

## اثرات هیدروژنه شدن زنجیره‌های اسیدهای چرب در ماهیت منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول

دکتر آزاد رضا منصوریان\*، دکتر اختر سیفی\*\*

### چکیده

منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول یک گلیکولیپید با درصد زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع همراه می‌باشد. این گلیکولیپید وقتی در آب پخش می‌شود، ساختمان غیردولایه شش و جهی به خود می‌گیرد. این لیپید عمدتاً در غشاء تیلاکوئیدی کلروپلاست به مقدار زیاد حضور دارد. اسیدهای چرب این لیپید را به کمک کاتالیزور و با فن هیدروژناسیون، کاملاً اشباع نموده که با این واکنش شیمیایی یعنی تغییر وضعیت اشباع شدن زنجیره‌های اسیدهای چرب، تغییراتی در ساختمان این گلیکولیپید ایجاد می‌شود، به طوری که بعد از هیدروژنه شدن و قراردادن لیپید در محیط آبی، ساختمان صفحه مانند جایگزین شکل شش و جهی می‌شود. ما برای بررسی بیشتر این موضوع، منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول طبیعی و اشباع شده را با هم مخلوط، و در آب پخش کردیم. وضعیت جدید و نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد که در اثر هیدروژناسیون لیپید، دو قسمت جدا از هم را مشاهده خواهیم کرد که یکی در ارتباط با ساختمان شش و جهی مربوط به لیپید طبیعی است و دیگری وضعیت صفحه مانند است که به گلیکولیپید اشباع شده مربوط می‌باشد. از میکروسکوپ الکترونی جهت تشخیص وضعیت‌های منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول استفاده نمودیم. منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول یکی از لیپیدهایی است که به وفور در غشاء تیلاکوئیدی کلروپلاست دیده می‌شود. این غشاء و سایر غشاءهای زیستی برای بسیاری از اعمال حیاتی خود چنین تغییراتی را در ساختمان خود شاهد خواهند بود. یکی از راه‌هایی که غشاء می‌تواند چنین واکنش‌هایی را از خود نشان دهد، تغییر وضعیت اشباع‌شدگی اسیدهای چرب بعضی از لیپیدهای موجود در غشاء می‌باشد. این مطالعه حاکی از آن است که با هیدروژنه کردن اسیدهای چرب منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول چنین تغییر و تحولی را در این لیپید و در نتیجه در ساختمان غشاء زیست‌شناختی شاهد خواهیم بود.

**واژه‌های کلیدی:** منوگالاکتوزیل دی اسیل گلیسرول، غشاء زیستی، هیدروژناسیون، میکروسکوپ الکترونی

\* - عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی گرگان  
\*\* - عضو هیأت علمی گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

## مقدمه

یکی از مهم‌ترین خصوصیات بارز بیشتر غشاهای بیولوژیک (زیستی) حضور اسیدهای چرب با زنجیره‌های متفاوت و مخصوصاً اسیدهای چرب با تعداد ۱۶ و ۱۸ کربنی می‌باشند که درصد بالایی را شامل می‌شوند (۱). اگر اسید چرب ۱۶ کربنی کاملاً اشباع باشد اسیدپالمیتیک، اگر همین اسیدچرب ۱۶ کربنی دارای یک پیوند دوگانه باشد (۱۶:۱) اسید پالمیتولئیک نامیده می‌شود. در مورد زنجیره ۱۸ کربنی، اسید استئاریک (۱۸:۰) کاملاً اشباع است و اسیداولئیک (۱۸:۱)، اسید لینولئیک (۱۸:۲) و اسید لینولئیک (۱۸:۳) به ترتیب دارای یک پیوند الی سه پیوند غیراشباع می‌باشند. بایستی متذکر شد که اسیدآراشیدونیک (۲۰:۴) اسیدچرب ۲۰ کربنی با چهار پیوند *sis* نیز از اسیدهای چربی است که در غشاء بیولوژیک دیده می‌شود (۲).

اسیدهای چرب موجود در غشاء، هم از نظر طول زنجیره و هم از حیث تعداد پیوندهای غیراشباع *sis* به صورت هتروژنیک بوده و طول زنجیره‌ها و وضعیت اشباع‌شدگی آنها به عملکرد غشاهای بیولوژیک کمک می‌نماید. بر این اساس و به منظور بررسی وضعیت لیپیدهای غشاء و اثرات هیدروژناسیون این زنجیره‌ها پروژه تحقیقاتی حاضر طراحی و انجام شده است.

## وسایل و روش‌ها

## ۱ - تهیه لیپیدهای قطبی غشاء بیولوژیک

برای تهیه لیپیدهای قطبی غشاء ۱۰۰ گرم از برگ‌های اسفناج شسته شده را در ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول کلروفورم - متانول (۱:۲ درصد حجمی) هموژنیزه می‌کنیم، آنگاه

محصول حاصله را صاف نموده تا مواد اضافی از محلول جدا شوند. در مرحله دوم، این محلول صاف شده را با ۴۰۰ میلی‌لیتر از حلال دیگری که شامل کلروفورم - متانول - آب (۸/۰:۱:۱:۰ درصد حجمی) است، می‌شوئیم. در مرحله سوم محلول به دست آمده، با ۱۵۰ میلی‌لیتر کلروفورم - متانول (۲:۱ حجمی) شسته می‌شود. سرانجام به کل محلول تهیه شده، ۲۵۰ میلی‌لیتر کلروفورم و ۲۹۰ میلی‌لیتر آب اضافه می‌نمائیم و محلول را کاملاً تکان می‌دهیم تا به خوبی مخلوط شود. با این عمل در نهایت کل محلول به دو فاز تقسیم خواهد شد که لیپیدهای قطبی برگ‌های اسفناج در قسمت پائینی قیف جداکننده قرار خواهند گرفت. سپس به کمک دستگاه تقطیر این محلول را خشک کرده و با اضافه نمودن ۲ میلی‌لیتر کلروفورم به این لیپید خشک شده و هم‌چنین اضافه نمودن آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چربی که دارای پیوندهای غیراشباع می‌باشند، آن را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا شروع آزمایش نگهداری می‌کنیم (۳).

۲ - جدا کردن منوگالاکتوزیل دی‌اسیل‌گلیسرول (*MG*) از لیپیدهای قطبی

برای تهیه منوگالاکتوزیل دی‌اسیل‌گلیسرول<sup>۱</sup> (*MG*) از فن کروماتوگرافی (ستون فلوروسیل) استفاده شده است. لیپیدهای قطبی استخراج شده در مرحله فوق، داخل ستون بورت محتوی فلوروسیل قرار داده و چهاربرابر مقدار حجم فلوروسیل داخل بورت کلروفورم اضافه می‌شود. شیر بورت را به طوری باز می‌کنیم که سرعت خروج کلروفورم از ستون کروماتوگرافی ۳ میلی‌لیتر در دقیقه باشد. با این روش تمام

می‌شود و برای بررسی وضعیت هیدروژنه شدن زنجیره‌های اسیدهای چرب از دستگاه کروماتوگرافی با گاز و مایع<sup>۲</sup> (G.L.C) استفاده می‌شود (۳).

۵ - تهیه نمونه MG برای استفاده از میکروسکوپ الکترونی  
MG پخش شده در آب برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس نمونه مورد آزمایش در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس نمونه‌های منجمد شده در دمای ۱۱۵- درجه سانتی‌گراد شکسته شده و سریعاً بعد از شکسته شدن نمونه به وسیله دستگاه شکست انجماد<sup>۳</sup>، از پلاتونیوم و کربن برای تهیه نمونه میکروسکوپی، از قسمت‌های شکسته شده استفاده نموده و نمونه‌ای که به این ترتیب تهیه می‌شود در دستگاه میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار می‌گیرد<sup>۴</sup>.

#### یافته‌ها

۱ - وضعیت زنجیره‌های اسیدهای چرب دی اسیل گلیسرول (الف) برای بررسی اسیدهای چرب MG از دستگاه (GLC) استفاده شد که جدول شماره یک ترکیب اسیدهای چرب را در حالت طبیعی استخراج شده نشان می‌دهد.  
(ب) همان طور که پیش از این اشاره شد، MG طبیعی را به کمک کاتالیزور هیدروژنه کرده و نتایج حاصله با استفاده از دستگاه (GLC) در جدول شماره ۲ مشخص شده است. این نتایج نشان می‌دهند که هیدروژناسیون کامل صورت گرفته است.

لیپیدهای خنثی و پیگمان‌ها از بورت خارج می‌شوند. برای جداسازی MG، از حلالی که به نسبت مساوی شامل کلروفرم و استون می‌باشد، استفاده می‌شود. بنابراین بعد از خارج شدن کلروفرم در مرحله بعدی از حلال کلروفرم - استون به مقدار پنج برابر حجم مقدار فلوروسیل داخل بورت استفاده می‌شود و این حلال را هم با همان سرعت ۳ میلی‌لیتر در دقیقه از بورت می‌گذرانیم که MG با این حلال از بورت خارج خواهد شد. پس از تهیه این محلول MG، به کمک دستگاه تقطیر MG خشک را تهیه و به آن ۲ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه می‌نمائیم (۳).

۳ - تهیه متوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول خالص

برای تهیه MG خالص و عاری از پیگمان از فن کروماتوگرافی با لایه نازک<sup>۱</sup> (T.L.C) استفاده می‌شود. حلال مورد نیاز، استون - بنزن - آب با نسبت حجمی (۸:۳۰:۹۱) بوده و برای اطمینان از تهیه MG خالص ۱۰۰ درصد از یک MG استاندارد استفاده می‌شود (۳).

۴ - هیدروژنه نمودن متوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول

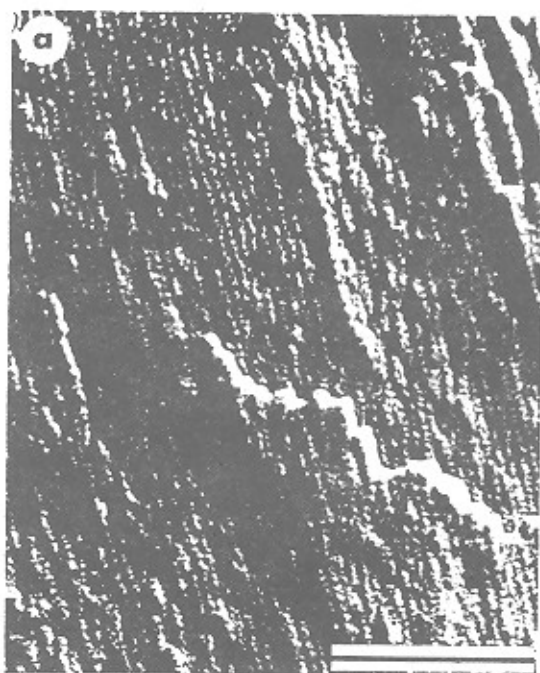
برای تهیه محلول MG از بنزن اشباع شده با گاز نیتروژن استفاده می‌شود و برای هیدروژنه کردن لیپید به اندازه وزن لیپید به آن کاتالیزور و اکنتس هیدروژناسیون اضافه می‌نمائیم و به این مخلوط برای مدت ۱۰ دقیقه، گاز نیتروژن می‌دهیم و سپس گاز هیدروژن ( $H_2$ ) را به محیط اضافه می‌نمائیم. برای هیدروژناسیون کامل، این عمل را برای مدت ۲۴ ساعت ادامه می‌دهیم. بعد از این مدت از دستگاه سانتریفوژ برای جداسازی کامل کاتالیزور از محلول MG استفاده می‌کنیم. به منظور تهیه لیپید خالص و عاری از سایر مواد زائد از روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) استفاده

1 - Thin layer chromatography

2 - Gas liquid chromatography

3 - Freeze Fracture Device

۴ - مطالعات لیپید توسط میکروسکوپ الکترونی در دانشگاه لندن انجام شده است.



شکل شماره ۱: (a) میکروگراف تهیه شده از نمونه منوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول طبیعی، ستون‌های استوانه‌ای شکل (Hexagonal) را در لیپیدهای طبیعی با زنجیره‌های غیر اشباع نشان می‌دهد.  
(خط میزان = ۱۵۰nm)

لیپید اشباع شده می‌باشد که توسط میکروسکوپ الکترونی بدست آمده است. مشاهده می‌شود که با هیدروژنه نمودن این پیوندهای غیر اشباع اسیدهای چرب، تغییر و تحولی در ساختمان این گلیکولیپید پدیدار می‌گردد که وضعیت شش وجهی غیردولایه را به صورت وضعیت صفحه مانند که همان ساختمان دو لایه لیپیدهای غشاء می‌باشد، تبدیل می‌کند. نمونه مورد آزمایش قبل از انجام کار در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه روز نگهداری شده است (۴).  
(ج) بررسی وضعیت هتروژنیک نسبت‌های مساوی از MG طبیعی و اشباع شده

زمانی که نمونه طبیعی منوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول و نوع اشباع آن را با وزن مساوی، هم زمان با هم

جدول شماره ۱: ترکیب اسیدهای چرب

منوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول در لیپید طبیعی

ترکیب اسیدهای چرب در MG mol%					
۱۶:۰	۱۶:۱	۱۸:۰	۱۸:۱	۱۸:۲	۱۸:۳
۱۸	۷	—	۱	۲۱:۵	۵۲:۵

جدول شماره ۲: ترکیب اسیدهای چرب

منوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول در لیپید هیدروژنه شده

ترکیب اسیدهای چرب در MG هیدروژنه شده mol%					
۱۶:۰	۱۶:۱	۱۸:۰	۱۸:۱	۱۸:۲	۱۸:۳
۲۵	—	۷۵	—	—	—

۲ - نتایج مطالعات انجام شده با میکروسکوپ الکترونی

الف) میکروگراف (MG طبیعی) میکروسکوپ الکترونی استخراج شده از غشاء تیلاکوئید کلروپلاست در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. نتیجه حاصل از این مطالعه، تشکیل ساختمان شش وجهی استوانه‌ای شکل (Hexagonal) است که همان تشکیل لیپید غیردولایه غشاء می‌باشد. برای تهیه این میکروگراف قبل از شروع شکست انجاماد، MG محلول در آب را در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز نگهداری کردیم (۴).

ب) MG اشباع شده

همان طور که در بحث وسایل و روش‌ها بیان شد، گلیکولیپید طبیعی را به کمک گاز هیدروژن، کاملاً اشباع کردیم، و پیوندهای دوگانه s/s را به پیوندهای اشباع شده تبدیل و منوگلاکتوزیل دی اسیل گلیسرول کاملاً هیدروژنه شده را تهیه نمودیم. شکل شماره ۲ میکروگراف نمونه



شکل شماره ۳: (c) میکروگراف تهیه شده از مخلوط مساوی نمونه طبیعی MG و اشباع شده این لیپید که تشکیل فاز لیپید دولایه را در کنار لیپید غیر دولایه نشان می‌دهد.  
(خط میزان = ۱۵۰nm)



شکل شماره ۲: (b) میکروگراف تهیه شده از نمونه اشباع شده متوگالاتوزیل دی اسیل گلیسرول می‌باشد که به علت هیدروژنه شدن ستون‌های استوانه‌ای شکل شش وجهی به صفحات لیپیدهای دولایه تبدیل شده است.  
(خط میزان = ۱۵۰nm)

نسبت‌های مخلوط شده در میکروگراف میکروسکوپ الکترونی قابل رؤیت است.

#### بحث

برای این که لیپیدهای غشاء به طور هم‌وزینه در یک محیط آبی پخش شوند، نه تنها به درجه حرارت انتقالی (TC) که لیپید ژل مانند را به کریستال مایع تبدیل می‌کند، بستگی دارد بلکه عامل دیگری که در این میان نقش مهمی بازی می‌کند وضعیت لیپیدهایی است که می‌توانند به جای تشکیل ساختمان متعارف دو لایه صفحه مانند، ساختمان غیردولایه شش وجهی را به خود بگیرند. نتایج این پروژه تحقیقاتی نشان می‌دهد که تغییرات ساختمان زنجیره‌های اسیدچرب گلیکولیپید موجود در غشاء، با هیدروژناسیون پیوندهای غیراشباع سیس، باعث تغییر ماهیت در وضعیت

مخلوط، و در محیط آبی پخش می‌کردیم و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه روز نگهداری نمودیم میکروگراف میکروسکوپ الکترونی (شکل شماره سه) نشان داد که تقریباً به طور کامل دو فاز جدا از هم تشکیل می‌شود که در یک طرف، وضعیت استوانه‌ای شکل شش وجهی در کنار لیپیدهای صفحه مانند که ناشی از همزیستی لیپیدهای دولایه در کنار لیپیدهای غیردولایه می‌باشد. هم چنین در حدفاصل این دو ساختمان وضعیت لایه‌های نازک صفحه‌مانندی که متعلق به MGهای اشباع که با ساختمان شش وجهی غیردولایه ممزوج شده باشد؛ دیده می‌شود. در این مطالعه مخلوط دو نوع لیپید طبیعی و اشباع شده با نسبت‌های ۷۵:۲۵ و ۸۵:۱۵ تهیه شد و نتایج حاصله حاکی از آن است که دو فاز شش وجهی و صفحه‌مانند با حفظ

در اشباع شدن اسیدهای چرب لیپیدهای غشاء بیولوژیک دخالت نمایند، به نظر می‌رسد که سلول برای تغییر و تحولانی در غشاء که برای ادامه حیات سلول به آن نیاز می‌باشد در شرایط خاص از طریق چنین مکانیسم‌ها و واکنش‌ها اعمال حیاتی مورد نظر خود را ممکن می‌سازد. همچنین سلول برای انجام بسیاری از واکنش‌های زیست‌شیمیائی فیزیولوژی به تغییرات ساختاری در غشاء نیاز خواهد داشت. این فعل و انفعالات هم از طریق آنزیم‌ها (۵) و هم از طریق تغییر در *PH* و تغییرات یونی ایجاد می‌شود (۶).

### قدردانی

بدین وسیله از زحمات پروفیسور پیتروکوئین از بخش بیوشیمی و دکتر تونی برین از واحد میکروسکوپ الکترونی کینگزکالج دانشگاه لندن تشکر و قدردانی می‌گردد.

مولکولی این لیپیدها می‌گردد. حضور لیپیدهایی که دارای درصد قابل توجهی اسیدهای چرب غیراشباع بوده، غیر از کلروپلاست، در بعضی از غشاءهای دیگر از جمله غشاء داخلی میتوکندری که دارای میزان قابل توجهی از فسفولیپید کاردیولیپین می‌باشد به اثبات رسیده است (۳۶). به طور کلی حضور چنین لیپیدهایی که ساختمان غیردولایه شش‌وجهی را تشکیل می‌دهند به استثنای غشاء میلین سلول‌های عصبی، در سایر غشاءهای بیولوژیک دیده شده است. در این میان می‌توان از فسفاتیدیل اتانول آمین (*PE*) نام برد که به جای ساختمان دولایه، ساختمان غیردولایه شش‌وجهی را به خود می‌گیرد، ولی با اشباع شدن زنجیره‌های اسید چرب ساختمان متعارف دولایه صفحه مانند را تشکیل می‌دهد. از آنجا که آنزیم‌ها و عوامل دیگری می‌توانند به طور طبیعی

### منابع

- 1 - Sim E. Membrane Biochemistry. Firth Ed, London. Chapman and Hall L+d 1982, p: 26-41
- 2 - Harrison R. Lunt G, Biological Membrane. second Ed. Great Britain (Scotland). Thomson litho L+d, 1986; p: 102-129
- 3 - Sen A, William WP, Quinn P. The structure and thermotropic properties of pure 1,2-Diacylgalactosylglycerol in aqueous systems. Biochimica, Biophysica Acta 1981; 663: 380-389
- 4 - Gounaris K. Sen A, Brain A, Quinn P & Williams P. The formation of non-bilayer structures in total polar lipid extracts of chloroplast membranes, Biochimica, Biophysica Acta. 1983; (728): 129-138
- 5 - Kular, G ; Loubtchenkov M, Swigart P. Whatmore Ball A. Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide-3-Kinase in the formyl methionyl leucylphenylalanine - dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5- triphosphate in human neutrophils. Biochemical Journal 1997; 325:99-301
- 6 - Sen A. Williams W.P, Brain A.P.R and Quinn P.J. Bilayer and non-bilayer transformation in aqueous dispersions of mixed galacosyldiacylglycerol isolated from chloroplast. Biochimica et Biophysica Acta 1982; (685): 297-306