ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Elaidic Acid on TNF-α Gene Expression in Macrophage Cell Line J744

Neda Fakhar[1],
Yousef Ghanbari Kakavandi[1],
Saeed Rezaee Zarchi[2],
Hossein Montakhab Yeganeh[3]

[1] MSc in Biochemistry, Faculty of Science, Yazd Payam Noor University, Yazd, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd Payam Noor University, Yazd, Iran
[3] Instructor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University East Tehran Branch, Tehran, Iran

(Received August 13, 2015 ; Accepted July 12, 2015)

Abstract

Background and purpose: Recent studies reported that not only the quantity, but also the quality of dietary fatty acids can affect lipid parameters. Elaidic acid as one of the most important by-product of partially hydrogenated vegetable oil, participate in the development of cardiovascular diseases, especially atherosclerosis through changing in lipid profile and exacerbation of inflammation and inflammatory factors. On the other hand, the role of TNF-α is evident in inflammation and inflammatory pathways leading to atherosclerosis. Thus we investigated the effect of elaidic acid on TNF-α gene expression.

Materials and methods: J744 cells were treated with 100 and 200μm concentrations of elaidic acid for 24 hr. The expression of TNF-α gene was evaluated after RNA extraction and cDNA synthesis using Real-Time PCR.

Results: Gene expression of TNF-α in J744 macrophage cell line showed no significant difference compared with that of the control group at both concentrations of elaidic acid.

Conclusion: These results indicated that the elaidic acid does not affect the development of atherosclerosis, through TNF-α gene expression.

Keywords: Cell culture, elaidic acid, atherosclerosis, gene expression, trans fatty acids, TNF-α

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(124): 34-41 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۶ تیر سال ۱۳۹۳ (۴۱-۳۴)

بررسی اثر اسید الائیدیک بر بیان ژن TNF-α در رده سلولی ماکروفاژی J744

ندا فخار[۱]
یوسف قنبری کاکاوندی[۱]
سعید رضایی زارچی[۲]
حسین منتخب یگانه[۳]

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات اخیر نشان داده است که نه تنها کمیت، بلکه کیفیت اسیدهای چرب تغذیه‌ای می‌تواند بر پارامترهای لیپیدی موثر باشند. اسید الائیدیک اصلی‌ترین فرآورده جانبی اشباع‌سازی شده روغن‌های گیاهی، با تغییر پروفایل لیپیدی، تشدید التهاب و عوامل التهابی به عنوان عاملی مهم و دخیل در بروز بیماری‌های قلبی- عروقی به خصوص آتروسکلروز شناخته شده است. از طرف دیگر نقش tumor necrosis factor alpha در مسیرهای التهابی منتهی به آتروسکلروز مشهود می‌باشد. لذا در مطالعه حاضر اثر اسید الائیدیک بر بیان این ژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌های J744 تحت تیمار ۲۴ ساعته اسید الائیدیک در دو غلظت ۱۰۰μm و ۲۰۰ قرار گرفتند. سپس RNA سلول‌ها استخراج و بعد از سنتز cDNA میزان بیان ژن TNF-α با تکنیک Real-Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان بیان ژن TNF-α در رده سلولی ماکروفاژی J744 در هر دو غلظت در مقایسه با گروه کنترل آن‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت.

استنتاج: با توجه به مشهود بودن تاثیر اسیدهای چرب ترانس بر بروز و پیشرفت آتروسکلروز، نتایج این تحقیق مشخص نمود که اثر اسید الائیدیک بر پیشرفت آتروسکلروز، احتمالاً از طریق تغییر در سطح بیان ژن TNF-α نیست.

