

علی اکبر هاشم زاده، نیلوفر شفیعی ثابت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی،
دانشکده فناوری های نوین، گروه بیوشیمی
طاهره ناجی، استاد راهنما و مدیر گروه علوم سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

بررسی اثر اسیدهای چرب امگا-۳ بر سطح بیان ژن PPAR- γ در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک

خون بالا، از عواملی هستند که بروز بیماری قلبی عروقی را افزایش می دهد (۱). عوامل پیش التهابی نیز، به احتمال بروز سندرم کمک خواهد کرد و خطر ابتلا به بیماری های قلبی عروقی و دیابت نوع ۲ را افزایش می دهد. اگرچه مواضع قوی برای این سندرم وجود دارد، ولی همچنان علت آن هنوز کاملاً حل و فصل نشده است (۶). اسید چرب امگا-۳ یک اسید چرب ضروری با سه باند دوگانه است که در بیماری های مختلف از جمله بیماری قلبی-عروقی، سرطان و التهاب به طور گسترده استفاده می شود (۷). برپایه ی گزارش هایی: دریافت اسید چرب امگا-۳، کارایی گلوکز را در بافت های محیطی در موش ها افزایش داده است (۸). همچنین تجویز روغن ماهی غنی از امگا-۳، پیشرفت دیابت را در افرادی که قبلاً عدم تحمل گلوکز داشتند به تاخیر انداخته است (۹). علیرغم اینکه مدارک موجود، اثرات مفید امگا-۳ بر افزایش عملکرد انسولین و بهبود تحمل گلوکز در انسان را نشان داده اند (۱۰)، با این وجود بر اساس جستجوی محققان مطالعه، هیچ گزارش کارآزمایی بالینی مبنی بر اثر امگا-۳ از روغن بذر کتان بر پروفایل های متابولیک در بیماران قلبی کرونر یافت نشده است. در یک مطالعه توسط Hutchins و همکاران نشان داده شد که دریافت بذر کتان غنی از اسید چرب امگا-۳ در زنان و مردان چاق مبتلا به پره دیابت منجر به کاهش سطوح انسولین و مقاومت به انسولین شده است (۱۱). در یک مطالعه دیگر، دریافت روزانه ۴ کپسول امگا-۳ در زنان مبتلا به سندروم پلی کیستیک تخمدان با اضافه وزن و چاق برای مدت ۱۲ هفته منجر به کاهش سطوح انسولین و مقاومت به انسولین شده است. در تعدادی مطالعه چنین اثرات مفید

هدف از انجام این بررسی سنجش کارایی مکمل باری روغن بذر کتان بر اندازه ی بیان ژن های وابسته به انسولین، لیپید و التهاب در بیماران چاق دچار به دیابت نوع ۲ دارای بیماری عروق کرونر قلبی بود. روش کار: این پژوهش کارآزمایی بالینی کنترل شده- پلاسبو دو سوکور بر روی ۶۰ بیمار دیابتی مبتلا به بیماری عروق کرونر قلب انجام شده است. شرکت کنندگان، به طور تصادفی، برای مصرف مکمل روغن بذر کتان دارای اسید های چرب امگا ۳ یا پلاسبو تقسیم شدند. افراد در گروه دریافت کننده امگا ۳ ($n=30$) ۱۰۰۰ میلی گرم امگا ۳ حاوی ۴۰۰ میلی گرم آلفا لینولنیک اسید دو بار در روز و افراد در گروه پلاسبو ($n=30$)، دارونما برای ۱۲ هفته دریافت نمودند. بیان ژن های مربوطه از سلول های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از تکنیک PCR-RT اندازه گیری شد.

نتایج: یافته های PCR-RT نشان داد، تجویز روغن بذر کتان بیان ژن PPAR- γ را در سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) افراد دیابتی مبتلا به بیماری عروق کرونر قلب را افزایش (۰/۰۲ = P) داد.

سندرم متابولیک یک اختلال شایع متابولیک است که موجب افزایش شیوع چاقی می شود (۱). مقایسه شیوع برای جمعیت های مختلف، با وجود تلاش های بسیاری که برای به دست آوردن مقدار آن شده، دشوار است. میزان شیوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مطالعه ای شیوع سندرم متابولیک، در بین زنان ایرانی ۲۰-۲۵ سال، حدود ۴۳٪ در است (۲). شیوع در ایران، برای زنان و مردان در گروه سنی ۲۰-۲۹ سال، کمتر از ۱۰٪ بوده که در گروه سنی ۶۰-۶۹ سال، برای مردان به ۳۸٪ و برای زنان به ۶۷٪ افزایش یافته است (۳). به نظر می رسد مقاومت به انسولین، یکی از عوامل اختلال باشد (۱). این سندرم، به عنوان سندرم X (۴) و سندرم مقاومت به انسولین (۵) نیز شناخته می شود. گروهی از کاستی های متابولیک، همانند عدم تحمل به گلوکز (دیابت نوع ۲، اختلال در تحمل گلوکز، و یا اختلال Fasting Gly-cemia)، مقاومت به انسولین، چاقی، چربی خون و فشار

از مکمل یاری امگا-۳ بر روی متابولیسم انسولین مشاهده نشد. به عنوان نمونه، مکمل یاری با ۳ گرم روغن ماهی روزانه در افراد مبتلا به HIV نتوانست عملکرد انسولین را بهبود بخشد (۱۲). به علاوه، مکمل یاری با ۵/۲ گرم روزانه روغن ماهی در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ چاق بعد از گذشت ۴ هفته نتوانست بر روی پارامترهای عملکرد انسولین تاثیر بگذارد (۱۳).

ژن *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) در بافت چربی، کولون و ماکروفاژ بیان می شود و در ذخیره سازی چربی و متابولیسم گلوکز شرکت می کند (۱۴). در یک مطالعه دیگر، امگا-۳ E از طریق تاثیر بر KB-NF و فعالیت تیروزین کیناز یک نقش اساسی ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و همچنین از طریق تاثیر بر سطوح بیان ژن PPAR- γ ، باعث افزایش حساسیت به انسولین و بهبود پروفایل های متابولیک شود (۱۶).

در مجموع، مکانیسم دقیقی در مورد اثر اسید چرب امگا-۳ بر روی پروفایل های متابولیک ارائه نشده است. با این وجود، گزارشات قبلی نشاندهنده این موضوع است که اسید چرب امگا-۳ ممکن است از طریق افزایش آدیپونکتین و کاهش فاکتورهای التهابی باعث کاهش مقاومت به انسولین و بهبود پروفایل های متابولیک شود (۱۷-۱۹). آدیپونکتین از طریق افزایش فعالیت پروتئین کیناز فعال شده AMP (AMPK) باعث افزایش کارایی گلوکز در بافت ها شود (۲۰). به علاوه AMPK، گلوکونئوزنز در کبد را مهار و ورود گلوکز به عضلات را تسریع می کند (۲۱). با توجه به عوارض سندروم متابولیک بر بیماری عروق کرونری قلب، به منظور کاهش مشکل و همچنین با توجه به اینکه اطلاعات کمی در مورد تاثیر مصرف ترکیب امگا-۳ بر آن وجود دارد و با عنایت به اثرات متفاوت دریافت ترکیب امگا-۳ و بر سطوح بیان بر روی سطوح بیان ژن SOD، GLUT1، PPAR- γ ، TNF- α و IL-6 در بیماران مبتلا به دیابت و بیماران عروق کرونری، این مطالعه با هدف تعیین اثربخشی دریافت ترکیب امگا-۳ بر سطوح بیان بر روی سطوح بیان ژن PPAR- γ در بیماران مبتلا به دیابت و بیماران عروق کرونر مراجعه کننده به مطب دکتر رایگان در سال ۱۳۹۵ طراحی شده است.

مرور ادبیات و سوابق مربوطه

اگرچه مواضع قوی برای این سندرم وجود دارد، ولی همچنان علت آن هنوز کاملاً حل و فصل نشده است (۶).

