جمهوری اسلامی ایران

جهاد دانشگاهی ۱۳۵۹

معاونت تحقیقات و فناوری جهاددانشگاهی

پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی– ابن‌سینا

پژوهشکده آنتی بادی منوکلونال

گروه پژوهشی: ایمونوبیولوژی تولیدمثل

عنوان طرح :

آنالیز متابولوم سرم خون در زنان مبتلا به بیماری اندومتریوزیس به روش GC-MS: یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص به موقع و زودهنگام، در زنان مشکوک به ابتلا به اندومتریوزیس

کد طرح مصوب جهاد دانشگاهی: ۳۳-۲۱۴۱

کد مصوب کمیته اخلاق در پژوهش: ۰۱۱-۹۲

مجریان طرح:

دکتر کامبیز گیلانی

دکتر امیر حسن زرنانی

تاریخ تهیه گزارش:

شهریور ۱۳۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات مجری و همکاران طرح:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	مدرک تحصیلی	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	دکتر کامبیز گیلانی	مجری	Ph.D.	استادیار	۲۵۰
۲	دکتر امیرحسن زرنانی	مجری	Ph.D.	استاد	۳۰
۳	دکتر علیرضا قاسم پور	آنالیز داده‌ها	Ph.D.	استاد	۱۰
۴	دکتر آرش مهذب	همکار اصلی	M.D.	مربی	۱۰
۵	دکتر آرش مینایی طهرانی	همکار اصلی	Ph.D.	استادیار	۱۰
۶	دکتر شاهین خزعلی	همکار اصلی	Ph.D.	دانشیار	۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

باسمه تعالی

Archive of SID

www.SID.ir

حقوق پروژه:

طرح پژوهشی " **آنالیز متابولوم سرم خون در زنان مبتلا به بیماری اندومتریوزیس به روش GC-MS: یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص به موقع و زودهنگام، در زنان مشکوک به ابتلا به اندومتریوزیس**" با اعتبار تخصیص یافته از سوی معاونت تحقیقات و فناوری جهاد دانشگاهی در محل پژوهشگاه فن آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن سینا انجام گرفته است.

Archive of SID

www.SID.ir

تقدیر و تشکر:

بدینوسیله از کلیه پرسنل و همکاران محترم در پژوهشگاه فن آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا و مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا که امکانات مورد نیاز جهت پیشبرد مراحل مختلف این طرح را فراهم آوردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده فارسی:

اندومتریوز بیماری زنانه وابسته به استروژن است که در بین ۱۰-۶ درصد از زنان در سن باروری شایع می‌باشد. اندومتریوز به لانه گزینی بافت اندومتر در خارج از رحم اطلاق می‌گردد. در حال حاضر جهت تشخیص اندومتریوز از روش لاپراسکوپی جهت دیدن مناطق اندومتریوتیک و در نهایت بررسی بافت شناسی این مناطق استفاده می‌گردد، جراحی لاپراسکوپی روشی تهاجمی با احتمال خطر برای بیماران به حساب می‌آید. از آن جهت بکار گیری روشی غیر تهاجمی برای تشخیص زود هنگام، درمان به موقع و جلوگیری از پیشرفت این بیماری امری ضروری به حساب می‌آید. هدف از این مطالعه بررسی الگوی متابولوم سرم خون بیماران مبتلا به اندومتریوز با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی به عنوان روشی غیر تهاجمی برای تشخیص زود هنگام این بیماری می‌باشد. در این مطالعه سرم خون از ۱۸ بیمار که ابتلاء به اندومتریوز از طریق لاپراسکوپی تائید شده بود(۳ بیمار در مرحله ۱و۲ بیماری و ۱۵ بیمار در مرحله ۳ و ۴ بیماری) و ۱۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل تهیه شد. نمونه‌ها پس از آماده سازی به دستگاه GC-MS تزریق شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش‌های پیشرفته‌ی کمومتریکس استفاده شد. داده‌های جمع آوری شده به روش الگوریتم آنالیز جزء اصلی(PCA) مدل سازی شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که با استفاده از الگوریتم PCA گروه‌های مورد مطالعه به خوبی از یکدیگر مجزا می‌شوند. در این مطالعه همچنین شش متابولیت شناسایی شد که پتانسیل مطرح شدن به عنوان نشانگرهای زیستی برای تمایز بین گروه‌های مورد مطالعه را دارا می‌باشند.

کلمات کلیدی:

اندومتریوز، کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی، متابولومیکس

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مطالب

عنوان — شماره صفحه

فصل اول: کلیات تحقیق ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- پیشینه تحقیق ۳
۱-۳- روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) ۴
۱-۴- دستگاه GC-Mass ۵
۱-۴-۱- قسمتهای مختلف دستگاه GC-Mass ۷
۱-۴-۲- اساس کار با دستگاه GC-MS ۸
۱-۵- متابولومیکس ۹
۱-۵-۱- مشکلات موجود در داده‌های متابولومیکس ۱۰
۱-۶- کمومتریکس ۱۱
۱-۶-۱- روش های تفکیک منحنی چند متغیره(MCR) ۱۲
۱-۶-۱-۱- روش تفکیک منحنی چند متغیره-حداقل مربعات متناوب(MCR-ALS) ۱۳
فصل دوم: روش اجرای تحقیق ۱۴
۲-۱- جمع‌آوری نمونه ۱۵
۲-۲- استخراج متابولیت‌های قطبی ۱۵
۲-۳- مشتق سازی متابولیت‌های قطبی ۱۵
۲-۴- تزریق نمونه به دستگاه GC-MS ۱۵
۲-۵- تحلیل داده‌ها با روش‌های کمومتریکس ۱۶
فصل سوم: یافته‌های تحقیق ۱۷
۳-۱- یافته‌ها ۱۷
فصل چهارم: تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق ۲۱
فهرست منابع ۲۳
ـ چکیده انگلیسی ۲۶

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست اشکال

عنوان | شماره صفحه

شکل۱- شمای کلی از انواع مولکول‌های موجود در سلول و نام‌گذاری آنها..... ۱۰
شکل ۲- شمایی کلی از روند آنالیز داده‌های دستگاه GC-MS با روش‌های کمومتریکس ۱۶
شکل۳- نمودار کروماتوگرام یونی حاصل از تزریق نمونه سرم به دستگاه GC-MS ۱۸
شکل ۴- حذف نویز زمینه از کروماتوگرام..... ۱۸
شکل ۵- نتیجه آنالیز داده‌ها بر اساس الگوریتم PCA..... ۱۹
شکل ۶- ساختار شیمیایی متابولیت‌های شناسایی شده در گروه اندومتریوز ۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول

کلیات و پیشینه تحقیق

بعضی از اصطلاحات انگلیسی در متن آورده شده است درصورتی که با داشتن معادل فارسی باید معادل فارسی آن در متن گزارش آورده شود و سپس در پاورقی معادل انگلیسی آن ذکر شود. واژگانی هم که دارای اختصار هستند برای بار اول به صورت کامل و سپس به صورت اختصار در متن ذکر میشوند.

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۱- مقدمه

اندومتریوز به لانه گزینی بافت اندومتر مشتمل بر بافت استروما و بافت اپیتلیالی در خارج از رحم اطلاق می‌شود. اندومتریوز یکی از شایع‌ترین دلایل ناباروری و اختلال در لانه گزینی می‌باشد. هنوز علت ایجاد و درمان قطعی آن مبهم است. اندومتریوز زندگی اجتماعی، روابط زناشویی، باروری بیمار را مختل کرده و زندگی نرمال فرد را بهم می‌ریزد. یکی از علائم مهم این بیماری، یعنی درد ، سال‌ها به غلط به عنوان یک مسئله سایکولوژیک در نظر گرفته می‌شد. اندومتریوز دلیل شایع ۱۰ درصد از موارد درد لگنی مزمن می‌باشد. شیوع اندومتریوز در موارد درد لگنی مزمن سیکلیک و غیر سیکلیک به میزان ۹۰-۷۰ درصد گزارش شده است.

لاپاراسکوپی یکی از بررسی‌های اولیه بیماران نابارور جهت ارزیابی شدت چسبندگی یا گسترش اندومتریوز و بررسی فاکتور لوله‌ای و صفاقی می‌باشد که در انتخاب درمان مناسب بسیار موثر است. بیماران بر اساس یافته‌های موجود در لاپاراسکوپی به سه گروه خفیف، متوسط و شدید تقسیم می‌شوند. در نوع خفیف، نقاط اندومتریوز کوچک و محدود روی صفاق، لگن و تخمدان و در نوع متوسط، نقاط اندومتریوز متعدد و بزرگتر با چسبندگی‌های شل در اطراف لوله و تخمدان و در نوع شدید، چسبندگی لوله و تخمدان و کلدوساک وسیع و سفت که حتی ممکن است منجر به لگن منجمد[1] شود. بیماران با اندومتریوز خفیف و جزیی تحت درمان انتظاری و بیماران با اندومتریوز متوسط و شدید بسته به شدت بیماری تحت درمان دارویی یا جراحی قرار می‌گیرند.

اندومتریوز یکی از دلایل مهم ناباروری محسوب می‌شود، گرچه بحث‌های زیادی وجود دارد تا ارتباط اندومتریوز و نازایی را ثابت کند، اما بیشتر بررسی‌ها نشانگر این ارتباط بر اساس آنالیزهای گذشته‌نگر یا متقاطع استوار می‌باشد. به هر صورت این بیماری در ۲۰-۱۰ درصد از بیماران نابارور و در ۸۰-۵۰ درصد از موارد ناباروری بدون علت دیده شده است. هنگامی که اندومتریوز متوسط تا شدید باشد، تخمدان ها را مبتلا ساخته و سبب چسبندگی و مانع از تحرک لوله، رحم و تخمدان می‌شود که این تغییرات با ناباروری و کم‌باروری همراه خواهد بود گرچه مکانیسم‌های متعددی مانند اختلال عملکردی تخمک گذاری، نارسایی لوتئال ، سندرم عدم پارگی فولیکول لوتئینیزه، سقط مکرر و تغییر ایمنی بدن و التهاب درون صفاقی نیز مطرح شده‌اند. بررس‌ها نشان می‌دهد که میزان باروری در بیماران مبتلا به اندومتریوز خفیف نیز کمتر از حد طبیعی است.

تشخیص اندومتریوز چالشی است که تنها متخصصین زنان خبره از عهده‌ی آن بر می‌آیند و تاخیری ۱۲-۸ ساله برای تشخیص صحیح گزارش شده است. در حال حاضر جهت تشخیص قطعی اندومتریوز از روش لاپراسکوپی جهت دیدن مناطق اندومتریوتیک و در نهایت بررسی بافت شناسی این مناطق می‌باشد. امروزه تلاش‌های بسیاری در راستای بهبود تشخیص این بیماری توسط روش‌های غیر تهاجمی که خطرات و محدودیت‌های لاپاراسکوپی را نداشته باشد، صورت می‌گیرد. دانشمندان امروزه به کمک فنآوری‌های نوینی همچون علم ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس بر روی شناسایی این بیماری تمرکز کرده‌اند.

[1] Frozen Pelvic

Archive of SID
www.SID.ir

۱-۲- پیشینه تحقیق

امروزه تشخیص قطعی و زود هنگام "اندومتریوزیس" به عنوان یک بیماری خطرناک، پنهان و پیش رونده، تبدیل به یکی از مهمترین عرصه های فعالیت در علوم مولکولی مدرن و نوین شده است. شاید اغراق نباشد که تعدادی از متخصصان "اندومتریوز"، را به عنوان یک سرطان خوش خیم در نظر می‌گیرند. پنهان بودن و بی علامت باقی ماندن برای سال‌های متعدد، باعث رشد و پیشرفت بیماری شده و از طرفی بیماری را به سمت درجه‌های بسیار حاد و خطرناک سوق می‌دهد و نتیجه آن درمان سخت‌تر و پر هزینه‌تر را رقم می‌زند و از طرف دیگر باعث تشدید عوارض ناشی از اندومتریوز می‌شود که در بعضی از این عوارض مانند ناباروری، از دست رفتن فولیکول‌ها یا همان کاهش رزرو تخمدانی به علت کیست‌های اندومتریومایی، دیگر درمان سودی نخواهد داشت و اگرچه ممکن است با انجام جراحی‌ها مشکل درد بیمار برطرف شود ولی ناکامی در باردار شدن فرد مبتلا تا آخر عمر وی باقی خواهد ماند. میانگین تأخیر در تشخیص کامل این بیماری اخیراً حدود ۹ سال برآورد شده است (۱). اندومتریوز یک بیماری مزمن زنانه وابسته به استروژن است که عبارت است از حضور سلول‌های استرومایی یا غده‌ای اندومتر در خارج از حفرهٔ رحمی(۱). این بیماری ۱ الی ۱۰ درصد زنان در سن باروری را مبتلا می‌کند و باعث درد لگنی و ناباروری می‌گردد (۲).

در طول چند سال گذشته بسیاری از نشانگرهای بیولوژیک در سرم، مایع صفاقی و بافت اندومتر شناسایی شده‌اند، از جلمه چند نشانگر اندومتریوز، نشانگر سرطان CA-125 و اینترلوکین-6 می‌باشد(۴-۳). با این وجود، اکثر این نشانگرهای پیشنهادی بدلیل حساسیت و اختصاصیت کم در مقایسه با روش تشخیص جراحی لاپاراسکپی ناکافی به نظر می‌رسند(۳).

با چشم اندازی به تکنولوژی‌های نو و مدرن، پیش آگهی امید بخشی در خصوص تشخیص به موقع، غیر تهاجمی و زود هنگام این بیماری به متخصصان عرصه فعالیت‌های نوین مولکولی نوید داده می‌شود. یکی از قابل اعتمادترین این عرصه‌ها، رویکردهای متابولومیکی می‌باشد. امید می‌رود از این فناوری به طور گسترده در جستجوی نشانگرهایی برای طراحی روش تشخیص بیماری اندومتریوز استفاده شود.

سرم خون انسان همراه با تمامی متعلقاتش که در واقع سرشار از انواع مولکول‌های مهم و نشانگر می‌باشد، سال‌هاست که به عنوان یک منبع تامل برانگیز از رد پاها و سرنخ‌های انواع بیماری‌های ناشناخته و یا دیر- شناسایی شونده در بدن انسان شناخته شده است(۸-۴). در میان این سرنخ‌ها، علم جدیدی با عنوان متابولومیکس با تاکید بر روی شناخت و آنالیز ریز ذراتی با عنوان متابولوم در سرم و پلاسمای خون انسان می-پردازد.

متابولومیکس به مطالعه متابولیت‌ها و یا مطالعه پروفایل متابولوم یک سیستم بیولوژیکی با ملکول‌های به وزن کمتر از ۱۰۰۰ دالتون و در یک واحد زمانی اطلاق می‌گردد. امکان مطالعه هم زمان متابولیت‌ها فقط به کمک دستگاه های مدرن و جدید طیف سنجی جرمی و یا طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته امکان پذیر است، بنابراین دستگاه‌های مدرن آنالیز GC-MS و همچنین NMR با قدرت تفکیک پذیری بالا (۵۰۰- ۹۰۰ مگاهرتز) برای این منظور طراحی و ساخته شده است. توضیح بیشتر در مورد متابولوم‌ها بدین صورت است که در واقع متابولوم به مجموعه متابولیت‌های کوچک شامل متابولیت‌های واسط، هورمون‌ها و ملکول‌های سیگنال دار و همچنین متابولیت‌های ثانویه در یک نمونه زیستی اطلاق می‌گردد. متابولوم بصورت دینامیک بوده و هر لحظه در حال تغییر می‌باشد. در ژانویه سال ۲۰۰۷ میلادی دانشمندان دانشگاه آلبرتا و

Archive of SID
www.SID.ir

دانشگاه کلگری پروژه متابولوم انسانی را به پایان رسانده‌اند. آنها تعداد ۲۵۰۰ متابولیت، ۱۲۰۰ ملکول دارو و ۳۵۰۰ ملکول اجزاء غذائی را در بدن انسان شناسائی نمودند(۱۰-۹)

با نگاهی به ژنوم انسان خواهیم دید که در حدود ۳۱،۸۹۷ ژن وجود دارد که از این ژن‌ها ، مکانیسم تولید پروتئین سازی قادر به تولید یک میلیون نوع پروتئین مختلف می‌شود در حالیکه تعداد متابولیت ها فقط به ۷۸۰۰ متابولیت خلاصه می‌شود، این آمار این حقیقت را آشکار می-سازد که مدیریت و بهره وری از تعداد کمتر متابولیت‌ها، در مقایسه با دیگران به جهت کاربردهای تشخیصی و همچنین درمانی آسان‌تر، در دسترس تر و قابل انجام‌تر می‌باشد(۱۳-۱۱).

دستگاه GC-MS ، این توانایی را به محققین می‌دهد که تمام محتوای متابولومیتی سرم و پلاسمای خون انسان را طیف سنجی و آنالیز نموده و بر اساس تعداد ذرات شناسایی شده یک الگوی منحصر بفرد ارائه دهد. هنگامیکه تعداد نمونه‌هایی از دو جمعیت مورد مطالعه مختلف به عنوان مثال مانند آنچه که در طرحی که در پیش رو است انجام خواهد شد، دو جمعیت، یکی سرم خون زنان مبتلا به بیماری اندومتریوزیس و دیگری زنان سالم و بارور با دستگاه GC-MS اسپکتروم مورد شناسایی و آنالیز متابولیتی قرار می‌گیرند، انتظار خواهیم داشت که الگوی واحد و منحصر بفردی در گروه بیماران در مقایسه با گروه افراد سالم به دست بیاید، لذا از این الگو و تمام متابولیت‌هایی که پدید آورنده این الگو بوده‌اند، به عنوان یک نشانگر و ردیاب مولکولی جهت تشخیص سایر نمونه ها استفاده خواهد شد، به طوری که مقدار کمی از سرم فرد مشکوک به اندومتریوز تهیه خواهد شد و بر روی آن آنالیز متابولومیکسی صورت خواهد گرفت، الگوی به دست آمده منطبق با الگوی هر کدام از گروه‌های مورد مطالعه باشد، تشخیص گذاری این تست تلقی شده و قابل ارائه به پزشک معالج فرد می باشد.

۱-۳- کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS):

یکی از پیشرفته‌ترین دستگاه‌های مورد استفاده در آنالیز دستگاهی جداسازی ترکیبات به روش کروماتوگرافی گازی سپس شناسایی آنها با استفاده از طیف سنج جرمی می‌باشد. در واقع طیف سنج جرمی دستگاهی است که مولکول‌های گازی باردار را بر اساس جرم آنها دسته بندی می‌کند و بر حسب جرم آنها را از یکدیگر جداسازی و ضمن شناسایی مقدار آنها را در محلول اندازه گیری می‌کند.

دستگاه GC-MS از دو قسمت GC(گاز کروماتوگرافی) و MS(طیف سنجی جرمی) تشکیل شده است. در این دستگاه GC و Mass از هم جدا نمی‌باشند و وارد کردن نمونه به دستگاه Mass از طریق GC می‌باشد، بنابراین در این دستگاه، فقط از نمونه‌هایی می‌توان طیف جرمی تهیه کرد که بتوان به GC تزریق نمود، پس به طور عمده این دستگاه برای شناسایی و تعیین مقدار فراکسیون‌های موادی است که حالت فرار دارند (مانند اسانس‌های گیاهی که نقطه جوش پایینی دارند) و یا بواسطه ترکیب با برخی واکنشگرها و یا حلال‌های خاص، امکان فرار بودن می‌یابند. در دستگاه GC-MS اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا می‌شوند و پس از حذف گاز حاصل، وارد منبع یونش طیف سنج جرمی می‌گردند و سپس، بواسطه تولید میدان‌های الکتریکی پر قدرت، اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آنها می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

برای آنالیز ترکیب و پایداری در فاز محلول می‌توان از MS استفاده کرد. به عنوان مثال برای تعیین ساختار ترکیبات شاخه‌ای نانو مقیاس با ابعاد ۱/۵ nm می‌توان از روش طیف‌سنج جرمی با تکنیک یونش الکترواسپری (ESI) استفاده کرد.

برتری عمده این روش نسبت به سایر روش‌ها، سریع بودن پاسخ‌دهی می‌باشد (شناسایی اجزای مخلوط ظرف کمتر از۹۰ ثانیه پس از ورود مخلوط بداخل دستگاه انجام می‌شود)، همچنین حتی در صورت در اختیار داشتن مقادیر بسیار اندکی از یک مخلوط (در حد پیکوگرم = 10^{-12})، می‌توان به دقت، اقدام به شناسایی نوع و مقادیر اجزای تشکیل دهنده آن نمود.

مهم‌ترین مزیت این روش نسبت به سایر روش‌ها از قبیل TEM، XRD، UV-Vis، IR، اسپکتروسکپی رامان و TGA این است که برای تعیین ترکیبات به طور مستقیم از روش‌های فوق نمی‌توان استفاده کرد. اما از روش MS می‌توان استفاده نمود.

۱-۴- دستگاه GC-Mass

مشابه دستگاه GC است. تنها تفاوت آن با GC معمولی این است که در این دستگاه دتکتور مربوطه دتکتور Mass است. تفاوت‌های دیگر آن عبارتند از:

۱) از ستون موئینه (کاپیلری) استفاده می‌شود. نوع ستون به اسم تجارتی DB-5 معروف است. از نظر پلاریته ستون دارای پلاریته متوسطی است. طول این ستون ۳۰ متر است و برای کارهای عمومی استفاده می‌شود از آنجا که عوض کردن ستون زیاد ساده نمی‌باشد. سعی می‌شود ستونی انتخاب گردد که نمونه‌های زیادی با آن قابل تعیین باشد.

۲) جهت تزریق نیاز به حجم بسیار کمی از نمونه می‌باشد. معمولا ۱/۰ میکرولیتر حجم تزریق است، گاهی همین حجم هم برای تزریق به این دستگاه زیاد است پس از سیستمی که برای رقیق کردن نمونه است و split یا spliless نام دارد استفاده می‌شود. Split یعنی چند شاخه شدن یعنی در زمان تزریق نمونه به دستگاه عدد split برای دستگاه تعیین می‌شود. مثلا۱۰۰، که نمونه به همان مقدار تقسیم شده و یکی از آن قسمت‌ها وارد دستگاه می‌شود.

گاهی نمونه خالص، خیلی غلیظ است و حتی با طریق split خط پایه خوبی ندارد. پس این نمونه ها را رقیق می‌کنیم (معمولا با متانول) مجبوریم ml ۰/۲-۰/۱ از نمونه را تزریق کنیم، چون حجم حلال زیاد و حجم نمونه کم است که در اینجا به مقدار زیاد حلال به دستگاه می‌رسد که ممکن است فشار زیادی به دستگاه وارد کند، بنابراین به اندازه Rt حلال به دستگاه زمان تاخیر[۲] داده می‌شود تا فیلامان دستگاه پس خروج حلال روشن شود، که Rt متانول برابر با ۲ دقیقه می‌باشد، یعنی دستگاه ۲ دقیقه طیف جرم نمی گیرد.

---

[۱] Delay time

Archive of SID
www.SID.ir

در طیف سنجی جرمی نیاز است که مقادیر بسیار کم در حد میکروگرم از نمونه را تحت شرایط خلاء بخار نموده و از آن طیف گرفته شود. پس نیاز به خلا داریم که توسط توربو پمپ[3] خلاء mmHg ۱۰-۷ ایجاد می‌شود.

دو روش عمده برای یونیزاسیون نمونه وجود دارد:

۱) روش یونیزاسیون الکترون[4] (EI): که انرژی حدود ev ۷۰ به جسم اعمال می‌شود. در این روش مقدار شکست‌ها خیلی زیاد است، پس اطلاعات راجع به ساختمان شیمیائی جسم بیشتر می‌شود. تنها اشکال آن ندیدن پیک یون ملکولی در برخی اوقات است.

۲) روش یونیزاسیون شیمیایی[5] (CI): از گاز متان، ایزوبوتان، آمونیاک برای شکستن جسم استفاده می‌شود که طریق نرم‌تری است ولی پیک یون ملکولی مشاهده می‌شود.

در شروع کار با دستگاه می‌بایست تشکیل خلا را چک شود که به میزان قابل قبولی رسیده باشد به این دلیل که وجود آب پیک (۱۸)، ازت (۲۸)، اکسیژن (۳۲) را ایجاد می‌کنند. با این حال معمولا وقتی طیف Mass گرفته می‌شود به دستگاه برنامه‌ای داده می‌شود که از جرم‌های ۴۰ به بالا طیف بگیرد. لازم است که ماهی یکبار کالیبراسیون را برای دستگاه انجام شود، یعنی از یک جسم استاندارد طیف Mass گرفته شود و ببنیم آیا مطابقت دارد یا خیر؟ بدین منظور از ماده استاندارد پرفلورو تری بوتیل آمین استفاده می‌شود که در داخل خود دستگاه در داخل یک شیشه کوچک تعبیه شده است این ماده دارای پیک‌های شارپی در نواحی به خصوصی است، اگر دستگاه بتواند این پیک‌ها را شناسایی کند، در آن صورت اعلام می‌دارد که آیا دستگاه کالیبره است یا خیر.

مزیت دیگر این دستگاه امکان جستجو در کتابخانه[6] دستگاه است، که بعد از گرفتن طیف می‌توان به کتابخانه دستگاه مراجعه و جستجو نمود. برای هر گروه از مواد، کتابخانه جداگانه‌ای وجود دارد. دستگاه برای هر طیف ۱۰ کاندید را پیشنهاد می‌کند. فاکتورP [7] درصد احتمال صحت کاندیداها را نشان می‌دهد که اگر بالاتر از ۸۰٪ (اعداد بالاتر از ۸۰۰) باشد، قابل قبول است. اگر فاکتور P از ۸۰۰ به بالا بود، به معنی این است که جسم با احتمال بیش از ۸۰٪ همان کاندید است.

تنها محدودیت این دستگاه این است که چون سیستم وارد کننده نمونه به دستگاه Mass ، GC است. پس در واقع تنها موادی را می‌توان با GC شناسائی نمود که فرار باشند یا از آنها بتوان مواد فرار (توسط مواد مشتق ساز مواد فرار) تهیه کرد. مواد مشتق ساز عبارتند از: مشتقات سیلیس (تری میتل سیلان) که با جسم ایجاد مشتقات فرار قابل تزریق به GC را می‌نمایند.

[3] Turbo pump
[4] Electron Ionization
[5] Chemical Ionization
[6] Library
[7] Purity

Archive of SID
www.SID.ir

۱-۴-۱- قسمت‌های مختلف دستگاه GC-MS :

۱. مخزن هلیم: He با خلوص بسیار بالا
۲. Injector : در قسمت split flow میزان رقیق شدن نمونه را تعیین می‌کنیم، یعنی نمونه با گاز حامل تقسیم به نسبت می‌شود و تنها به نسبت ۱به عدد تقسیم وارد ستون می‌گردد.
۳. ستون[8] : از نوع کاپیلری به طول ۳۰ متر و از نوع DB-5 می‌باشد.
۴. Detector : دتکتور همان دستگاه Mass می باشد.
۵. Recorder
۶. پمپ خلاء : برای قسمت Mass نیاز به پمپ برای ایجاد خلاء می‌باشد.

لازم به ذکر است بعد از مدتی ستون کثیف می‌شود که باید آن را مجدد احیاء نمود، برای این کار مدتی ستون را در دمای ۲۱۵ °C–۲۰۰ قرار داده تا پسماندها بسوزد. پس از چند بار با این روش هم دیگر نمی‌توان ستون را احیاء مجدد نمود، و باید ۲۰ cm اول ستون را قطع نمود، چرا که اغلب پسماندها در ۲۰ cm اول ستون باقی می‌مانند.

جهت کار با دستگاه ابتدا می‌بایست وارد بخش Instrumental control شده و در آنجا چک شود که در بخش خلاء آب یا هوا وجود نداشته باشد. سپس کالیبراسیون انجام می‌شود که پیک‌های استاندارد پیدا شده و منحنی استاندارد رسم می‌شود. اگر در هر بخش اشکالی ایجاد شود، در بخش Diagnostics اشکالات را پیدا می‌کنیم.

سپس در بخش آنالیز موارد زیر تعیین می شود:

۱. Data file : نام فایل مشخص می شود.
۲. GC Method: پارامترهایی مثل دما، زمان و... مشخص می شود.

مشخصات فوق می تواند توسط فرد تعیین شود (با Edit) و یا پیش فرض‌های دستگاه پذیرفته شود. همچنین در بخش Chrome analysis می‌توان کروماتوگرام ماده را مشاهده کرد، بخشی از آن را بزرگ کرد و از هر قسمت دلخواه طیف Mass را بدست آورد. پس از رسم طیف Mass با فشردن کلید L وارد کتابخانه دستگاه شده که می‌توان در این بخش ترکیب را در کتابخانه موردنظر (مثلا کتابخانه ترپنوئیدها و ...) جستجو نمود. همانطور که گفته شد فقط انتخاب‌هایی با purity بالاتر از ۸۰۰ قابل قبول می‌باشد. در نهایت خاموش کردن دستگاه را می‌توان بصورت دستی[9] انجام داد یا از قسمت shut down استفاده نمود.

[8] Column
[9] Manual

Archive of SID
www.SID.ir

۱-۴-۲- اساس کار با دستگاه GC-MS :

در این دستگاه GC و Mass از هم جدا نمی‌باشد و مسیر وارد کردن نمونه به دستگاه Mass از طریق GC می‌باشد، بنابراین در این دستگاه، فقط از نمونه‌هایی می‌توانیم طیف جرم تهیه کنیم که بتوانیم به GC تزریق نماییم. پس به طور عمده این دستگاه برای شناسایی و تعیین مقدار موادی مانند فراکسیون‌های اسانس‌ها است که مواد فرار هستند.

ستون دستگاه GC از نوع لوله موئینه است زیرا باید حجم نمونه کم باشد تا طیف جرمی خوبی به دست آید. برای کاهش حجم نمونه چند کار انجام می‌شود: یک راه رقیق کردن اسانس با حلال (معمولا متانول) است و یا می‌توان به جای تزریق، فقط سرسوزن را به اسانس آغشته نمود. اما بازهم گاه مشاهده می‌شود که تنها با رقیق کردن، پیک ها از صفحه بیرون می‌زند. به همین منظور در دستگاه سیستم Split طراحی شده که این سیستم آنچه را که از طریق injector وارد دستگاه می‌شود، تقسیم می‌کند و یک قسمت را وارد ستون کرده و بقیه را از پشت دستگاه خارج می‌کند که براساس میزان فلویی که ما برای دستگاه مشخص می‌کنیم این تقسیم صورت می‌گیرد که حداکثر آن معمولا ۱/۳۰۰ است.

برای شروع کار با دستگاه باید مطمئن شویم که در دستگاه خلا برقرار شده است زیرا باید طیف جرم را در خلاء گرفته شود. سپس باید دستگاه را کالیبره کنیم. به این منظور از ماده پرفلوئورو تری بوتیل آمین استفاده می‌کنیم.

دستگاه این ماده را با FC-43 می‌شناسد. این ترکیب دارای ۶ پیک مشخص است و اگر این پیک‌ها سرجایشان بودند یعنی دستگاه درست کار می‌کند. این ماده را ما به دستگاه تزریق نمی‌کنیم، بلکه به دستگاه برنامه‌ای می‌دهیم تا براساس این ماده کالیبره شود، یعنی قبل از شروع هر کاری وقتی مطمئن شدیم خلا برقرار شده است یک برنامه‌ای به دستگاه داده تا از استاندارد استفاده کند. در مرحله بعد باید متدهای GC و Mass را مشخص کنیم.

متدی که برای GC انتخاب می کنیم ESS است. این متد ترکیبی از متد ایزوترمال به مدت 10 min و بعد پروگرامیک است که در آن دمای شروع و اتمام کار مشخص است. در متدی که برای Mass انتخاب می کنیم Mass range مشخص می شود که معمولا این محدود را از ۴۰ تا ۳۰۰ می‌گیریم. زیرا در محدوده کمتر از ۴۰ پیک نداریم و نیز در این جا مزاحمت‌هایی هم وجود دارد. در متد Mass یک مدت زمان تاخیر (delay time) هم در نظر می‌گیریم، در این مدت فقط حلال (متانول) از دستگاه خارج می‌شود و طیف جرم آنرا نمی‌گیریم بنابراین در دو دقیقه اول پیکی رسم نمی‌شود. علت این کار این است که تعداد مولکول های متانول نسبت به جرم ماده نمونه زیاد است که اگر طیف جرم آن را بگیریم فشار زیادی به دستگاه وارد می‌شود.

در متد Mass روش گرفتن طیف جرم (Ionization mode) را هم مشخص می‌کنیم. به طور کلی دو روش وجود دارد Electron Ionization (EI) و Chemical Ionization (CI)که ما در این مطالعه از روش EI استفاده می‌کنیم. شکسته شدن به روش EI شدیدتر از CI است و در این روش طیف های بیشتری مشاهده می‌شود زیرا شکست ها بیشتر است و ممکن است یون مولکولی مشاهده نشود.

www.SID.ir

ستون دستگاه با اسم تجارتی DB-5، دارای پلاریته متوسط بوده و در آن از گاز هلیوم به عنوان حامل استفاده می‌شود. اگر مشاهده شود که کیفیت ستون کاهش یافته (به علت چسبیدن مواد به آن کارایی کاهش می‌یابد) ۱۰-۲۰ سانتی متر اول ستون را قطع می‌کنیم. ستون از یک طرف به سیستم تزریق و از طرف دیگر به دتکتور وصل است. می‌توان تا ۳۰۰ فلو اسپلیت داشته باشیم. آنچه به ستون تزریق می‌شود با گاز حامل مخلوط شده و بعد تقسیم می شود.

در قسمت Instrumental control باید چک کنیم که در قسمت خلا آب و هوا نباشد بعد وارد قسمت آنالیز شده و متدهای مورد نظر را به دستگاه وارد می‌کنیم. سپس باید منتظر بمانیم تا دستگاه GC گرم و آماده شود. وقتی چراغ GC روشن شد آماده تزریق خواهد بود. در اینجا مدت تزریق ۷۰ دقیقه طول می‌کشد. هر چه طیف جرم را با غلظت کمتر بگیریم، طیف بهتری خواهیم داشت مثلا اگر فراکسیون A در بین دقیقه های ۳تا۵ بیرون آمده در هر ثانیه آن یک طیف جرم گرفته می‌شود و معمولا طیف جرم از راس پیک با ابتدا و انتهای پیک متفاوت است زیرا در قسمت راس غلظت فراکسیون‌ها بیشتر است. غلظت بیشتر باعث شلوغ شدن طیف جرم می‌شود. بنابراین از طیف‌های جرم پای پیک یعنی با scan number پائین تر برای بردن به کتابخانه استفاده می‌کنیم.

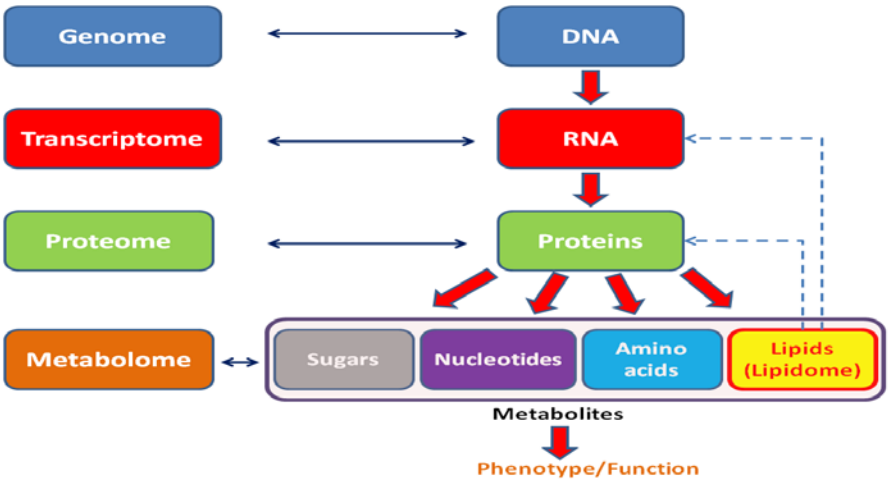
در دستگاه کتابخانه‌های مختلفی برای جستجو وجود دارد که کتابخانه ترپن‌ها بهترین کتابخانه برای جستجوی اسانس ها است. (البته کتابخانه های بزرگ دیگری هم وجود دارد). گاه نتایج بسیار متنوعی با جستجو در کتابخانه‌های مختلف مشاهده می‌شود. معیار قبول کردن کاندیدها فاکتور purity می‌باشد که حداکثر آن ۱۰۰۰ است و نشان دهنده انطباق ۱۰۰٪ می‌باشد. معیار قبولی کاندیدا purity برابر ۸۰۰ یا انطباق ۸۰٪ است. و معمولا سه کاندیدای اول اهمیت بیشتری دارند یادداشت می‌شوند.

