

موضوع صفحه

فصل اول : تئوری پژوهش

- ۱-۱ مقدمه ۱
- ۱-۲ ترکیبات گلبول قرمز ۳
- ۱-۳ الیپدهای غشایی ۳
- ۱-۴ ترکیبات لیپیدی ۳
- ۱-۵ ویژگی لیپیدهای موجود در غشاها ۴
- ۱-۶ اغشاء سلولی گلبول قرمز ۵
 - ۱-۶-۱ افسفولیپیدها ۶
 - ۱-۶-۲ گلیکولیپیدها ۹
 - ۱-۶-۳ کلسترول ۱۰
- ۱-۷ اسیدهای چرب ۱۱
- ۱-۸ انواع اسیدهای چرب ۱۲
 - ۱-۸-۱ اسیدهای چرب اشباع ۱۲
 - ۱-۸-۲ اسیدهای چرب یا تک پیوند دوگانه ۱۳
 - ۱-۸-۳ اسیدهای چرب دارای حلقه‌های اشباع نشده ۱۴

فهرست مطالب

موضوع	صفحه
۹-۱ خواص فیزیکی و شیمیایی اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶	۱۵
۱۰-۱ نامگذاری استاندارد اسیدهای چرب به روش IUPAC	۲۰
۱۱-۱ نامگذاری اختصاری اسیدهای چرب	۲۰
۱۲-۱ تاریخچه پیدایش امگا ۳	۲۱
۱۳-۱ اثر اسیدهای چرب امگا ۳ بر سلامت انسان	۲۲
۱۴-۱ اثر EPA و DHA بر خلق و خوی انسان	۲۳
۱۵-۱ افسردگی و دو قطبی شخصیتی	۲۴
۱۶-۱ انواع افسردگی	۲۴
۱۷-۱ موادی که باعث افزایش افسردگی می شوند	۲۵
۱۸-۱ ارتباط اسیدهای چرب EPA و DHA در مغز انسان	۲۶
۱۹-۱ سروتونین و دوپامین	۲۶
۲۰-۱ ارتباط بین اسیدهای چرب EPA و DHA با میزان سروتونین و دوپامین در مغز	۲۸
۲۱-۱ روشهای آنالیز اسیدهای چرب	۳۰
۱-۲۱-۱ کروماتوگرافی گازی	۳۰

فهرست مطالب

موضوع.....	صفحه
۱-۲۱-۲ کروماتوگرافی کاغذی (TLC).....	۳۱
۱-۲۱-۳ روشهای Spectroscopy.....	۳۱
۱-۲۲ کلیاتی در باره کروماتوگرافی گازی.....	۳۲
۱-۲۲-۱ گاز حامل (فاز متحرک).....	۳۳
۱-۲۲-۲ ادريچه‌های کنترل کننده فشار و سرعت جریان گاز.....	۳۳
۱-۲۲-۳ محل تزریق (injector).....	۳۳
۱-۲۲-۴ قسمت حرارتی (oven).....	۳۴
۱-۲۲-۵ آشکارساز (detector).....	۳۵
۱-۲۲-۵-۱ آشکارساز یونیزان شعله (Flame Ionization Detector) FID.....	۳۶
۱-۲۲-۵-۲ آشکارساز طیف سنج جرمی (mass spectrometry detector).....	۳۷
۱-۲۲-۶ فاز ساکن و ستون.....	۳۸
۱-۲۲-۶-۱ استونهای پر شده (Packed).....	۳۸
۱-۲۲-۶-۲ استونهای مویی (Capillary).....	۳۹
۱-۲۲-۷ دستگاه ثبات.....	۴۰

فهرست مطالب

موضوع.....	صفحه
۲۳-۱ مقدمه‌ای بر کمومتری کس.....	۴۱
۲۳-۱-۱ روشهای کمومتری کس.....	۴۲
۲۳-۲ مقدمه‌ای بر Classification.....	۴۲
۲۳-۳-۱ اهداف از Classification.....	۴۳
۲۴-۱ تئوری SIMCA.....	۴۳