واژه های کلیدی: کشت سلول، اسید الائیدیک، آتروسکلروز، بیان ژن، اسید چرب ترانس، TNF-α

مقدمه

آترواسکلروز علت پیش‌تاز مرگ و میر در جوامع پیشرفته و در حال پیشرفت بوده و احتمالاً به زودی گریبان‌گیر تمام کشورهای جهان خواهد شد. آترواسکلروز یک بیماری پیشرونده التهابی است، که با رسوب تدریجی LDL های غنی از کلسترول (LDL-C) در اندوتلیوم عروق در اثر عوامل مختلف آغاز می‌گردد(۱). متعاقب این رسوبات، فراخوانی مونوسیت‌ها به اندوتلیوم و تمایز آن‌ها به ماکروفاژ اتفاق می‌افتد. ماکروفاژهای غنی از کلسترول استریفیه در اثر تحریک عوامل التهابی مثل سیتوکین‌ها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن به تدریج ایجاد سلول‌های کفی (Foam Cell) می‌کنند، که در نهایت تبدیل به پلاک آترواسکلروز

مولف مسئول: حسین منتخب یگانه- تهران. جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس دکتری بیوشیمی بالینی E-mail: Yegane_email@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران
۳. مربی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۵/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۳/۵/۲۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۲۱

می‌شود. لذا عواملی که این فرایند را تسریع می‌کنند و نیز چگونگی آن، مسئله‌ای در خور توجه خاص در زمینه جلوگیری از بروز و پیشرفت آن است(۳،۲). در طول چنددهه اخیر مطالعات بسیار نشان داده‌اند که نه تنها کمیت، بلکه کیفیت اسیدهای چرب تغذیه‌ای می‌تواند بر پارامترهای لیپیدی موثر باشند، که از جمله مهمترین آن‌ها HDL-C و LDL-C است. به طوری که مشخص شده است اسید چرب با یک پیوند دوگانه (MUFA) با ایزومر سیس (CFA)، نسبت LDL-C به HDL-C را کاهش داده و موجب کاهش خطر ضایعات عروقی، به خصوص در قلب و مغز می شوند؛ اما از طرف دیگر اسیدهای چرب ترانس (TFA یا Trans Fatty Acid) نسبت فوق، به عبارتی خطر ضایعات عروقی را افزایش می‌دهند(۵،۴). از آن‌جایی که افزایش این نسبت به عنوان یک عامل خطر اصلی دربروز بیماری‌هایی مثل بیماری‌های قلب و عروق مخصوصاً آترواسکلروز مطرح است، لذا تعیین دقیق مکانیسمی که باعث این پیامد می‌شود، ضروری به‌نظر می‌رسد. TFA اصلی‌ترین فرآورده جانبی اشباع‌سازی شده روغن‌های گیاهی است، که به طرق صنعتی حاصل می‌گردد. این اسیدهای چرب (به خصوص اسید الائیدیک یا EA C18:1,9) با تغییر در پروفایل لیپیدی، تشدید التهاب و عوامل التهابی و مشکلات عمده دیگر موجب بروز و پیشرفت آتروسکلروز می‌شوند(۵).

سلول‌های اندوتلیال عروق به صورت یک سد نفوذپذیر با خاصیت انتخابی عمل نموده، و در فرایندهای التهابی نقش تنظیم‌کنندگی مهمی ایفا می‌نمایند. هر عاملی که باعث به هم‌خوردن عملکرد سلول‌های اندوتلیال شود، می‌تواند شروع کننده عوارض التهابی باشد. فعال شدن التهاب سیستمیک، عامل خطری برای بیماری کرونری قلب، مقاومت به انسولین، دیابت، و نارسایی قلبی است. از طرفی مشخص شده است که سیتوکین‌های التهابی مثل: IL-6 و TNF-α با فعال‌سازی اندوتلیال به عنوان آغازگر فرایندهای التهابی عمل نموده و مقدمات بروز بیماری‌های قلبی عروقی و آتروسکلروز را فراهم می‌آورند(۶). هم‌چنین مشخص شده است که TNF-α از طریق فعال سازی آدنیلات سیکلاز و یا PKC موجب القاء تولید IL-6 می‌شود(۷). از آن‌جایی که اسیدهای چرب جزء ساختاری مهمی از بافت چربی است، روشن شدن تاثیرات بیولوژیکی انواع مختلف اسیدهای چرب روی ژن‌های مرتبط و دخیل در متابولیسم و هوموستاز لیپید بسیار ضروری است. در این ارتباط مطرح شده است که TFA باعث افزایش تولید سیتوکین‌های التهابی مثل: TNFα و IL-6 می‌شوند(۸). از طرفی همان‌طورکه گفته شد TFA، که عمده‌ترین آن‌ها اسید الائیدیک (EA) است، به دلیل تغییر پروفایل لیپیدی و هم‌چنین افزایش تولید عوامل التهابی، به عنوان عامل خطر مهمی برای بسیاری از بیماری‌ها مثل بیماری‌های قلبی عروقی (به خصوص آترواسکلروز) محسوب می‌شوند. لذا در مطالعه حاضر اثر اسید الائیدیک بر بیان این ژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: رده سلولی ماکروفاژی J744 (خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران)، محیط کشت‌سلولی DMEM، سرم جنین گاوی (FBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و گلوتامین، که از شرکت گیبکو آمریکا خریداری شد. کیت‌های استخراج RNA، یا RNeasy Mini plus (Cat.No.74134)، و سنتز cDNA با QuantiTect Reverse Transcription (Cat.N. 205311) و پرایمر ژن‌های TNF-α و β-Actin از شرکت کیاژن آلمان، و در نهایت کیت green Real Time PCR SYBER از شرکت ژاپنی تاکارا خریداری شد. مراحل انجام کار نیز به قرار زیر صورت پذیرفت:

۱- کشت رده سلولی ماکروفاژی J744

کشت رده سلولی ماکروفاژی J744 درمحیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱/۲۵

درصد گلوتامین و همچنین ۱درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین انجام شد، و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شد.

۲- تعیین دوز کشنده اسید الائیدیک (آزمون MTT)

آزمون مذکور به هدف مشخص نمودن غلظت کشنده اسیدالائیدیک روی رده‌های سلولی و طی مراحل زیر انجام شد: تعداد ۲۰ هزارسلول در هر میکروپلیت ۹۶خانه‌ای توزیع گردید. بعد از تهیه محلول کاری MTT باغلظت ۰/۵mg/ml، این محیط جایگزین محیط DMEM شد و سپس سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان مذکور محیط کاری MTT با DMSO (Dimethyl Sulfoxide) جایگزین و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه، و میزان جذب هر خانه میکروپلیت توسط الایزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد.

۳- کونژوگاسیون اسید الائیدیک با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA)

اسید الائیدیک با اتصال به آلبومین سرم گاوی (BSA) حلالیت لازم برای ورود به درون سلول را به دست آورد، به این صورت که اسید الائیدیک، در حداقل مقدار ممکن اتانول ۵۰ درصد حل شد، و سپس با استفاده از محیط حاوی یک درصد وزن حجمی آلبومین عاری از اسید چرب، غلظت‌های ۱۰۰ µm و ۲۰۰ اسید الائیدیک تهیه شد. سپس محیط حاصله با استفاده از فیلتر با منفذ ۰/۲ میکرومتر، فیلتر شد وبه مدت۲ تا ۳ ساعت در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

۴- تیمارسلول‌ها با اسیدالائیدیک

ابتدا محیط DMEM که سلول‌ها را تغذیه نموده حذف شده، و سپس سلول‌ها با محیط کشت تازه واجد غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی مولار اسیدالائیدیک کونژوگه شدند، سپس سلول‌ها تیمار و بعد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

۵- استخراج RNA

با استفاده از کیت شرکت کیاژن و طبق دستورالعمل مربوطه، RNA سلول‌ها استخراج گردید. در ادامه، غلظت RNA از طریق جذب نوری آن توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد؛ همچنین کیفیت RNA به وسیله ژل آگارز مورد تایید قرار گرفت.

۶- سنتز cDNA

RNA حاصله از سلول‌های تحت تیمار با اسید الائیدیک نیز، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (شرکت کیاژن) تحت واکنش رونویسی معکوس قرار گرفت، و cDNA ساخته شد.