۱-۵- متابولومیکس

متابولومیکس به مطالعه متابولیسم در سیستم‌های زنده می‌پردازد. در واقع متابولومیکس به مطالعه متابولیت‌ها و یا مطالعه پروفایل متابولوم یک سیستم با ملکول‌های به وزن کمتر از ۱۰۰۰ دالتون و در یک واحد زمانی اطلاق می‌گردد. متابولیت‌ها به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت اولیه مستقیماً در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. متابولیت های ثانویه ترکیبات آلی هستند که مستقیماً در مراحل رشد و نمو یا تولید مثل یک ارگانیسم زنده شرکت نمی‌کنند. بر خلاف متابولیت‌های اولیه، غیبت متابولیت‌های ثانویه به مرگ فوری یاخته منجر نمی‌شود، اما ممکن است در دراز مدت سبب اختلال در بقای موجود زنده، باروری یا ویژگی‌های ظاهری آن گردد و یا ممکن است هیچ تغییر مشهودی را سبب نشود. متابولوم به مجموعه متابولیت‌های کوچک شامل متابولیت‌های واسط، هورمون‌ها و ملکول‌های سیگنال دار و همچنین متابولیت‌های ثانویه در یک نمونه زیستی اطلاق می‌گردد. متابولوم به صورت دینامیک بوده و هر لحظه در حال تغییر می‌باشد (۱۴). در شکل شماره‌ی ۱ تصویری از انواع متابولیت‌ها را به نمایش می‌گذارد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- شمای کلی از انواع مولکول‌های موجود در سلول و نام‌گذاری آنها

فرایندهای متابولیتی یک تصویر لحظه‌ای از فیزیولوژی عمیق نمونه‌های تحت بررسی است. که این کار توسط ابزارهای موجود در شیمی تجزیه مانند کروماتوگرافی مایع و گازی جفت شده با تکنیک اسپکترومتری جرمی[۱۰]، تکنیک رزونانس مغناطیسی هسته[۱۱] و... انجام می‌شود.

به طور مثال با کمک علم متابولومیکس می‌توان متابولیت‌های فعال بیماری های مختلف را تشخیص و مورد استخراج قرار داد و با کمک کمومتریکس می‌توان متوجه تفاوت متابولیت‌ها و در نتیجه تشخیص بیماری‌ها شد. داده‌های بدست آمده در حوزه متابولومیکس بسیار پیچیده بوده و با کمک روش های کمومتریکس می توان از پیچیدگی این داده ها کاسته و بیشترین اطلاعات ممکن را از آن استخراج نمود.

۱-۵-۱- مشکلات موجود در داده‌های متابولومیکس

به دلیل پیچیدگی نمونه های مورد آنالیز و همچنین مشکلات ناشی از دستگاه ها، داده های بدست آمده در متابولومیکس بسیار پیچیده بوده و نیاز به یک سری تکنیک ها برای کاهش این پیچیدگی می باشد. مهمترین مشکلات موجود در داده های بدست آمده در حوزه علم متابولومیکس عبارتند از:

(۱) تغییر خط زمینه[۱۲] و پیک زمینه[۱۳]

(۲) انواع مختلف نویز همو و هترو

(۳) تغییر در شکل پیک (پیک‌های غیر گوسینی)

[10] GC-MS and LC-MS
[11] NMR
[12] Baseline drift
[13] Spectral background

Archive of SID
www.SID.ir

(۴) نسبت های سیگنال به نویز پایین

(۵) شیفت در زمان های بازداری

(۶) هم سویشی که به صورت همپوشانی و یا مخفی شدن پیک ها می‌باشد.

در تمامی این موارد، کمومتریکس می تواند این مشکلات را حل کند.

۱-۶- کمومتریکس

شیمی تجزیه به عنوان علم مطالعه جداسازی، شناسایی و اندازه گیری کمی گونه‌های شیمیایی در مواد طبیعی و مصنوعی به کمک روش‌های کلاسیک و دستگاهی شناخته می‌شود. با توجه به پیچیدگی بافت نمونه‌های طبیعی، بدست آوردن اطلاعات کیفی و کمی از یک یا چند گونه هدف به عنوان یکی از مهم‌ترین چالش های شیمیدان‌های تجزیه مطرح است. تلاش در جهت تسهیل حصول اطلاعات از نمونه‌های پیچیده با حداکثر گزینش پذیری، حساسیت و تکرار پذیری باعث توسعه شگرفی در شیمی تجزیه از نقطه نظر تکنیکی و دستگاهی شده است. در واقع با ورود به دنیای فن آوری‌های جدید، علم شیمی هم دچار تحولات زیادی به خصوص در زمینه شیمی تجزیه شده است. با ورود دستگاه‌هایی با توانمندی‌های بالا جهت تولید داده‌ها، مشکل بدست آوردن اطلات که روزگاری نه چندان دور، معضلی برای شیمیدان‌ها تلقی می‌شد، را آسان کرده است. اما سوالی که مطرح است این است که چگونه می‌توان به ماکزیمم اطلاعات از این تعداد داده‌های وسیع رسید؟ حجم بالای داده های تولید شده توسط دستگاه‌ها باعث ایجاد نیاز به تکنیک‌های قدرتمند در جهت پردازش این حجم وسیع داده‌ها و استخراج اطلاعات مفید از سیستم مورد مطالعه می‌شود.

کمومتریکس به عنوان یک علم جدید و جوان در شیمی، می‌تواند تا حدودی پاسخگوی این نیاز باشد. این علم جدید با بهره گیری از علوم ریاضی و آمار کمک شایانی به حل این مسئله کرده است. اسوانت ولد در سال ۱۹۷۴ با طرح سوال زیر یک تعریف کلی برای کمومتریکس ارائه کرد: چگونه می‌توان اطلاعات شیمیایی را از داده‌های اندازه گیری شده بدست آورد و آنها را ارائه و نمایش داد؟ در این دهه، کمومتریکس، توجه شیمیدان‌های تجزیه را به خود جلب کرد و طی آن شیمیدان‌ها علاوه بر روش‌های موجود مورد استفاده، روش های جدیدی را در جهت رفع نیازهایشان توسعه دادند. به طور کلی می‌توان روش‌های موجود در زمینه‌ی کمومتریکس را در هفت دسته تقسیم بندی کرد:

(۱) روش‌های تفکیک منحنی چند متغیره[۱۴]

(۲) روش‌های کالیبراسون چند متغیره[۱۵]

[14]Multivariate curve resolution

Archive of SID

www.SID.ir

(۳) روش‌های تشخیص الگو[۱۶]

(۴) روش‌های ارتباط کمی ساختار فعالیت[۱۷]

(۵) روش‌های آنالیز تصویری[۱۸]

(۶) روش‌های طراحی آزمایش[۱۹]

(۷) روش های کالیبراسیون مرتبه دوم[۲۰]

۱-۶-۱- روش های تفکیک منحنی چند متغیره(MCR)

در تفکیک یک سیستم چند جزئی، هدف اصلی تبدیل داده‌های تجربی خام اولیه به اطلاعات مفید است. بدین ترتیب می‌توان توصیف مناسبی از سهم هر جز حاضر در مخلوط با استفاده از داده‌های خام اولیه داشت. علیرغم ماهیت پیچیده‌ی سیستم‌های چند جزئی، واریانس در اندازه گیری‌های اولیه می‌تواند در بسیاری از حالات به صورت یک مدل جمع پذیر خطی وزن دار از پاسخ‌های خالص برای هر گونه بیان شود. هدف مشترک تمامی روش‌های تفکیک چند متغیره ایجاد یک مدل خطی از سهم اجزا خالص تنها با استفاده از داده‌های تجربی اولیه می‌باشد. تمامی روش‌های تفکیک منحنی چند متغیره به طور ریاضی، پاسخ کلی بدست آمده توسط دستگاه را که به صورت یک ماتریس جمع آوری شده است را به سهم اجزا خالص آن تجزیه می‌کند. به طور مثال، تمام اندازه گیری‌های انجام شده توسط دستگاه‌هایی مانند HPLC-DAD و GC-MS در یک ماتریس جمع آوری می‌شوند که در آن یک جهت در ماتریس نشان دهنده‌ی تغییرات ترکیب غلظت گونه‌ها در سیستم و جهت دیگر اشاره به تغییر در پاسخ (سیگنال طیف سنج جرمی یا سیگنال اسپکتروفتومتر) جمع آوری شده است (۱۵) روش‌های تفکیک منحنی این امکان را فراهم می‌آورند که ماتریس داده‌های اولیه را بتوان به دو ماتریس C و S^T که هر کدام از آنها حاوی الگوهای پاسخ اجزا خالص است، تجزیه نمود. به زبان ماتریسی بیان کلی برای همه‌ی روش‌های تفکیک منحنی به صورت مدل دو خطی زیر می باشد:

$$X = C\,S^T + E$$

که در آن $X(r \times n)$ ماتریس داده‌های اولیه، $C(r \times n)$ و $S^T(n \times c)$ ماتریس‌های حاوی الگوهای اجزا خالص مرتبط به واریانس داده‌ها در جهت سطری و در جهت ستونی است و $E(r \times c)$ ماتریس خطا است که شامل واریانس باقیمانده داده‌ها می‌باشد. عملکرد صحیح یک روش تفکیک منحنی چند متغیره به شدت به پیچیدگی سیستم چند جزئی بستگی دارد. به خصوص توانایی در بازیابی صحیح الگوهای طیفی و

---

[15] Multivariate calibration
[16] Pattern recognition
[17] Quantitative structure-activity relationship
[18] Image analysis
[19] Design of experiment
[20] Second-order calibration

Archive of SID
www.SID.ir

غلظتی برای اجزای خالص به میزان همپوشانی بین الگوهای خالص اجزای مختلف بستگی دارد. بطور کلی شرایط لازم جهت تفکیک صحیح الگوهای غلظتی و طیفی یک جز را طی دو قضیه زیر می‌توان بیان کرد:

۱- الگوی غلظتی یک ترکیب زمانی به طور صحیح می‌تواند بازیابی شود که همه‌ی اجزای موجود در داخل پنجره‌ی غلظتی آن در بیرون آن نیز حضور داشته باشند.

۲- طیف یک ترکیب زمانی به طور صحیح می‌تواند بازیابی شود که پنجره‌ی غلظتی آن به طور کامل در داخل پنجره غلظتی یک ترکیب دیگر مخفی نباشد.

با توجه به نیاز همیشگی در شیمی تجزیه به کسب اطلاعات کیفی و کمی گونه‌های هدف در ماتریس های پیچیده، نقش روش های تفکیک منحنی چند متغیره از همان ابتدای تولد کمومتریکس مورد توجه شیمیدان‌های تجزیه بوده است.

به طور کلی روش های تفکیک منحنی چند متغیره به دو دسته کلی روش های غیرتکرارشونده [۲۱]و تکرار شونده [۲۲]طبقه بندی می شوند. نمونه ای از روش های غیر تکرارشونده، روش HELP و نمونه ای از روش های تکرارشونده، MCR-ALS و MCR-FMIN می‌باشد (۱۶).

۱-۶-۱-۱- روش تفکیک منحنی چند متغیره-حداقل مربعات متناوب(MCR-ALS)

این روش در سال ۱۹۹۳ توسط تاولر و همکارانش پیشنهاد و توسعه یافته است. این روش یک روش تکرار شونده بوده که طی آن مدل دو خطی ارائه شده در معادله به طور متناوب به کمک مقادیر اولیه الگوهای غلظتی یا طیفی اجرا می‌شود و ماتریس‌های مربوط به الگوهای طیفی و غلظتی در هر تکرار الگوریتم، تحت اعمال محدودیت‌های شیمیایی مناسب با ALS محاسبه می‌شوند.

مراحل کلی روش MCR-ALS به صورت زیر می‌باشد:

(۱) تعیین تعداد گونه های شیمیایی موجود در ماتریس X

(۲) محاسبه مقادیر اولیه الگوی غلظتی یا طیفی به عنوان مثال C

(۳) محاسبه S^T تحت اعمال محدودیت های شیمیایی

(۴) محاسبه C تحت اعمال محدودیت های شیمیایی

(۵) بازسازی ماتریکس X از حاصلضرب CS^T

(۶) برگشت به مرحله ۳ تا زمانی که شرط لازم جهت توقف الگوریتم فراهم شود.

[21] Non-iterative
[22] Iterative

Archive of SID
www.SID.ir

فصل دوم

روش اجرای تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه سرم خون زنان مبتلا به بیماری اندومتریوز (مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا، کلینیک اندومتریوز) که بیماری و شدت آن در این افراد توسط جراحی لاپاروسکوپی به تایید رسیده است به تعداد ۱۸ نمونه(سه نمونه مربوط به مرحله ۱و۲ و پانزده نمونه مربوط به مرحله ۳و۴ بیماری) تهیه شد، همچنین سرم خون زنان سالم (از طریق جراحی لاپاروسکوپی تایید شد که اندومتریوز ندارند) نیز به عنوان گروه کنترل به تعداد ۱۵ نمونه تهیه شد. در ضمن سن ، BMI، فازهای سیکل قاعدگی، مصرف داروهای استفاده شده و سابقه بیمای و جراحی نیز در نظر گرفته شد.

۲-۲- استخراج متابولیت‌های قطبی:

پیش از بررسی نمونه‌های سرم توسط دستگاه MS-GC ابتدا می‌بایست متابولیت‌های قطبی از غیر قطبی(چربی دوست) جدا سازی شوند. بطور خلاصه متابولیت‌های قطبی به شرح زیر استخراج شدند: µl ۴۰۰ سرم با µl ۵۰۰ متانول خنک (با خلوص HPLC) که به نسبت ۹:۱حجم/حجم با آب دو بار تقطیر مخلوط شده است، مخلوط و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شوند سپس به مدت ۸ دقیقه با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ µl ۴۰۰-۳۰۰ از مایع سطحی که حاوی متابولیت‌های قطبی است جهت خشک کردن به دستگاه خلاء انتقال داده شد.

۲-۳- مشتق سازی متابولیت‌های قطبی:

پس از تبخیر سریع، روش معمول مشتق سازی برای متابولیت‌های قطبی انجام شد. به عصاره باقی مانده µl۴۰ از پیریدین با درجه خلوص ACS به همراه mg/ml ۲۰ متوکسی‌آمین هیدروکلراید افزوده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس µl ۵۰ از MSTFA[۲۳] به همراه یک درصد TMCS[۲۴] به آن افزوده شد. ترکیب بدست آمده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد (جهت اطمینان از انحلال کامل در این مدت، نمونه دوبار به مدت یک دقیقه ورتکس شدند). نمونه‌های مشتق سازی شده به مدت ۴۸ ساعت تا تزریق به دستگاه GCMS در دمای ۴ درجه سانتیگراد قابل نگهداری می‌باشد.

۲-۴- تزریق نمونه به دستگاه GC-MS :

نمونه‌های مشتق سازی شده توسط دستگاه ion trap GC/MS 4000 کمپانی Varian مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۲µl از نمونه بوسیله سرنگ همیلتون با نسبت تقسیم ۵ به ۱ به دستگاه GC-MS تزریق شد. بطور خلاصه مشخصات و شرایط دستگاه به شرح زیر می‌باشد: در این دستگاه از ستون موئین به طول ۳۰ متر با قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت ۱۲۵ میکرومتر استفاده شده است. دمای محل تزریق بر روی ۲۵۰ درجه سانتیگراد، سرعت جریان گاز هلیم برابر با ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و دمای ابتدایی بر روی ۵۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد. گرادیان دمایی برابر با ۱۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه تا حد اکثر دمای ۳۱۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۵ دقیقه تنظیم گردید.

---

[23] N-Methyl-N-Trifluoroacetamide
[24] Trimethylchlorosilane

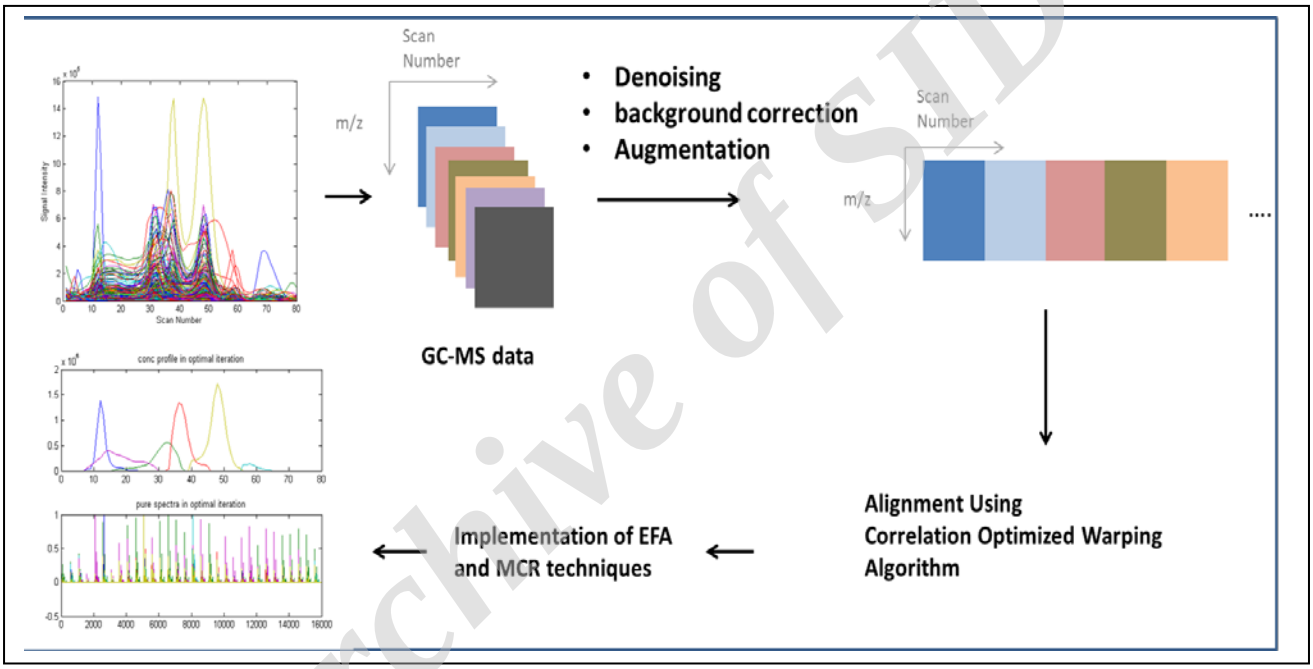
Archive of SID
www.SID.ir

یک نرم افزار کامپیوتری تخصصی نتیجه استخراج شده از دستگاه GC-MS را مورد آنالیز قرار می دهد به این ترتیب که به شناسایی متابولیت های تشخیص داده شده توسط دستگاه GC-MS می پردازد.

در نهایت، نرم افزار های آماری به تحلیل کمی متابولیت‌های شناسایی شده پرداخته و با بررسی همبستگی ها و معنی دار بودن روابط آماری به دست آمده با مقایسه دو گروه بیمار و سالم ، الگوی خاصی که به صورت یک مارکر تشخیصی عمل خواهد کرد را به دست خواهند داد.

۲-۵- تحلیل داده‌ها با روش‌های کمومتریکس

در این مطالعه از دو روش تحلیل عاملی تکاملی[۲۵] و تفکیک منحنی چند متغیره–حداقل مربعات متناوب[۲۶] جهت پردازش داده ها و استخراج پروفیل غلظت و طیف جرم در هر بخش استفاده شده است. روند کامل آنالیز داده‌ها بطور خلاصه در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- شمایی کلی از روند آنالیز داده‌های دستگاه GC-MS با روش‌های کمومتریکس.

همانطور که در این قسمت مشاهده می شود ابتدا نویز و پیک‌های زمینه از داده‌ها حذف می‌شوند. بعد از آن داده‌ها در نمونه‌های مختلف به هم ملحق می‌شوند و پس از آن ماتریس حاصل از الحاق داده‌ها با استفاده از الگوریتم correlation optimized warping همتراز می‌شود و داده‌های همتراز شده با استفاده از الگوریتم MCR-ALS پرازش می‌شود تا پروفایل‌های غلظتی و طیفی آنالیت‌هایی که در نمونه‌های اندومتریوزیس به صورت بیومارکر می‌باشند بدست آید.

[25] Evolving factor analysis(EFA)
[26] Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Square (MCR-ALS)

Archive of SID
www.SID.ir

فصل سوم

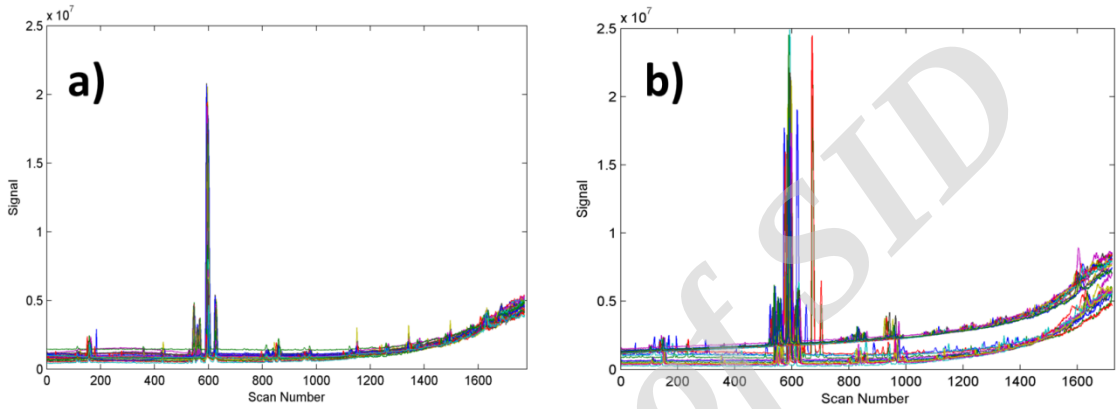
یافته‌های تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

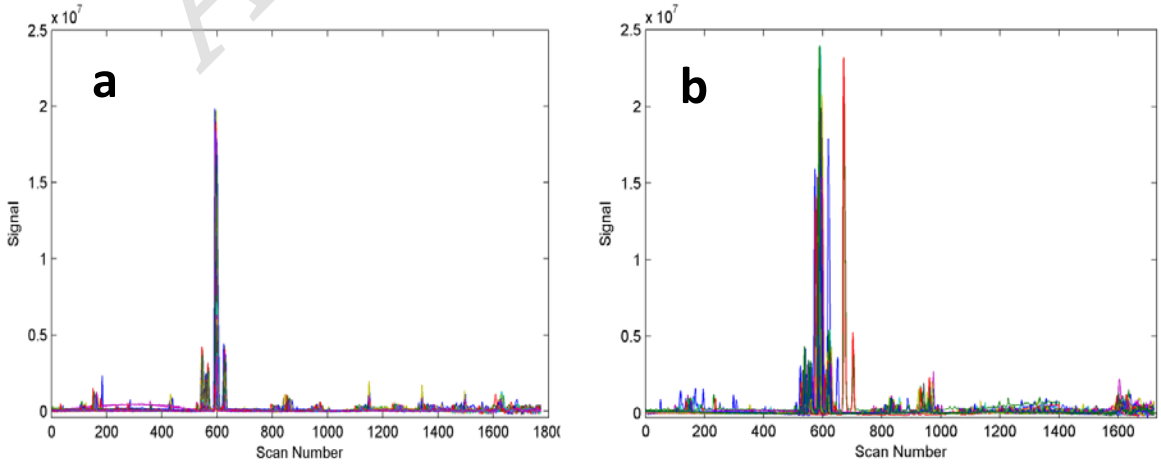
یافته‌ها:

در این مطالعه بر آن شدیم تا با استفاده از داده‌های GC-MS تفاوت بین گروه‌های اندومتریوزیس و نمونه‌های سالم را تشخیص دهیم. این مطالعه کمک شایانی به ارائه‌ی راهی نوین و کم هزینه برای تشخیص اندومتریوزیس و همچنین ارائه‌ی مکانیسم مولکولی آن خواهد نمود. در این مطالعه ۱۵ نمونه اندومتریوزیس در فاز ۳ و۴ که هر کدام سه بار تکرار شدند و ۱۵ نمونه سالم که هر کدام دو بار تکرار شدند مورد مطالعه قرار گرفتند. شکل (۱) نمودار کروماتوگرام یونی نمونه‌های سالم و اندومتریوزیس را نشان می‌دهد. شکل (a) مربوط به نمونه‌های سالم و شکل (b) مربوط به نمونه‌های اندومتریوز می‌باشد.



شکل ۳: نمودار کروماتوگرام یونی حاصل از تزریق نمونه سرم به دستگاه GC-MS، نمونه‌های سالم (a) و اندومتریوزیس(b)

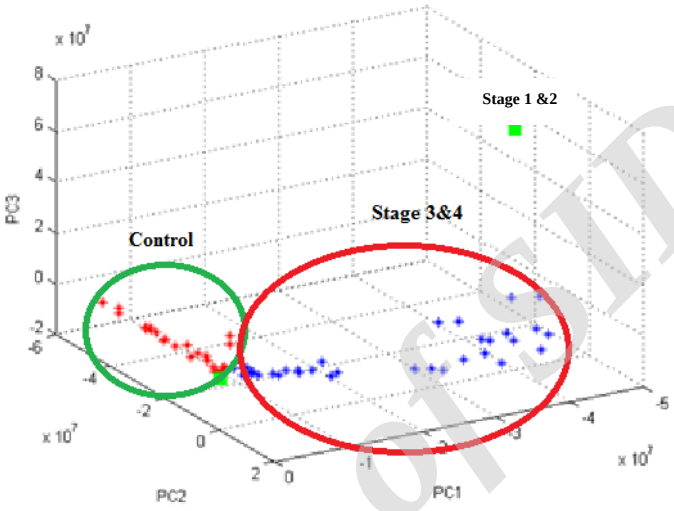
از شکل ظاهری این کروماتوگرام‌ها بر می‌آید که پیک زمینه‌ی زیادی در تمام آن‌ها وجود دارد. از این رو نیاز به حذف پیک‌های زمینه در آنالیز-های بعدی برای این نمونه‌ها می‌باشد. از این رو با الگوریتم‌های مختلفی از جمله airPLS، iBRANN و iPF به حذف پیک‌های زمینه پرداختیم که بهترین نتایج با استفاده از روش iBRANN حاصل شد. شکل (۲) نتایج حذف پیک‌های زمینه را در داده‌های سالم و نمونه‌های اندومتریوزیس نشان می‌دهد. همان طور که مقایسه‌ی شکل‌های (۱) و (۲) نشان می‌دهد بعد از اعمال روش iBRANN بر روی داده‌ها نویز-های زمینه به خوبی از داده ها حذف شده است.



شکل ۴: حذف نویز زمینه از کروماتوگرام

Archive of SID
www.SID.ir

همانطور که از مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، تفاوت بارزی بین نمونه‌های اندومتریوزیس و نمونه‌های سالم وجود دارد. به منظور بررسی آماری این مسئله از روش آنالیز اجزای اصلی استفاده شد. به این ترتیب که هر نمونه و هر کروماتوگرام به صورت یک سطر در ماتریس داده در نظر گرفته شد و ستون‌های این ماتریس هم مقدار سیگنال در هر زمان بازداری در اسپکتروسکوپی جرمی می‌باشند. روش آنالیز اجزای اصلی امکان مشاهده‌ی یک داده با ابعاد بالا را در دو یا سه بعد می‌دهد و روش آماری مناسبی برای بررسی تمایز بین دسته‌های داده می‌باشد. شکل (۳) نتایج داده‌ها را در سه بعد از اجزای اصلی حاصل از الگوریتم PCA نشان می‌دهد.

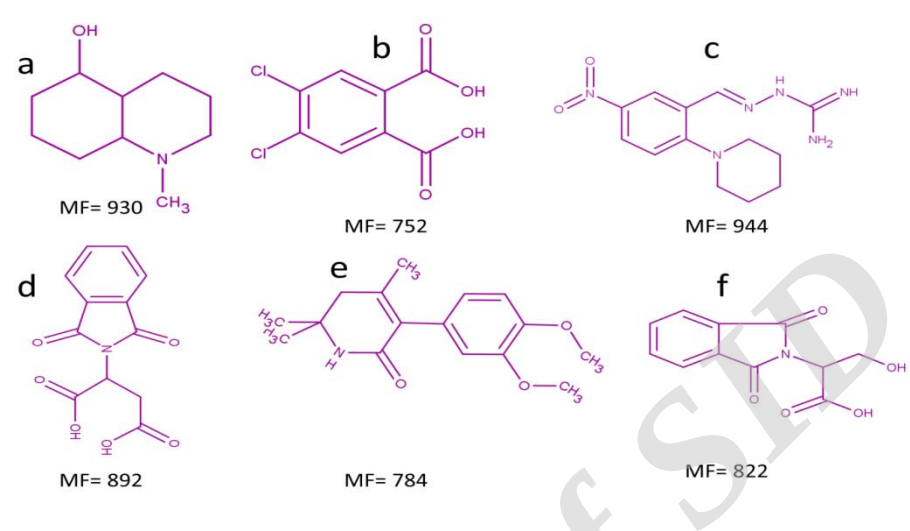


شکل ۵: نتیجه آنالیز داده‌ها بر اساس الگوریتم PCA. رنگ قرمز نشان دهنده نمونه‌های گروه سالم، رنگ سبز نشان دهنده نمونه‌های گروه ۱و۲ و رنگ آبی نشان دهنده نمونه‌های گروه ۳و۴ است.

همانطور که در شکل ۳ مشاده می‌شود نمونه‌های سالم به طور کامل از نمونه‌های اندومتریوزیس جدا شده‌اند. نمونه‌های سالم با رنگ قرمز و نمونه‌های اندومتریوزیس در مرحله‌ی ۳و ۴ با رنگ آبی و نمونه‌های اندومتریوزیس در مرحله ی ۱ و ۲ با رنگ سبز نشان داده شده‌اند. نتایج بدست آمده در این قسمت نشان می‌دهد که مدل PCA بدست آمده می‌تواند روش مناسبی برای تشخیص اندومتریوزیس از روی تنها TIC نمونه‌های خون افراد مبتلا باشد. پس از تایید توانایی تشخیص اندومتریوزیس از روی کروماتوگرام نمونه‌های خون به دنبال آنالیز داده‌ها برای دریافت رهیافت مکانیسم مولکولی این بیماری بودیم. در این راستا پیک‌هایی را که در دو دسته نمونه با یکدیگر تفاوت داشتند را با استفاده از الگوریتم GA-LDA شناسایی کردیم و پیک‌های بدست آمده را با استفاده از روش MCR-ALS آنالیز کردیم.

Archive of SID
www.SID.ir

در شکل ۵ برخی از متابولیت‌هایی را نشان می‌دهد که در نمونه‌های اندومتریوزیس یافت می‌شوند اما در نمونه‌های سالم وجود ندارند. این متابولیت‌ها می‌توانند بعنوان بیومارکرهایی شناخته شود که رهیابی آن ها به کشف مکانیسم‌های مولکولی ایجاد بیماری اندومتریوزیس بیانجامد.



شکل ۶: شش متابولیت شناسایی شده در نمونه‌های گروه اندومتریوزیس که در نمونه افراد سالم یافت نشده است.

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که:

استفاده از الگوی متابولوم سرم خون بیماران مبتلا به بیماری اندومتریوز با به کار گیری فن‌آوری کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی روشی غیر تهاجمی برای تشخیص این بیماری می‌باشد که با مطالعات بیشتر می‌تواند به عنوان تست تشخیصی جهت شناسایی زود هنگام برای درمان به موقع و جلوگیری از پیشرفت اندومتریوز در افراد مبتلا به این بیماری مطرح گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

Archive of SID

www.SID.ir

1 .Linda C. Giudice, M.D., Ph.D., Endometriosis. 2010, 362, 2389-98.

2 Mones Abu-Asab,1 Ming Zhang,2 Dennis Amini,3 Nihad Abu-Asab,4 and Hakima Amri2., Endometriosis Gene Expression Heterogeneity and Biosignature: A Phylogenetic Analysis. 2011, 2011, 1-12

3 Hong Zhang, M.D., Yidong Niu, Ph.D., Jie Feng, M.D., Ph.D., Huifang Guo, M.D., Ph.D., Xue Ye, B.S., and Heng Cui, M.D., Ph.D. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls 2006, 2, 274-282

4 Adkins, J. N., Varnum, S. M., Auberry, K. J., Moore, R. J., et al., Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 2002, 1, 947-955.

5 Barnea, E., Sorkin, R., Ziv, T., Beer, I., Admon, A., Evaluation of prefractionation methods as a preparatory step for multidimensional based chromatography of serum proteins. Proteomics 2005, 5, 3367-3375.

6 Sheng, S., Chen, D., Van Eyk, J. E., Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database. Mol Cell Proteomics 2006, 5, 26-34.

7 Gong, Y., Li, X., Yang, B., Ying, W., et al., Different immunoaffinity fractionation strategies to characterize the human plasma proteome. J Proteome Res 2006, 5, 1379-1387.

8 Petricoin, E. F., Belluco, C., Araujo, R. P., Liotta, L. A., The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. Nat Rev Cancer 2006, 6, 961-967.

9 Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. Trends Biotechnol 2004; 22: 245-52.

10 Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. Proteomics 2006; 6: 4716-23.

11 Griffin JL. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006; 361: 147-61.

12 Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chem Soc Rev; 40: 387-426.

13 Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. J Nutr 2007; 137: 259S-66S.

Archive of SID

www.SID.ir

14 Beisken, S., M. Eiden, and R.M. Salek, Getting the right answers :understanding metabolomics challenges. Expert Rev Mol Diagn, 2015. 15(1): p. 97-109

15 Jaumot, J., et al., Multivariate curve resolution: a powerful tool for the analysis of conformational transitions in nucleic acids. Nucleic Acids Res, 2002. 30

16 Tauler, R., Application of non-linear optimization methods to the estimation of multivariate curve resolution solutions and of their feasible band boundaries in the investigation of two chemical and environmental simulated data sets. Anal Chim Acta, 2007. 595(1-2): p. 289-98.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract:

Endometriosis, an estrogen dependent gynecologic disorder, affects 6% to 10% women of reproductive age. Endometriosis is defined as the presence of endometrial-like tissue outside the uterine cavity. At present, the gold standard for diagnosis of endometriosis is laparoscopic inspection with histologic confirmation after retrieval of lesions. Laparoscopy is a surgical procedure with rare but significant potential risks for the patients. A non-invasive diagnostic test has the potential to offer early treatment and prevent progression. The aim of this study was to investigate Metabolomics Profiling of the blood serum patients with endometriosis using GC-MS.

Blood serum was collected from women undergoing laparoscopy for different symptoms including eighteen patients had histologically confirmed endometriosis: 3 patients were classified with minimal-to-mild disease (Stages I and II) and 15 patients with moderate-to-severe disease (Stages III and IV). Fifteen normal women participated as control group. Sample were inject to GC-MS system. Advanced chemometrics methods have been used for analyzing the data. Principal component analysis (PCA) technique was implemented on total ion chromatograms (TICs) for identification of discriminatory retention times. Our results clearly revealed that the PCA models could predict the classes of samples using their TIC data. Finally, we could identify six discriminatory metabolites. These metabolites may be considered potential discriminatory biomarkers for different groups studied in the current work.

Key words: Endometriosis, GC-MS, Metabolomics

Archive of SID

www.SID.ir

Academic Center for Education, Culture and Research
Deputy of Research and Technology

Avicenna Research Institute
Monoclonal Antibody Research Center
Research group: Reproductive Immunobiology

Title:

Metabolomics profiling of the blood Serum for women with endometriosis by GC-MS: a non-invasive early identification for diagnosis of endometriosis

Code: 2141-33

Ref. No. of Research Ethics Committee:92-011

BY:

Kambiz Gilany (Ph.D)

Amir Hassan Zarnani (Ph.D)

Date: September 2016

Archive of SID

www.SID.ir