Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۲۳-۱۱۸ (اسفند ۱۳۸۱)

بهینه سازی روش های جداسازی سلول های تک هسته ای وچندهسته ای از خون محیطی در تشخیص ویروس سیتومگال دردریافت کنندگان پیوند مغز استخوان

رامین یعقوبی* ۱ ، دکترعباس بهزاد بهبهانی ۲ ، دکتر فرزانه صباحی ۳، دکتر محمد حسن روستایی ٤ ، دکترعبدالوهاب البرزی ٥
۱دانشجوی دکتری ویروس شناسی ، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس
۲ استادیار ویروس شناسی، دانشکده پیراپزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۳ استادیار ویروس شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس
٤ دانشیار ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
٥ استاد بیماری های کودکان، مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده :
پروتئین با DNA ویروس سیتومگال در سلولهای چند هسته ای خون محیطی افراد سالم گزارش نشده است، لذا شناسایی هر گونه پروتئین با DNA این ویروس در سلولهای فوق می تواند در تشخیص عفونت فعال با بیماری با این ویروس کمک کننده باشد . این امر نیاز به استفاده از روشی دارد که بتواند حداکثر سلولهای چند هسته ای خون را از خون محیطی جدا نماید. تعداد ۱۰۰ نمونه خون غیر منعقد شده با EDTA از افراد سالم و بیماران پیوند مغز استخوان تهیه و با دو روش جدید استفاده از دکستران T70 (با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰) به جای دکستران T500 (با وزن مولکولی ۵۰۰۰۰۰) و بدون استفاده از دکستران مورد آزمایش قرار گرفتند .خلوص آنها با روش رنگ آمیزی سافرانین ۹۹-۹۸٪ و درصد حیات سلول های چند هسته ای خون محیطی، ۹۸٪ تایید شدند. نتایج حاصل نشان داد که هر دو روش فوق در مقایسه با روش استاندارد بعنوان روشهای سریع ، دقیق و ارزان در جدا سازی سلول های چند هسته ای خون محیطی از سلول های تک هسته ای خون محیطی مورد تایید می باشند.

واژگان کلیدی: ویروس سیتومگال انسانی ، پیوند مغز استخوان ، لکوسیت های چند هسته ای ، لکوسیت های تک هسته ای

* آدرس : شیراز خیابان کریم خان زند ، بیمارستان نمازی ، مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استاد البرزی ، رامین یعقوبی؛ ص.پ ۷۱۹۳۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه :

امروزه بیماریهای خونی متعددی از قبیل تالاسمی و سایر کم خونی ها با زمینه ارثی یا اکتسابی جامعه بشری را رنج می دهند . راههای درمان متعددی برای غلبه براین بیماریها وجود داشته که یکی از راههای درمانی عمل پیوند مغز استخوان می باشد . در این پیوند سلولهای اولیه خون ساز جانشین انواع معیوب می شوند . در پیوند مغز استخوان بدلیل مصرف داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی ، سیستم دفاعی بدن بدلیل کاهش لکوسیت های خون محیطی شدیدا" تضعیف می شود و زمینه را برای عود عفونت های خفته و یا ایجاد عفونت اولیه بوسیله میکروارگانیسم های گوناگون فراهم می کنند . یکی از عوامل عفونی در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان، ویروس ها می باشند . ویروس سیتومگال انسانی (HCMV) از جمله هرپس ویروس هایی می باشد که به دو صورت عود عفونت خفته و عفونت اولیه فعال در ۳۰-۲۵ درصد موارد باعث بیماری CMV و بروز علائم بالینی در بیماران گیرنده BMT می شود (۱و۲) . در کشورمان ایران ۸۹/۷ درصد از افراد زیر ۱٤ سال و ۹۸/۷ درصد از افراد بالغ دارای آنتی بادی بر علیه ویروس HCMV می باشند که درپی ضعف سیستم ایمنی امکان عود عفونت خفته در هریک از این افراد وجود دارد (۳) . HCMV در طی عفونت فعال و عفونت خفته در بدن انسان لکوسیت های خاصی را بیشتر برای ادامه حیات انتخاب می کند واز جمله در طی عفونت خفته HCMV بیشتر سلول های تک هسته ای (MNs) [1] و در عفونت فعال بیشتر لکوسیت های چند هسته ای (PMNs) [2] را انتخاب می کند (۵-٤).

در بیماران نیازمند به پیوند مغز استخوان، عفونت فعال HCMV بیشتر بروز کرده و متاسفانه باعث رد پیوند و حتی مرگ ومیر شود. بنابراین شناسایی سریع و دقیق نوع عفونت CMV در این بیماران ضروری می باشد . از آنجاییکه برای تشخیص عفونت فعال HCMV به جداسازی تعداد زیادی از سلول های PMN جهت راه اندازی آزمایش هایPCR و Antigenemia نیاز می باشد لذا به روشهای معمول جداسازی لکوسیت ها پرداخته شد .

در هریک از روشهای جداسازی لکوسیت های PMN و MN نقص هایی وجود دارد که از جمله می توان از آلوده بودن گلبول های سفید به گلبولهای قرمز و عدم جداسازی مطلوب لکوسیت های PMN از MN با خلوص و تعداد زیاد اشاره کرد (۷-٦). بنابراین برای جداسازی تعداد زیادی از سلول های PMN با درصد خلوص و حیات ، زیاد در این بررسی دو روش همراه با دکستران و بدون استفاده از دکستران برای اولین بار راه اندازی شدند.