۷- بررسی بیان ژن TNF-α

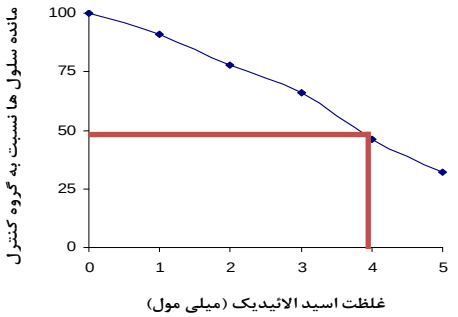
با به کارگیری دستورالعمل کیت SYBER green شرکت تاکارا و با استفاده از دستگاه CORBETT Real Time PCR (Rotor-Gene 6000)، ژنTNF-α و β-Actin (به عنوان ژن مرجع) تکثیر، و میزان بیان ژن در گروه‌های تیمار شده و کنترل، اندازه‌گیری گردید. برای بررسی میزان بیان ژن از روش دلتا دلتا CT استفاده شد؛ در این روش محاسبه براساس فرمول $2^{-(Cta—Ctb)}$ صورت می‌پذیرد، که درآن Cta سیکل آستانه در ناحیه مورد نظر و Ctb سیکل آستانه در ناحیه مرجع است. در نهایت داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزارSPSS ویراست ۱۶ وآزمون آماری ANOVA آنالیز و تفسیر گردید. معنی‌دار بودن اختلاف درصورتی‌که $p<۰/۰۵$ باشد، قابل قبول درنظر گرفته شد.

یافته ها

پس از تیمار سلول‌ها با پنج غلظت مختلف اسید الائیدیک به مدت ۲۴ ساعت، میزان زنده ماندن سلول‌ها با دستگاه الایزا ریدر سنجش گردید. که مشخص گردید غلظت سمی و کشنده اسیدالائیدیک به روی سلول‌ها (غلظتی که باعث مرگ بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود) باتوجه به نتایج حاصل از آزمون MTT، غلظت ۴ mM و بالاتر است.

نتایج آزمون MTT:

غلظت‌های mM ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ اسید الائیدیک به مدت ۲۴ ساعت روی سلول‌های J744 تیمار شد، و درصد زنده ماندن سلول‌ها با آزمون MTT و بر اساس میزان جذب، توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری گردید؛ نتایج این آزمون در نمودار شماره ۱ آورده شده است.

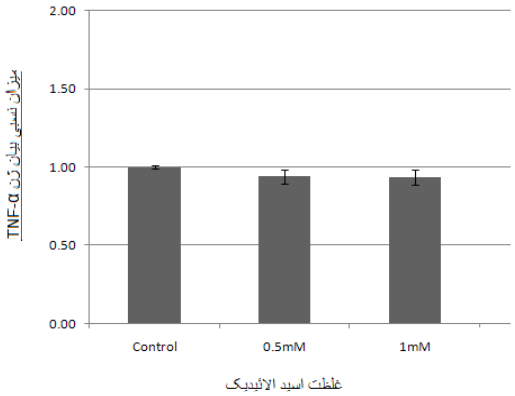


نمودار شماره ۱: نتایج آزمون MTT. غلظت های mM ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ اسید الائیدیک (EA) به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول های J744 تیمار شده و درصد زنده ماندن سلول ها با آزمون MTT بر اساس میزان جذب توسط دستگاه الایزاریدر مورد ارزیابی قرار گرفت.