فصل دوم : آنالیز اسیدهای چرب

۲-۱ اهداف پژوهشی.....	۴۸
۲-۲ فرضیات پژوهشی.....	۴۸
۲-۳ روش تحقیق.....	۴۹
۲-۴ محیط پژوهش.....	۴۹
۲-۵ روش نمونه گیری.....	۴۹
۲-۴-۱ گروه بیماران.....	۵۰
۲-۴-۲ گروه شاهد.....	۵۰
۲-۶ نمونه گیری خون.....	۵۱

فهرست مطالب

موضوع	صفحه
۲-۷ تعیین اسیدهای چرب نمونه ها	۵۱
۲-۷-۱ وسایل و مواد مورد استفاده	۵۲
۲-۷-۲ حلالها	۵۳
۲-۷-۳ سایدستگاه ها و لوازم آزمایشگاهی مورد استفاده	۵۴
۲-۷-۴ مواد استاندارد	۵۴
۲-۸ آماده سازی محلولها و استانداردها	۵۵
۲-۹ آماده سازی نمونه های گلبول قرمز برای تزریق به دستگاه GC	۵۶
۲-۹-۱ جداسازی گلبول های قرمز	۵۶
۲-۹-۲ استخراج و خالص سازی	۵۷
۲-۱۰ روشهای استخراج با استفاده از ANOV A	۶۰
۲-۹-۳ مرحله مشتق سازی	۶۲
۲-۹-۳-۱ مشکلات مشتق سازی	۶۴
۲-۹-۴ مرحله پیش تغلیظ	۶۵
۲-۱۰ خلاصه مراحل آماده سازی نمونه های گلبول قرمز	۶۵
۲-۱۱ کروماتوگرافی روی ستون کاپیلاری	۶۶
۲-۱۲ بررسی سیستم گاز کروماتوگرافی و آماده سازی ستون	۶۶
۲-۱۲-۱ آماده سازی ستون (column conditioning)	۶۸

فهرست مطالب

موضوع	صفحه
۲-۱۲-۲ تعیین پارامترهای کروماتوگرافی	۶۸
۲-۱۲-۳ تنظیم درجه Split تزریق	۶۸
۲-۱۳ مراحل انجام کار جهت تهیه منحنی کالیبراسیون مربوط به هر یک از استانداردها	۷۲

فصل سوم : بحث و بررسی داده ها

۳-۱ روش تجزیه و تحلیل داده ها	۷۳
۳-۱-۱ تهیه استاندارد کاری (working standard)	۷۳
۳-۱-۲ تهیه منحنی کالیبراسیون مربوط به دو اسید چرب EPA و DHA	۷۴
۳-۲ آنالیز نمونه های حقیقی	۷۸
۳-۳ تجزیه و تحلیل نتایج	۹۰
۳-۳-۱ بررسی کمی نتایج	۹۱
۳-۴ حد تشخیص روش	۹۴
۳-۵ محاسبه انحراف استاندارد نسبی روش	۹۶
۳-۶ دسته بندی گروه های بررسی شده با استفاده از روش کمومتریکس	۹۷
۳-۶-۱ مدل PCA	۹۸
۳-۶-۱-۱ تشکیل مدل PCA برای گروه اول (گروه شاهد)	۱۰۴

فهرست مطالب

موضوع	صفحه
۳-۶-۱-۲ تشکیل مدل PCA برای گروه دوم (افراد افسرده).....	۱۰۶
۳-۶-۱-۳ تشکیل مدل PCA برای گروه سوم (افراد خود کشی کرده).....	۱۰۸
۳-۶-۲ ارزیابی مدل PCA	۱۱۰
۳-۶-۳ بررسی داده های مجهول با استفاده از مدل PCA	۱۱۳
۳-۷ نتیجه گیری.....	۱۱۵
مراجع	۱۱۶

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ نمائی کلی از فسفو لیپیدها که بصورت دو لایه ای هستند	۶
شکل ۱-۲ بخشهای مختلف فسفو لیپیدها	۷
شکل ۱-۳ بخشهای قطبی و غیر قطبی فسفو لیپیدها	۸
شکل ۱-۴ ساختار گلیکو لیپید	۹
شکل ۱-۵ ساختار کلسترول	۱۰
شکل ۱-۶ ساختار کلی لیپیدهای غشائی	۱۱
جدول ۱-۱ مقدار برخی از اسیدهی چرب اشباع بصورت درصدی از کت چربیها	۱۳
جدول ۱-۲ میزان انواع اسیدهی چرب در هر کدام از منابع حیوانی و گیاهی	۱۷
جدول ۱-۳ انواع مهم اسیدهی چرب امگا ۶	۱۸
جدول ۱-۴ انواع مهم اسیدهی چرب امگا ۳	۱۹
شکل ۱-۷ ساختار شیمیایی سروتونین و دوپامین	۲۸
شکل ۱-۸ نمائی از دستگاه گاز کروماتوگرافی	۳۲
شکل ۱-۹ نمائی از injector	۳۴
شکل ۱-۱۰ نمائی کلی از oven	۳۵
شکل ۱-۱۱ نمائی از آشکارساز FID	۳۶
شکل ۱-۱۲ نمائی از دتکتور طیف سنج جرمی	۳۷
شکل ۱-۱۳ نمائی از ستونهای پرشده	۳۹
شکل ۱-۱۴ نمائی از ستونهای موئی	۳۹

عنوان	صفحه
جدول ۲-۵ مقایسه نتایج بدست آمده از استخراج لیپیدها با سه روش	۶۰
شکل ۲-۱۵ مقدار کمی هر سه روش استخراج	۶۱
شکل ۲-۱۶ نمائی کلی از دستگاه Split	۶۹
شکل ۳-۱۷ کروماتوگرام مخلوط ۳۷ جزء استاندارد 3ppm از جمله EPA و DHA	۷۵
شکل ۳-۱۸ کروماتوگرام مخلوط ۳۷ جزء استاندارد 15ppm از جمله EPA و DHA	۷۶
شکل ۳-۱۹ منحنی کالیبراسیون مربوط به EPA	۷۷
شکل ۳-۲۰ منحنی کالیبراسیون مربوط به DHA	۷۸
شکل ۳-۲۱ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl نمونه شاهد با کد ۱۳	۸۰
شکل ۳-۲۲ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl نمونه شاهد با کد ۲۳	۸۰
شکل ۳-۲۳ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl نمونه افسرده با کد ۹	۸۱
شکل ۳-۲۴ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl نمونه افسرده با کد ۴	۸۱
شکل ۳-۲۵ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl خودکشی کرده شاهد با کد ۹۹	۸۲
شکل ۳-۲۶ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl نمونه خودکشی کرده با کد ۵۳	۸۲
شکل ۳-۲۷ کروماتوگرام مربوط به تزریق ۱μl مخلوط نمونه خودکشی کرده با کد ۵۳ و استاندارد	
تک EPA و DHA	۸۳
جدول ۳-۶ مقدار EPA و DHA مربوط به نمونه های گروه شاهد	
بر حسب mg/100mg total lipid	۸۴

عنوان	صفحه
جدول ۷-۳ مقدار EPA و DHA مربوط به نمونه های گروه افسرده	
بر حسب mg/100mgtotal lipid	۸۶
جدول ۸-۳ مقدار EPA و DHA مربوط به نمونه های گروه خودکشی کرده	
بر حسب mg/100mgtotal lipid	۸۸
جدول ۹-۳ میانگین نتایج کمی مربوط به EPA و DHA برای سه گروه	۹۰
شکل ۲۸-۳ مقایسه مقادیر کمی EPA برای سه گروه	۹۲
شکل ۲۹-۳ مقایسه مقادیر کمی DHA برای سه گروه	۹۲
جدول ۱۰-۳ نتایج منحنی زیر کروماتوگرام مربوط به حلال	۹۵
جدول ۱۱-۳ حد تشخیص مربوط به EPA و DHA	۹۵
شکل ۳۰-۳ برنامه مربوط به مدل PCA در SIMCA و در محیط MATLAB	۹۹
شکل ۳۱-۳ نمودار PRESS مربوط به گروه ۱ (افراد سالم)	۱۰۴
شکل ۳۲-۳ نمودار Project مربوط به گروه ۱ (افراد سالم)	۱۰۵
شکل ۳۳-۳ نمودار PRESS مربوط به گروه ۲ (افراد افسرده)	۱۰۶
شکل ۳۴-۳ نمودار Project مربوط به گروه ۲ (افراد افسرده)	۱۰۷
شکل ۳۵-۳ نمودار PRESS مربوط به گروه ۳ (افراد خودکشی کرده)	۱۰۸
شکل ۳۶-۳ نمودار Project مربوط به گروه ۳ (افراد خودکشی کرده)	۱۰۹
شکل ۳۷-۳ برنامه مربوط به SIMCA برای Predict کردن نمونه های حقیقی	۱۱۱

۱- مقدمه

از سالهای دور نام چربی ها همواره با چاقی، بیماریهای قلبی و بسیاری از بیماریهای دیگر همراه است. تا اینکه در حدود چهل سال پیش دکتر هوربن فرضیه تاثیر برخی از اسیدهای چرب بر خلق و خوی افراد را ارائه کرد، لذا از آن زمان تا کنون مطالعات گوناگونی برای اثبات این فرضیه انجام شد. به این ترتیب در حال حاضر توصیه های بهداشتی در زمینه تغذیه، از کاهش سهم چربی ها در غذا به تغییر کیفیت چربی های خوراکی تبدیل شده است. انواع مختلف چربیهای موجود در رژیم غذایی در سه گروه قرار دارند: اشباع، غیر اشباع یگانه و غیر اشباع چندگانه. چربیهای اشباع چربیهای جامد مشتق از منابع حیوانی مثل کره، دنبه و چربی موجود در گوشت قرمزاند که در بسیاری از غذاهای آماده نیز به کار می روند. از نظر شیمیایی چربیهای اشباع در ساختار شیمیائی آنها حداکثر تعداد اتمهای هیدروژن را دارند. این انواع، چربیهایی هستند که باید در رژیم غذایی کاهش داده شوند. چربیهای غیر اشباع به این علت غیر اشباع نامیده می شوند که از لحاظ شیمیایی می توان اتمهای هیدروژن بیشتری را به آنها اضافه کرد. آنها شامل اسیدهای چرب غیر اشباع یگانه (MUFA) می شوند که از زنجیره ای از اتمهای کربن با یک باند دوگانه تشکیل یافته اند. آنها دمای ذوب پائینتری نسبت به چربیهای اشباع دارند و در نتیجه معمولاً مایعند. روغن زیتون بهترین مثال شناخته شده آنها است که غالباً از اسیدهای چرب غیر اشباع یگانه تشکیل شده است .

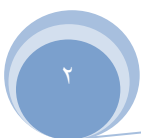
اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه (PUFA) در زنجیره کربنی خود بیش از یک پیوند دوگانه دارند. در روغن های خوراکی معمولاً ۲ تا ۱۶ پیوند دوگانه یافت می شود. روغن های گیاهی مثل روغن آفتابگردان و روغن های بدست آمده از ماهیها، حاوی مقادیر متنابهی از این نوع اسیدهای چرب است. این اسیدها برای سلامتی و رشد طبیعی بدن مفید و لازمند. که به آنها اسیدهای چرب ضروری گفته می شود، چرا که علیرغم ضروری بودن آنها برای حیات و سلامت، انسان نمی تواند خود آنها را بسازد. افزایش درصد بیماران افسرده در جهان و بویژه در کشورهای غربی و صرف هزینه های هنگفت



فصل اول : تئوری پژوهش

اقتصادی و اجتماعی برای درمان این بیماران مطالعه بر روی تاثیر اسیدهای چرب غیر اشباع امگا ۳ و بویژه ایکوزا پنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA) بر روی این بیماران انجام شد این مطالعات تاثیر عمده این اسیدها بر روی بیماران افسرده با انواع افسردگی را نشان می دهد.

در این مطالعه تاثیر این دو اسید چرب مهم را بر روی دو گروه بیمار که شامل گروه افسرده و گروهی که اقدام به خودکشی کرده که نتایج بدست آمده از این دو گروه را با گروه شاهد که سلامت روانی این افراد بوسیله روانپزشک مشخص شده، مقایسه می کنیم.



۲- ترکیبات گلبول قرمز

گلبول قرمز یک سلول پیچیده‌ای است. که غشاء آن شامل لیپیدها و پروتئینهاست و قسمت درونی گلبول قرمز، هموگلوبین فعالیت های متابولیکی را برعهده دارد. [۳۸, ۵۳]

۳- لیپیدهای غشایی

در یک گلبول قرمز بالغ تمام لیپیدها درون غشاء قرار دارد و این لیپیدها بطور عمده خواص فیزیکی یک گلبول قرمز را تشکیل می‌دهند. بعنوان مثال خواصی همچون قابلیت نفوذ کاتیون‌ها و یا انعطاف‌پذیری مکانیکی یک سلول گلبول قرمز بطور مؤثر می‌تواند به ساختار لیپیدهای غشایی وابسته باشد. [۴۸]

۴- ترکیبات لیپیدی

در غشاء گلبول قرمز حدود ۵۰٪ غشاء پروتئین، ۴۰٪ لیپید و ۱۰٪ آن کربوهیدرات می‌باشد. بیش از ۹۵٪ از کل لیپیدهای غشایی شامل فسفولیپیدها و کلسترول می‌باشد. [۲۳]

مقدار کمی و در حدود کمتر از ۲٪ شامل گلیکولیپیدها و بقیه گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد هستند. [۷۲]

شواهد قابل توجهی نشان می‌دهند که برخوردهایی بین لیپیدهای اصلی غشایی وجود دارد (مانند متراکم شدن کلسترول و یا تثبیت در مولکولی فسفولیپیدها). [۶۱]

غلظت تقریبی انواع فسفولیپیدها در گلبول قرمز بصورت زیر می باشد.

۳۰٪ شامل فسفاتیدول کولین^۱، ۲۸٪ شامل فسفاتیدل اتانول آمین^۲، ۱۴٪ فسفاتیدل سرین^۳ و ۲۵٪ شامل سفینگومیلین^۴ می باشند. از نظر ساختاری سفینگومیلین از سایر گروه‌های فسفولیپیدی متمایز است. [۶۲]

۵-۱ ویژگی لیپیدهای موجود در غشاها

بیشتر لیپیدهای گلبول قرمز بصورت دو مولکولی در غشاء آرایش یافته‌اند. در حالت دولایه‌ای، یک سر آبدوست که شامل گروه‌های قطبی لیپیدها که از طریق لایه فوقانی غشاء در سیتوپلاسم و پلاسم می‌باشد و یک زنجیر آسیل لیپیدی بصورت آبگریز لایه درون غشاء را تشکیل می‌دهد. این قسمت آبگریز در دماهای معمولی در حالت مایع - بلوری می‌باشد که این حالت به انعطاف‌پذیری و تغییر شکل فیزیولوژیکی غشاء گلبول قرمز کمک می‌کند. [۴۶]

در اکثر مواقع پروتئین‌های غشایی بصورت آشکار و درون ماتریکس لیپیدها قرار می‌گیرند که حالتی شبیه به یک توده شناور در اقیانوس را تشکیل می‌دهند [۴۴]

^۱ -phosphate idol Colin

^۲ -phosphate idol ethanol amin

^۳ - phosphate idol serin

^۴ - sphingomyelin

لیپیدها در بخش درونی و بیرونی غشاء بصورت متقارن توزیع شده‌اند. در قسمت درونی یا سیتوپلازما غشاء بطور عمده شامل فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیک سرین^۱ در حالی که فسفاتیدیل کولین و سفینگوامپلین بطور عمده در قسمت بیرونی غشاء یا پلازما می‌باشد. [۴۹, ۶۳]

که این بدلیل وجود سایت‌های ویژه برای تبدیل فسفولیپیدها و انجام واکنش‌های مکرر و همچنین سرعت بسیار کم تبادل بین غشاء درونی و بیرونی می‌باشد. اگرچه سلول گلبول قرمز بطور پیوسته تغییر حالت می‌دهد لیپیدها و مکانیسم‌های مربوط به لیپیدها تغییری نمی‌کنند.

۶-۱ غشاء سلولی گلبول قرمز

غشاء سلولی گلبول قرمز که دارای قسمت‌های مختلف می‌باشد:

۱- غشاء لیپیدی که ساختار کمی یک غشاء را تشکیل می‌دهد.

۲- غشاء پروتئینی که بصورت تکه‌تکه یا بخش می‌باشد.

لیپیدها یا پروتئین‌هایی که مکیدنی است بصورت سیال یا متحرک باشند. [۶۶]

۱- غشاء لیپیدی که شامل اجزاء زیر می‌باشد:

الف) فسفولیپیدها^۲

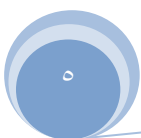
ب) گلیکولیپیدها^۳

ج) کلسترول^۱

^۱ - phosphatidic serin

^۲ - Phospholipids

^۳ - Glycolipid



۲- غشاء پروتئینی که شامل بخش‌های زیر می‌باشد:

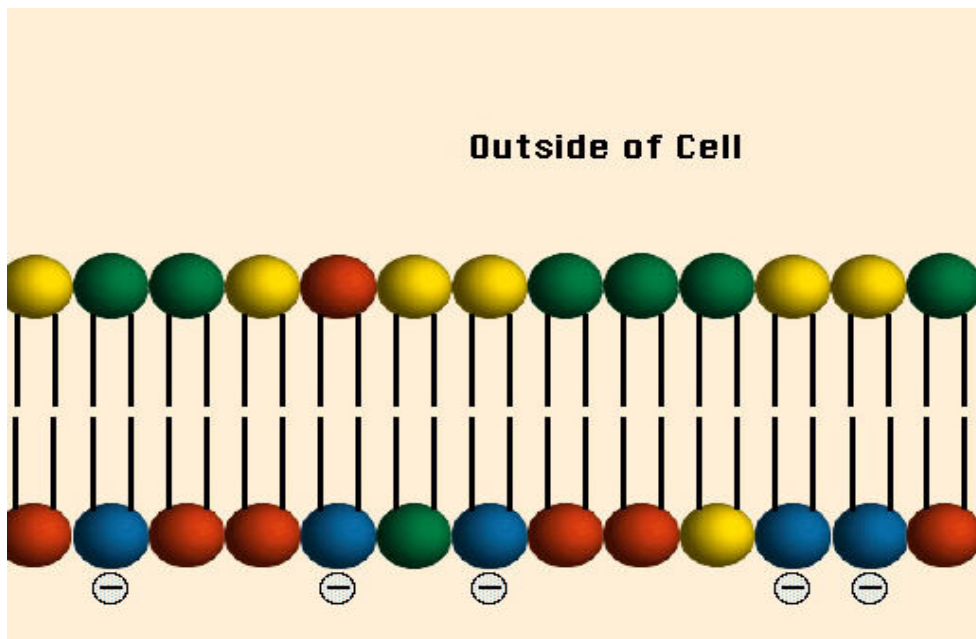
الف) پروتئین‌های اصلی یا درونی غشاء

ب) پروتئین‌های بیرونی یا وابسته محیط در غشاء

۱-۶-۱) فسفولیپیدها

A) فسفولیپیدها که بیشترین مقدار غشاء لیپیدی را تشکیل می‌دهند و بصورت دو لایه‌ای هستند.

شکل ۱ ساختار دو لایه‌ای فسفولیپیدها را نشان می‌دهد. [۶۶]



شکل ۱-۱-۱ نمای کلی از فسفولیپیدها که بصورت دو لایه‌ای هستند.

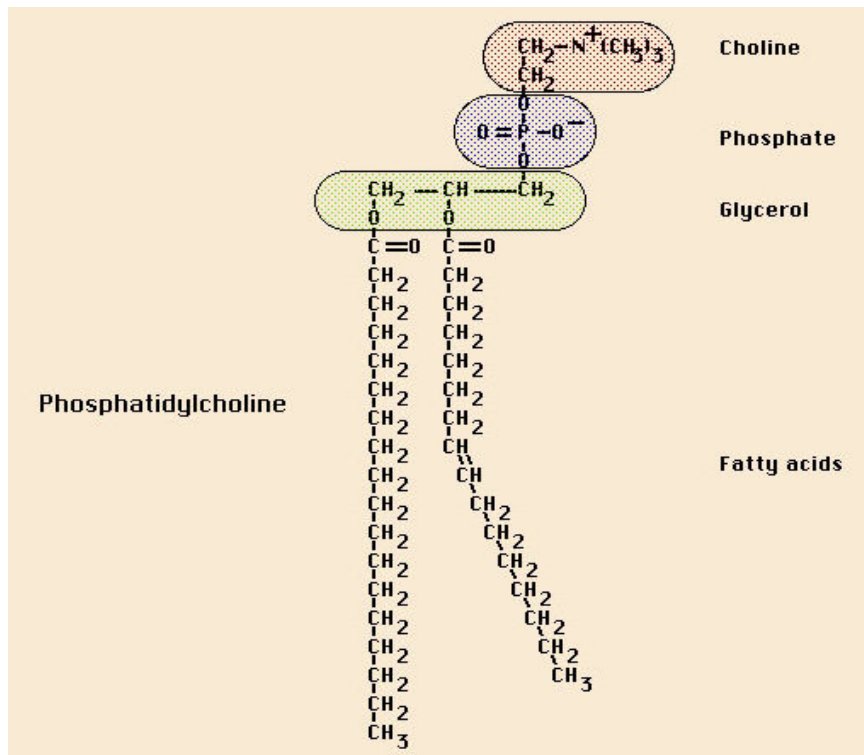
فصل اول : تئوری پژوهش

(B) در شکل ۲ ساختار فسفولیپیدها که شامل اجزاء زیر می‌باشد را نشان می‌دهد.

(I) بخش گلیسوری که بصورت کوولانسی به هم متصل شده‌اند.

(II) یک گروه فسفات متغیر بخش قطبی فسفولیپیدها را تشکیل می‌دهد.

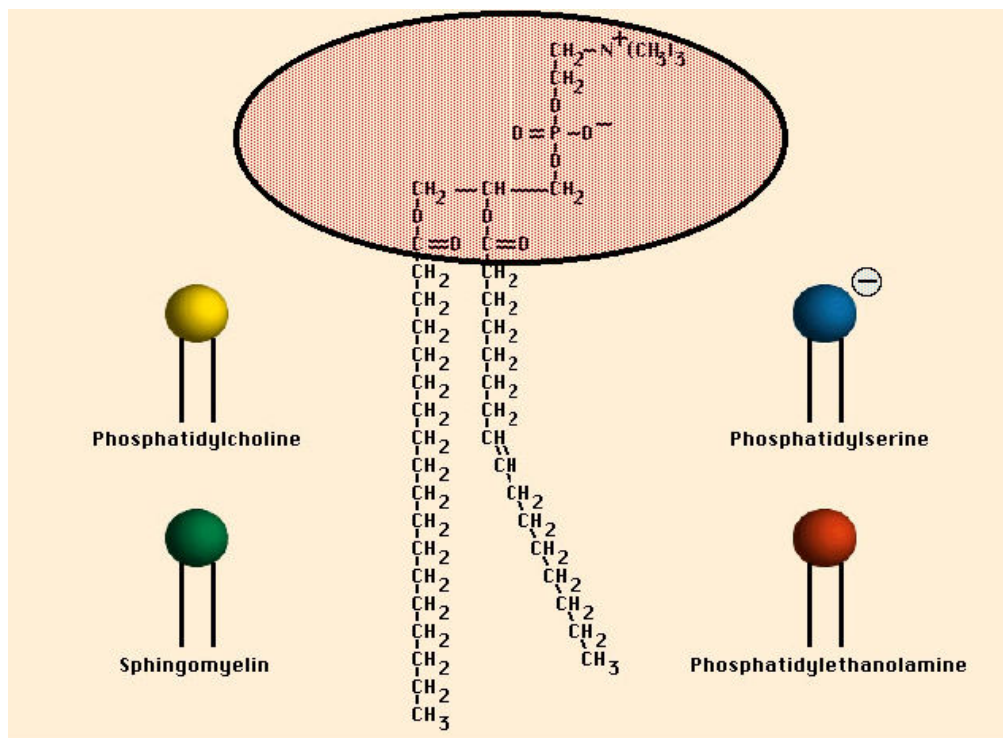
(III) دو زنجیر بلند هیدروکربنی بصورت غیر قطبی از اسیدهای چرب.



شکل ۲-۱ بخشهای مختلف فسفولیپیدها

فصل اول : تنوری پژوهش

فسفولیپیدها مولکول‌های امفی پاتیک و آمفی فیلیک هستند یعنی از دو بخش با قطبیت کاملاً متفاوت تشکیل می‌شوند. یک بخش آبگریز یا غیرقطبی که شامل زنجیرهای اسید چرب می‌باشد که درون غشاء جهت‌یابی می‌کنند و یک بخش آبدوست یا قطبی که شامل گروه فسفات در بخش انتهایی که در فضای بیرونی یا درون سیتوپلاسم قرار می‌گیرد که در شکل ۳ نشان داده می‌شوند. [۶۶]



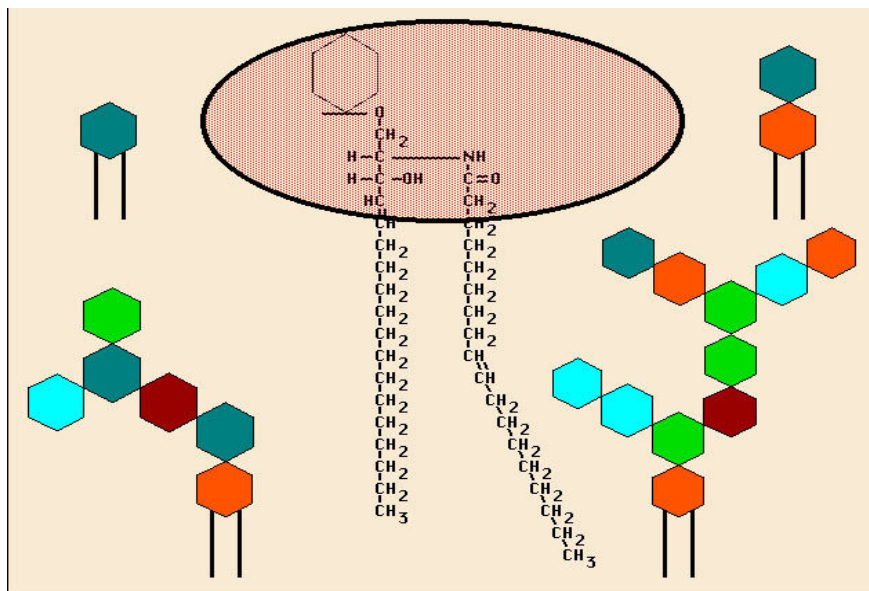
شکل ۳-۱ بخش‌های قطبی و غیرقطبی فسفولیپیدها.

فصل اول : تئوری پژوهش

در فسفولیپیدهای غشایی علاوه بر ساختار فوق، ساختار کولینی و غیر کولینی نیز وجود دارد که در شکل ۳ نیز نشان داده می‌شود. فسفولیپیدهای کولینی که شامل فسفاتیدی کولین و سفینگومیلین هستند و فسفولیپیدهای غیرکولینی شامل فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیلینوسیتول^۱. [۶۶]

۲-۶-۱ گلیکولیپیدها

این بخش از لیپیدها که حدود کمتر از ۲٪ از لیپیدهای غشایی را شامل می‌شوند این نوع از لیپیدها بطور عمده در غشاء پلازما پیدا می‌شوند. که در واقع بخش خارجی غشاء پلازما را تشکیل می‌دهد. در شکل ۴ ساختار گلیکولیپید را نشان می‌دهد در این شکل نشان داده شده که ساختار گلیکولیپید متفاوت از ساختار فسفولیپیدهاست. [۶۶]



شکل ۴-۱ ساختار گلیکولیپید.

^۱-phosphatidyl serine