تعدادی مطالعه نشان داده اند که دریافت اسید چرب امگا-۳، کارایی گلوکز را در بافت های محیطی در موش ها افزایش داده است (۸).

✓ همچنین تجویز روغن ماهی غنی از امگا-۳، پیشرفت دیابت را در افرادی که قبلاً عدم تحمل گلوکز داشتند به تاخیر انداخته است (۹).

✓ علیرغم اینکه مدارک موجود، اثرات مفید امگا-۳ بر افزایش عملکرد انسولین و بهبود تحمل گلوکز در انسان را نشان داده اند (۱۰)، با این وجود بر اساس جستجوی محققین هیچ گزارش کارآزمایی بالینی مبنی بر اثر امگا-۳ از روغن بذر کتان بر پروفایل های متابولیک یافت نشده است. ✓ در یک مطالعه توسط Hutchins و همکاران نشان داده شد که دریافت بذر کتان غنی از اسید چرب امگا-۳ در زنان و مردان چاق مبتلا به پره دیابت منجر به کاهش سطوح انسولین و مقاومت به انسولین شده است (۱۱).

✓ در یک مطالعه دیگر، دریافت روزانه ۴ کپسول امگا-۳ در زنان مبتلا به سندروم پلی کیستیک تخمدان با اضافه وزن و چاق برای مدت ۱۲ هفته منجر به کاهش سطوح انسولین و مقاومت به انسولین شده است.

✓ در تعدادی مطالعه چنین اثرات مفید از مکمل یاری امگا-۳ بر روی متابولیسم انسولین مشاهده نشد. بعنوان نمونه، مکمل یاری با ۳ گرم روغن ماهی روزانه در افراد مبتلا به HIV نتوانست عملکرد انسولین را بهبود بخشد (۱۲). ✓ مکمل یاری با ۵/۲ گرم روزانه روغن ماهی در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ چاق بعد از گذشت ۴ هفته نتوانست بر روی پارامترهای عملکرد انسولین تاثیر بگذارد (۱۳).

روش کار

شرکت کنندگان با رضایت آگاهانه کتبی وارد مطالعه می شوند. سپس به صورت تصادفی برای مصرف امگا-۳ یا پلاسبو به مدت ۱۲ هفته تخصیص می یابند. مصرف داروهای استاندارد و تعدیل کننده بیماری مانند اینترفرون و گلاتیرامرستات در کنار مصرف مکمل ها ادامه خواهد داشت. تمامی بیماران به طور روزانه مکملها را دریافت می کنند. میزان پیروی و همکاری در مصرف مکمل ها به صورت هفتگی توسط مصاحبه تلفنی بررسی خواهد شد. همچنین ۱۰ میلی لیتر نمونه خون ناشتا در ابتدا و انتهای مطالعه از بیماران گرفته

می شود تا برای استخراج سلول ها و ژن های مورد نظر و ارزیابی سطح بیان ژن ها مورد ارزیابی قرار گیرد. تعداد بیماران گروه مورد آزمایش ۲۵ نفر و گروه کنترل نیز ۲۵ نفر است. همچنین نمونه ها در مرکز درمانی شهید بهشتی کاشان جمع آوری گردیده است.

سطح بیان ژن ها در مطالعه حاضر از طریق تکنیک **Real-time PCR** به روش زیر انجام می شود:

۱- جداسازی لئوسیت و مونوسیت ها با کمک محلول فایکول: خون تام که حاوی EDTA ۵ درصد است را به آرامی بر روی محلول فایکول قرار داده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۵۰ g سانتریفوژ می کنیم. سپس لئوسیت ها و مونوسیت های قرار گرفته در حد فاصلی فایکول و پلاسما را استخراج و با محلول PBS چندین بار شستشو می دهیم.

۲- به سلول های استخراج شده، محلول RNA plus-X افزوده و RNA سلول ها را با روش مربوط به کیت ها استخراج می کنیم.

۳- تبدیل RNA به cDNA

RNA استخراج شده را با کمک PCR-RT تبدیل به cDNA می کنیم و نمونه را در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگه داری می کنیم.

۴- پرایمرهای ژن های مربوط و ژن Houskeeping را تهیه می کنیم.

۵- پرایمرها را با نرم افزار Blast بررسی می نمایم.

۶- میزان بیان هر یک از ژن ها را با روش RT-PCR می سنجیم.

۷- میزان بیان هر یک از ژن ها را با فرمول Paffafi محاسبه می کنیم.

توالی های پرایمری مورد استفاده در جدول بالا گزارش شده است و ژن GAPDH بعنوان ژن Housekeeping gene انتخاب شده است.

در مطالعه حاضر، پس از استخراج گلوبول های سفید، بلافاصله نمونه ها که عاری از هر گونه بافر و یا محلول شستشو PBS می باشد در فریزر ۸۰- نگهداری می شوند. نمونه ها با استفاده از کیت RNX-PLUS از شرکت سیناژن استخراج می گردد و سپس نمونه ها تبدیل به cDNA (حداکثر یک هفته بعد از استخراج RNA) می شوند و در نهایت در فریزر ۸۰- نگهداری می شوند. میزان بیان ژن ها با استفاده از کیت Amplicon و با استفاده از دستگاه Real-time PCR و بصورت نسبی سنجیده می شود. از آنجایی که ژن های GLUT 1 و PPAR γ در مسیر انتقال گلوکز و عملکرد انسولین اهمیت دارند لذا در مطالعه حاضر، از این ژن ها استفاده شد.

روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

در این مطالعه، برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد استفاده قرار می گیرد. جهت آزمون

Gene	Primer	Product size (bp)	Annealing temperature (C)
GAPDH	F:	126	61.3
	AAGCTCATTTCCTGGTATGACAACG R: TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG		
PPAR- γ	F: ATGACAGACCTCAGACAGATTG	210	54
	R: AATGTTGGCAGTGGCTCAG		
GLUT-1	F: TATCTGAGCATCGTGGCCAT	238	62.1
	R: AAGACGTAGGGACCACACAG		
Lp(a)	F: GACACAGCACGTTTCATCCA	200	55
	R: ACACCCCCCTACAATGCTTC		
Ox-LDL	F: ACTTACGGACAGACAGACAG	223	57
	R: GGCCACACATCCCATGATTC		
IL-1	F: GCTTCTCTCTGGTCTTGG	174	56
	R: AGGGCAGGGTAGAGAAGAG		
IL-8	F: GCAGAGGGTTGTGGAGAAGT	150	56
	R: ACCCTACAACAGACCCACAC		
TNF- α	F: GTCAACCTCCTCTGCCAT	188	52
	R: CCAAAGTAGACCTGCCCAGA		
TGF- β	F: TTGAGACTTTTCCGTTGCCG	227	56
	R: CGAGGTCTGGGGAAAAGTCT		

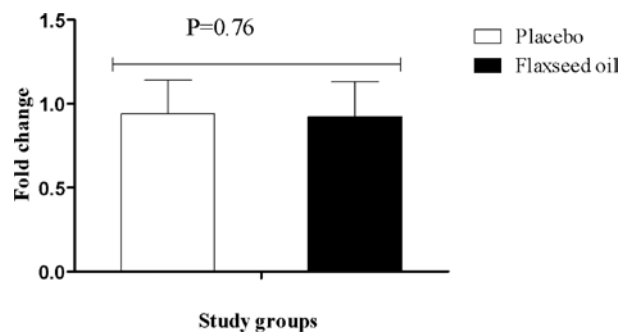
برای تبعیت داده‌ها از توزیع نرمال، از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده می‌شود.

۱- داده‌های کمی بصورت میانگین و انحراف معیار بیان می‌شود.

۲- برای مقایسه سطوح بیان ژن‌های مرتبط در زمان شروع مداخله و پایان مداخله (۲۱ هفته بعد) بین دو گروه مصرف‌کننده مکمل و پلاسبو از آزمون t مستقل و در هر گروه از آزمون t زوجی استفاده می‌شود.