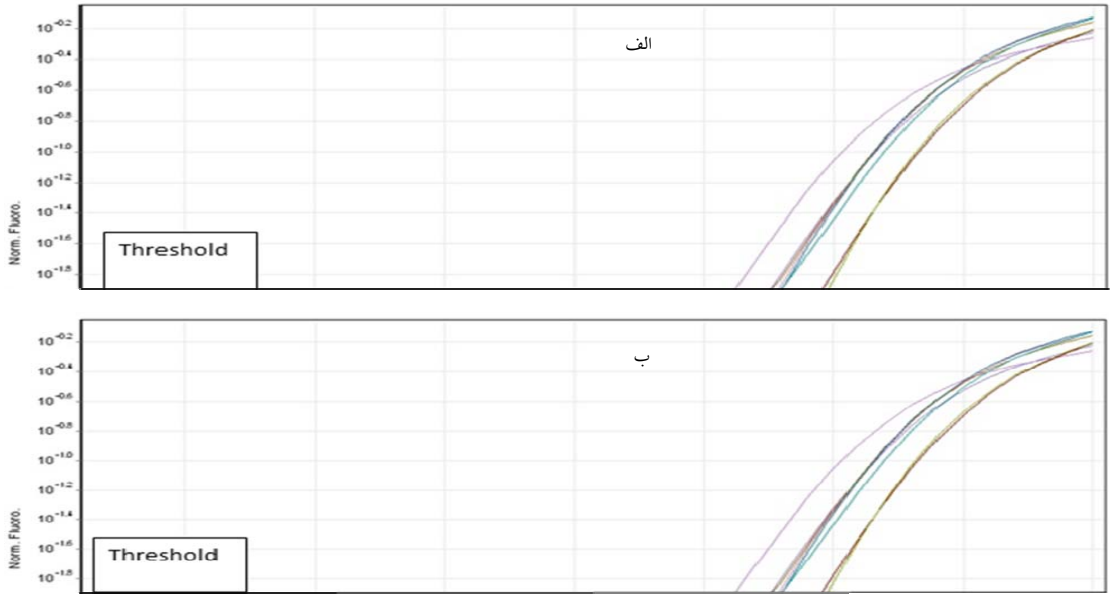
بررسی میزان بیان ژن

بیان ژن TNF-α با تکنیک Real Time PCR بررسی گردید؛ نتایج انجام این تکنیک در تصویر شماره ۱ به‌صورت منحنی‌های تکثیر ژن TNF-α و همچنین تکثیر ژن بتا-اکتین (به‌عنوان housekeeping gene) آورده شده است.

در ادامه پس از آنالیز نتایج حاصله از Real Time PCR با نرم افزار SPSS مشاهده شد که در هیچ کدام از غلظت‌های مورد استفاده اسید الائیدیک، تفاوت معنی داری بین بیان ژن در گروه‌های تیمار شده با اسیدالائیدیک درمقایسه با گروه کنترل، وجود ندارد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره۲: میزان بیان ژن TNF-α. RNA به‌دست آمده از سلول‌های J744 تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید الائیدیک، با تکنیک Real Time PCR تکثیر گردید. در هیچ‌کدام از دو غلظت، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن TNF-α در مقایسه با گروه کنترل(گروهی که تحت‌تیمار با هیچ اسیدچربی نبوده‌است) مشاهده‌نشد.



تصویر شماره ۱: الف) منحنی تکثیر ژن بتا- اکتین (housekeeping gene) ب) منحنی تکثیر ژن TNF-α

بحث

بیماری‌های قلبی عروقی اولین علت مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است. مطالعات بالینی، اپیدمیولوژیکی و آزمایشگاهی ارتباط مستقیمی بین مصرف اسیدهای چرب ترانس و بروز و یا پیشرفت آتروسکلروز را به اثبات رسانیده‌اند(۹). اما مساله درخور توجه، مکانیسم و چگونگی تاثیر این اسیدچرب بر بروز بیماری‌های قلبی عروقی است. در این باب یکی از موارد بسیار حائز اهمیت که تحقیقات گسترده‌ای را به خود اختصاص داده، التهاب و فرایندهای التهابی به عنوان یکی از مهمترین محرک‌های آغازین بروز این اختلالات است. در این زمینه مطالعه‌ای توسط Park و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت که طبق نتایج آن، اسید الائیدیک تغییرات التهابی وسیع، هیپرلیپیدمی و کبد چرب را موجب می‌شود(۱۰). از میان عوامل التهابی، TNF-α سیتوکین بسیار مهم و شناخته شده ای است که دخیل بودن آن در واکنش های التهابی به اثبات رسیده است(۱۲،۱۱)؛ لذا در این مطالعه ارتباط بین غلظت‌های ۱۰۰μm و ۲۰۰ اسید الائیدیک بر بیان ژن TNF-α در رده سلولی J744 مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعه ما نشان داد که اسید الائیدیک در هیچ‌کدام از غلظت‌های استفاده شده، تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن TNF-α ندارد. ولی این نتیجه نمی‌تواند مضر بودن این اسیدهای چرب را زیر سوال ببرد. نتیجه این بررسی با مطالعه دیگری که نشان داد مصرف اسید الائیدیک ارتباط مستقیمی با گیرنده TNF-α، و سطح IL-6 و CRP در زنان با BMI بالا دارد، مغایر است(۱۳). همچنین مطالعات تغذیه ای اثبات کرده اند که خوردن غذاهای غنی از چربی، از طریق افزایش سیتوکین‌های التهابی TNF-α، IL-6 و ICAM التهاب را تسریع نموده و موجب فعال‌سازی اندوتلیال، و در نتیجه بروز التهاب می‌شود(۱۴). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شد که مصرف TFA ارتباط مستقیمی با گیرنده TNF-α و سطح IL-6 و CRP در زنان با BMI بالا دارد(۶). درسال ۲۰۱۵ Li و همکارانش، اثر چندین غلظت اسید لینولئیک را در تحریک بیان آپو A-IV در سول‌های Caco2 مورد ارزیابی قرار دادند. این گروه چنین استنباط نمودند که به علت اثر سیتوکین‌های پیش‌التهابی بر تولید آپو A-IV، سیتوکین‌های پیش التهابی به عنوان یک مهار کننده چاقی ناشی از تغذیه و هم‌چنین بیماری‌هایی مثل آتروسکلروز عمل می‌نماید(۱۵). لذا با توجه به موارد گفته شده، و همچنین نبود یک اتفاق نظر در مورد مکانیسم عمل TFA بر آن شدیم که برای روشن شدن مکانیسم عمل این اسیدهای چرب بر بروز آتروسکلروز و بیماری‌های مرتبط، اسید الائیدیک را به عنوان مهم‌ترین TFA بر مهم‌ترین فاکتور التهابی یعنی TNF-α تیمار نماییم. در پایان انجام بررسی به دلیل عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در بیان ژن TNF-α و از طرفی با توجه به نتایج مطالعاتی که توسط دیگران صورت پذیرفته، می‌بایستی مکانیسم‌های محتمل دیگر را به عنوان مسیر غایی در بروز بیماری‌های قلبی عروقی لحاظ نمود. به طور مثال دریک بررسی مشخص گردید که TFA موجب افزایش مقاومت به انسولین، آسیب اندوتلیال، و افزایش اکسیداسیون لیپیدی می‌شود(۱۶)، که این امر می‌تواند توجیه‌کننده مکانیسم بروز یا پیشروی آتروسکلروز در اثر اسیدچرب ترانس باشد. و یا در مطالعه‌ای که Afonso و همکارانش انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که اسیدهای چرب ترانس با اختلال در هوموستاز لیپیدی ماکروفاژها، استرس اکسیداتیو و پروسه‌های التهابی را موجب می‌شود(۱۷). به عنوان مکانیسم‌های ممکن دیگر، الحاق TFA به غشای سلول‌های اندوتلیال مطرح است که توسط Schepers و همکارانش ارائه گردید(۱۸). هم‌چنین در تحقیق دیگری چنین نتیجه‌گیری شد که TFA نه از طریق تغییر بیان ژن TNF-α، بلکه با تغییر در بیولوژی TNF-α به واسطه تاثیر روی فسفولیپیدهای غشاء سلول‌های ماکروفاژی و مسیرهای سیگنالینگ، فرایندهای التهابی را فعال می‌نماید(۱۹). از طرفی ممکن است به دلیل این‌که در مطالعه حاضر از زمان تیمار ۲۴ ساعته استفاده شد،

ناکافی بودن مدت زمان تیمار علت عدم تغییر در بیان ژن TNF-α باشد. و تیمار با مدت زمان بیش‌تر مثلاً ۴۸ یا ۷۲ ساعت بتواند تغییر معنی داری در بیان این ژن ایجاد نماید. هم‌چنین دلیل عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار می‌تواند غلظت اسید الائیدیک مورد استفاده برای تیمار سلول‌ها باشد، که این امر در مطالعه‌ای که توسط Stachowska انجام شده گزارش شده است(۲۰). در انتها می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه نمی‌توان ارتباطی بین بیان ژن TNF-α و اسید الائیدیک تحت شرایط انجام شده (شرایط زمانی و غلظتی استفاده شده) در تحقیق حاضر پیدا نمود، اما با توجه به قطعیت نقش این اسیدچرب در پیشرفت و بروز آتروسکلروز، بررسی مکانیسم‌های متعدد مطرح دیگر، لازم الاجرا و حائز اهمیت است.

References

1. Patel KM, Strong A, Tohyama J, Jin X, Morales CR, Billheimer J, et al. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. Circ Res 2015; 116(5): 789-796.
2. Tabaka M. The effects of polyunsaturated fatty acids on coronary disease. JAAPA 2008; 21(5): 39-40, 42-44.
3. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK.Foam cells in atherosclerosis. Clin Chim Acta 2013; 424: 245-252.
4. Sampath H, Ntambi JM.Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu Rev Nutr 2005; 25: 317-340.
5. Benatar JR, Gladding P, White HD, Zeng I, Stewart RA. Trans-fatty acids in New Zealand patients with coronary artery disease. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2011; 18(4): 615-620.
6. Soto-Vaca A, Losso JN, McDonough K, Finley JW. Differential effect of 14 free fatty acids in the expression of inflammation markers on human arterial coronary cells. J Agric Food Chem 2013; 61(42): 10074-10079.
7. Lorton D, Bellinger DL. Molecular mechanisms underlying β-adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. Int J Mol Sci 2015; 16(3): 5635-5665.
8. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22(5): 717-726.
9. Siddiqui RA, Harvey KA, Ruzmetov N, Miller SJ, Zaloga GP. N-3 fatty acids prevent whereas trans-fatty acids induce vascular inflammation and sudden cardiac death. Br J Nutr 2009; 102(12): 1811-1819.
10. Park KH, Kim JM, Cho KH. Elaidic acid (EA) generates dysfunctional high-density lipoproteins and consumption of EA exacerbates hyperlipidemia and fatty liver change in zebrafish. Mol Nutr Food Res 2014; 58(7): 1537-1545.
11. Bendsen NT, Stender S, Szecsi PB, Pedersen SB, Basu S, Hellgren LI, et al. Effect of industrially produced trans fat on markers of systemic inflammation: evidence from a randomized trial in women. J Lipid Res 2011; 52(10): 1821-1828.
12. Mozaffarian D, Rimm EB, King IB, Lawler RL, McDonald GB, Levy WC. Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. Am J Clin Nutr 2004; 80(6): 1521-1525.
13. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al.

Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. Am J Clin Nutr 2004; 79(4): 606-612.

14. Peluso I, Raguzzini A, Villano DV, Cesqui E, Toti E, Catasta G, et al. High fat meal increase of IL-17 is prevented by ingestion of fruit juice drink in healthy overweight subjects. Curr Pharm Des 2012; 18(1): 85-90.
15. Li X, Xu M, Liu M, Ji Y, Li Z. TNF-alpha and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco2 cells. J Inflamm (Lond) 2015; 12: 22.
16. Frohnert BI, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Moran A, Steffen LM, Sinaiko AR. Relation between serum free fatty acids and adiposity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors from adolescence to adulthood. Diabetes 2013; 62(9): 3163-3169.
17. Afonso Mda S, Castilho G, Lavrador MS, Passarelli M, Nakandakare ER, Lottenberg SA, et al. The impact of dietary fatty acids on macrophage cholesterol homeostasis. J Nutr Biochem 2014; 25(2): 95-103.
18. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, et al. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26(9): 2063-2069.
19. Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. Hypertension 2003; 41(3 Pt 2): 834-841.
20. Stachowska E, Jamioł D, Chlubek D. Trans fatty acids and their role in inflammation and cardiovascular diseas. Ann Acad Med Stetin 2010; 56(3): 30-38