روش کار:

تعداد ۱۰۰نمونه خون محیطی به میزان ۱۰-۵ میلی لیتر با ماده ضد انعقاد EDTA از افراد سالم (۲۰ نمونه) ودهندگان (۲۰ نمونه) و گیرندگان پیوند مغز استخوان (٦۰ نمونه) بطور استریل تهیه و در راه اندازی روش هایی که در زیر می آید بکار گرفته شدند . میانگین تعداد لکوسیت ها در افراد سالم، دهندگان و گیرندگان پیوند مغز استخوان به ترتیب ۵×۱۰^{۳} ، ٦×۱۰^{۳}-۵ و ۲×۱۰^{۳}-۰ در میلیمتر مکعب بود.

الف- روش استاندارد

در این روش نمونه های خون محیطی با نسبت ۱:۲ بافیکول (Polymorphoprep, Lymphoprep) تهیه شده از شرکت نیکومد (Nycomed) هلند به آرامی مخلوط شدند و سپس در دور g ۵۰۰ بمدت ۳۰-۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند (۹-۷).

ب- روش همراه با دکستران

در این روش درصدهای ۵-۱۰ دکستران T70 (با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ دالتون ، سیگما) به جای T500 (با

[1]- Mononuclear leukocytes (MNs)
[2]- Polymorphonudear leukocytes (PMNs)

www.SID.ir

Archive of SID

وزن مولکولی ۵۰۰۰۰۰ دالتون) با نسبت ۲:۱ به نمونه های خون غیر منعقد شده به آرامی اضافه شده و بمدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون گردیدند (۱۰) . پس از جمع آوری مایع رویی ، مایع فوق با هم حجمش از فیکول به آرامی مخلوط و در g ۸۰۰ بمدت ۳۰-۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند .سپس گلبول های قرمز مخلوط با گلبول های سفید با غلظت ۰/۸۴٪ از کلرید آمونیوم (NH_4Cl) در بافر نمکی فسفات سه بار و هر بار بمدت ۵ دقیقه انکوباسیون و سپس در g ۱۵۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند

ج- روش بدون دکستران

در این روش خونهای تهیه شده با نسبت ۴:۱ با آمونیوم کلرید سرد تهیه شده در PBS (PH:7.5) به خوبی مخلوط و پس از ۱۰-۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق در g ۱۵۰۰ بمدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند . این عمل تا حذف گلبول های قرمز ۴-۳ بار تکرار شد . نهایتا" رسوب گلبولهای سفید با نسبت ۱:۱ فیکول به آرامی مخلوط و در g ۸۰۰ بمدت ۲۳ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند .همچنین برای بررسی مورفولوژی و خلوص هر یک از گلبولهای سفید از روشهای رنگ آمیزی گیمسا ۲۰ دقیقه، رایت ۱۵-۲۰ دقیقه و روش جدید سافرانین بمدت ۳۰-۲۰ ثانیه استفاده گردید . برای تایید حیات پذیری سلول های MN و PMN مقداری از هر یک از سلولها در PBS تهیه شد و با نسبت ۱:۱ با رنگ بروموفنل بلو روی لام مخلوط گردید و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند .

نتایج :

در روش استاندارد که از فیکول استفاده شده است ، باند لکوسیت ها حاوی PMNs وMNs و مایع فیکول در بالا قرار می گیرد . باند فوق علاوه بر مخلوط بودن لکوسیت ها با یکدیگر به میزان ۳۰-۲۰٪ با گلبولهای قرمز نیز آلوده می باشد . در حالیکه از Polymorphoprep (که دانسیته بالاتری نسبت به فیکول دارد) استفاده شود گلبولهای قرمز رسوب کرده و دو باند لکوسیت که بترتیب از پایین به بالا لوله آزمایش باند اول حاوی PMN و باند دوم حاوی MN می باشد ایجاد می گردند. در روش استاندارد زمانیکه از Lymphoprep استفاده می شد درصد خلوص هر یک از لکوستیها ۵۰ درصد و درصد حیات آنها ۹۸٪ می باشد . زمانیکه از Polymorphoprep استفاده شد درصد خلوص MN و PMN هریک ۸۵-۸۰ درصد بوده و درصد حیات همان ۹۸٪ گزارش شد .

در روش دوم یا روش همراه با دکستران از میان درصدهای گوناگون دکستران T70 تیمار با غلظت ۷-۶٪ بمدت ۴۰ دقیقه توانست گلبولهای سفید بیشتری را رسوب دهد. بعلاوه جداسازی سلولهای PMN و MN از رسوب فوق با فیکول بخوبی صورت گرفت و حذف گلبولهای قرمز از هریک از گلبولهای سفید PMN و MN با موفقیت انجام شد . درصد خلوص سلولهای PMN ۹۹-۹۸٪ و درصد حیات گلبولهای سفید PMN و MN ۹۸٪ تایید گردید.

در روش سوم یا روش بدون دکستران سه بار شستشو با آمونیوم کلرید سرد بمدت ۵ دقیقه مورد تائید قرار گرفت و گلبولهای قرمز بطور کامل حذف شده و گلبولهای PMN از MN بخوبی بافیکول جدا شدند . درصد خلوص و درصد حیات سلولهای PMN و MN بترتیب ۹۹-۹۸٪ و ۹۸٪ تایید شدند . نتایج مقایسه سه روش فوق در جدول شماره (۱) آورده شده است .

از میان روش های رنگ آمیزی خون شناسی روش سافرانین بدلیل فیکساسون ساده سلولها با حرارت شعله و رنگ آمیز ی سریع وارزان و دقیق با حفظ مورفولوژی صحیح سلول ها و هسته های آنها مورد تایید قرار گرفت. تصویر ