشگیری کننده‌ای از خود نشان ندادند. مطالعات بیشتری در سطح مزرعه مورد نیاز است تا توانایی اسیدهای چرب امگا-۳ از منبع روغن ماهی به منظور تعدیل لیپولیز در گاوها در دوره انتقالی زایمان مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت و کارکنان گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به پاس همکاری‌های بی دریغشان کمال تشکر را دارند.

References

1. Angélica, G., Susana, N., Julio, S., Claudio, R., Hernán, S., Alfonso, V. (1998) Concentration and Stabilization of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Sardine Oil. J Am Oil Chem Soc. 75: 733-736.
2. Bell, A.W., Bauman, D.E. (1997) Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2: 265-278.
3. Bondioli, P., Della Bella, L. (2005) An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur J Lipid Sci Technol. 107: 153-157.
4. Cousin, S.P., Hugl, S.R., Wrede, E., Kajio, H., Myers, M.G., Rhodes, C.J. (2001) Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor 1-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic b-cell line INS-1. Endocrinology. 142: 229-240.
5. Doepel, L., Lapierre, H., Kennelly, J.J. (2002) Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and

protein intake. J. Dairy Sci. 85:2315-2334.
6. Fickova, M., Hubert, P., Cremel, G., Leray, C. (1998) Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. J Nutr. 128: 512-519.
7. Gao, Z., Zhang, X., Zuberi ,A., Hwang, D., Quon, M.J., Lefevre, M., Ye, J. (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol. 18: 2024-2034.
8. Ghafoorunissa, A.I., Natarajan, S. (2005a) Substituting dietary linoleic acid with α-linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1733: 67-75.
9. Ghafoorunissa, A.I., Rajkumar, L. Acharya, V. (2005b) Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose- induced insulin resistance in rats. J Nutr. 135: 2634-2638.
10. Grummer, R.R. (1993) Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. J Dairy Sci. 76: 3882-3896.
11. Hunnicutt, J.W., Hardy, R.W., Williford, J., McDonald, J.M. (1994) Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. Diabetes. 43: 540-545.
12. Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., Giacca, A. (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr. Rev. 23:201-229.
13. Mashek, D.G., Bertics, S.J. Grummer, R.R. (2005) Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. J Dairy Sci. 88: 100-109.
14. Masson, V.R., Lucas, A., Gueugneau, A.M., Macaire, J.P., Paul, J.L., Grynberg, A., Rousseau, D. (2008) Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rat. J Nutr. 138: 1915-1922.
15. Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W. (2000) Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. Rev Reprod. 5: 38-45.
16. Oftedal, O.T. (2000) Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. Proc Nutr Soc. 59: 99-106.
17. Oikawa, S., Oetzel, G.R. (2006) Decreased insulin response in dairy cows following four-day fast to induce hepatic lipidosis. J Dairy Sci. 89: 2999-3005.
18. Pires, J.A.A., Souza, A.H., Grummer, R.R. (2007b) Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted holstein cows. J Dairy Sci. 90: 4635-4642.
19. Pires, J.A.A., Pescara, J.B., Grummer, R.R. (2007) Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted holstein cows. J Dairy Sci. 90: 4635-4642.
20. Pires, J.A.A., Pescara, J.B., Brickner, A.E., Silva, N.R., Cunha, A.P., Grummer, R.R. (2008)Effects of abomasal infusion of linseed oil on responses to glucose and insulin in holstein cows. J Dairy Sci. 91: 1378-1390.
21. Pires, J.A.A., Souza, A.H. Grummer, R.R. (2007a) Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in holstein cows. J Dairy Sci. 90: 2735-2744.
22. Sumner, J.M., McNamara, J.P. (2007) Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating holstein dairy cattle. J Dairy Sci. 90: 5237-5246.
23. Van Epps-Fung, M., Williford, J., Wells, A., Hardy, R.W. (1997) Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. Endocrinology. 138: 4338-4345.
24. Vazquez-Anon, M., Bertics, S., Luck, M., Grummer, R.R., Pinheiro, J. (1994) Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. J Dairy Sci. 77: 1521-1528.

Comparison of long chain and medium chain polyunsaturated n-3 fatty acids for their ability to correct insulin resistance induced by saturated fatty acids in cultured bovine adipocytes

Eslamizad, M., Dehghan-Banadaky, M.*, Ganjkhanlou, M., Shakeri, M.

Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Alborz- Iran

(Received 21 October 2015, Accepted 4 January 2016)

Abstract:

BACKGROUND: The modern dairy cows, due to intensive selection for higher milk production during past decades, have become more resistant to insulin. Accompanied with DMI depression in per parturient dairy cow, insulin resistance may lead to a massive release of non-esterified fatty acids (NEFA) to bloodstream which might act as a start point for development of other diseases. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to investigate potentiality of long chain polyunsaturated fatty acid (LCPUFA) of marine or polyunsaturated fatty acids (PUFA) of plant origin to correct the insulin resistance induced by saturated fatty acids in cultured bovine adipocytes. **METHODS:** Fatty acids from different oils were isolated using KOH and were mixed together with different proportions to obtain the following profiles: 1) saturated fatty acids (SFA); 2); saturated fatty acids+n-6/n-3 PUFA (medium chain) at ratio of 1:1 (SFA-MC1:1)and3) saturated fatty acids + n-6/n-3 PUFA (long chain) at ratio of 1:1 (SFA-LC 1:1). Adipocytes were cultured for 48 in the presence of treatments and after the incubation period an epinephrine challenge was applied to stimulate lipolysis. In the adjacent culture plates for each treatment insulin was added along with epinephrine challenge in different concentrations to test sensitivity of adipocytes to insulin. After conducting insulin sensitivity test, a sample was taken from culture media and analyzed for glycerol concentration as an index of lipolysis. **RESULTS:** Results indicated that saturated fatty acids effectively induced insulin resistance in adipocytes. Long chain polyunsaturated fatty acids from fish oil had a significant preventive effect on insulin resistance induced by saturated fatty acids so that increasing insulin concentration linearly increased the response of adipocytes to insulin in treatment LC-SFA 1:1. Shorter chain n-3 polyunsaturated fatty acids of plant origin did not show such effects on insulin sensitivity in adipocytes. **CONCLUSIONS:** n-3 fatty acids from fish oil improved bovine adipocyte sensitivity to insulin but shorter chain n-3 fatty acids did not show this ability.

Keyword: fish oil, insulin resistance, lipolysis, n-3 fatty acids

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The antilipolytic effect of insulin at different concentration in cultured adipocytes.

Table 1. Fatty acid composition of different oils used.

Table 2. Proportion of oils mixed to obtain desirable fatty acid profiles.

Table 3. The effect of treatments on the adipocyte response to insulin.

***Corresponding author's email: dehghanb@ut.ac.ir, Tel: 026-32248082, Fax: 026-32246752**