نتایج

یافته‌های مربوط به سطوح بیان ژن PPAR- γ در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و بیماری عروق کرونر قلب



در مطالعه‌ی حاضر ما نشان دادیم که مکمل یاری روغن بذر کتان در مقایسه با پلاسبو توانست سطوح بیان ژن PPAR- γ را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران دیابتی دارای بیماری عروق کرونر قلب به طور معنی داری افزایش ($P=0/02$) دهد. (شکل ۱-۳)

بحث

- اثر مکمل یاری روغن بذر کتان بر سطوح بیان ژن‌های مربوط به انسولین در بیماران دیابتی مبتلا به بیماری عروق کرونر قلب

PPAR- γ دارای نقش‌های مختلفی از جمله، عملکرد و تمایز سلول‌های چربی، متابولیسم انسولین و لیپید، ذخیره‌ی چربی در سلول‌های چربی و پاسخ به گلوکز می‌باشد [۲۳]. تعدادی مطالعه‌ی تجربی نشان داده‌اند که فعال شدن PPAR- γ توسط تیاژولیدین دیون‌ها تقسیم و حرکت سلول‌های عضلانی صاف را مهار می‌کند [۲۴، ۲۵]. به علاوه در یک مطالعه‌ی دیگر گزارش شده است که PPAR- γ در تسریع حساسیت سلولی از طریق بیان بیش از حد ژن

p16INK در فیبروبلاست‌های دیپلوئیدی انسانی نقش مهمی دارد [۲۶]. یافته‌های ما در بیماران دیابتی مبتلا به بیماری عروق کرونر قلب نشان داد که مکمل یاری روغن بذر کتان به مدت ۱۲ هفته سطوح بیان ژن PPAR- γ را در مقایسه با پلاسبو افزایش داد. مکمل یاری اسیدهای چرب امگا ۳ در رژیم غذایی دارای ویتامین B12 ناکافی در مدل حیوانی بیان ژن PPAR- γ را نرمال کرد [۲۷]. ما در مطالعه‌ی قبلی خود نشان دادیم که مکمل یاری اسیدهای چرب امگا ۳ از طریق روغن بذر کتان با دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم ۲ بار در روز به مدت ۱۲ هفته در زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک به طور معنی داری سطوح بیان ژن PPAR- γ را بهبود بخشید [۲۸]. در یک مطالعه‌ی دیگر، مکمل یاری اسیدهای چرب امگا ۳ در افرادی که دارای رژیم غذایی فقیر از فولیک اسید و ویتامین B12 بودند، سطوح PPAR- γ و PPAR- α را نرمال کرد [۲۹]. اگرچه در مطالعه‌ی سطوح بیان ژن مربوط به PPAR- γ تحت تاثیر مکمل یاری روغن ماهی غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) حاوی ۱۴۵۰ میلی‌گرم DHA و ۴۰۰ میلی‌گرم EPA، در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ به مدت ۸ هفته قرار نگرفت [۳۰]. به علاوه مکمل یاری EPA نتوانست سطوح بیان ژن PPAR- γ را در سلول‌های رحم گاو به طور معنی داری افزایش دهد [۳۱]. هیپرگلیسمی و مقاومت انسولینی در بیماران دیابتی دارای اضافه وزن در پیشرفت آترواسکلروزیس و اختلالات مربوط به آن نقش اساسی را بازی می‌کنند [۳۲]. به علاوه کاهش بیان ژن PPAR- γ دارای نقش کلیدی در پاتولوژی بیماری‌های مختلفی از جمله دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان دارد [۳۳].

بنابراین افزایش سطوح بیان ژن PPAR- γ به وسیله‌ی روغن بذر کتان ممکن است باعث کاهش واقع قلبی-عروقی مرتبط با متابولیسم انسولین شود. گزارش شده است که گیرنده‌های پرزی شکل (TLRs) محرک‌های التهابی هستند که می‌توانند PPAR- γ را تنظیم کنند [۳۴]. گیرنده‌های پرزی شکل یک گروه اصلی از خانواده‌های گیرنده‌های الگوی شناختی هستند که الگوهای مولکولی مربوط به پاتوژن را تشخیص می‌دهند [۳۵]. گیرنده‌های پرزی شکل اصلی شامل TLR۲ و TLR۴ هستند که NF- κ B را فعال می‌کنند، که به عنوان یک فاکتور رونویسی و

H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010;142(5):687-98.

11. Hutchins AM, Brown BD, Cunnane SC, Dimitrovich SG, Adams ER, Bobowiec CE. Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study. *Nutr Res*. 2013;33(5):367-75.

12. Oliveira JM, Rondo PH, Yudkin JS, Souza JM, Pereira TN, Catalani AW, et al. Effects of fish oil on lipid profile and other metabolic outcomes in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized placebo-controlled trial. *Int J STD AIDS*. 2014;25(2):96-104.

13. Crochemore IC, Souza AF, de Souza AC, Rosado EL. omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation does not influence body composition, insulin resistance, and lipemia in women with type 2 diabetes and obesity. *Nutr Clin Pract*. 2012;27(4):553-60.

14. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6207-12.

16. Bozaykut P, Karademir B, Yazgan B, Sozen E, Siow RC, Mann GE, et al. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:174-81.

17. Mohammadi E, Rafraf M, Farzadi L, Asghari-Jafarabadi M, Sabour S. Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2012;21(4):511-8.

18. Kondo K, Morino K, Nishio Y, Kondo M, Fuke T, Ugi S, et al. Effects of a fish-based diet on the serum adiponectin concentration in young, non-obese, healthy Japanese subjects. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010;17(6):628-37.

19. Boudouris G, Verginadis II, Simos YV, Zouridakis A, Ragos V, Karkabounas SC, et al. Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. *International urology and nephrology*. 2013;45(4):1137-44.

20. Higuchi T, Shirai N, Saito M, Suzuki H, Kagawa Y. Levels of plasma insulin, leptin and adiponectin, and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*. 2008;19(9):577-86.

یک محرک بالقوه برای رونبسی از ژن های سیتوکاین های پیش التهابی مختلف همچون IL-6 و TNF- α است [۳۶].

اسید های چرب به طرز متفاوتی فعال شدن گیرنده های پرزی شکل را تنظیم می کنند. گیرنده های TLR2 و TLR4

می توانند توسط اسید های چرب اشباع فعال شوند اما توسط اسید های چرب امگا ۳ به ویژه DHA مهار شوند [۳۵].

با این حال مکانیسم مولکولی که از طریق آن اسید های چرب فعال شدن گیرنده های پرزی شکل را تنظیم می کنند

هنوز ناشناخته می باشند. یافته های مطالعات قبلی نشان داده اند که مولکول هدف در مهار فعال شدن TLR4 توسط

اسید های چرب امگا ۳ خود گیرنده است یا وقایع بعدی است که باعث فعال شدن TLR4 می شوند [۳۷، ۳۸]. به

علاوه افزایش بیان PPAR- γ توسط اسید های چرب امگا ۳ می تواند به علت فعال کردن تولید PPAR- γ باشد [۳۹، ۴۰].

فعال شدن PPAR- γ می تواند باعث مهار فعالیت رونبسی

κB-NF که از طریق TNF- α و IL-1 β ایجاد شده باشد، در سلول های عضلات اسکلتی شود [۴۱].

منابع:

1. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet*. 365(9468):1415-28.

2. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2004;33(2):351-75.

3. Azizi F, Salehi P, Etemadi A, Zahedi-Asl S. Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes research and clinical practice*. 2003;61(1):29-37.

4. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.

5. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care*. 1991;14(3):173-94.

6. Reaven GM. Insulin Resistance, Cardiovascular Disease, and the Metabolic Syndrome How well do the emperor's clothes fit? *Diabetes care*. 2004;27(4):1011-2.

7. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012;308(10):1024-33.

8. Lardinois CK, Starich GH. Polyunsaturated fats enhance peripheral glucose utilization in rats. *J Am Coll Nutr*. 1991;10(4):340-5.

9. Feskens EJ, Bowles CH, Kromhout D. Inverse association between fish intake and risk of glucose intolerance in normoglycemic elderly men and women. *Diabetes Care*. 1991;14(11):935-41.

10. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga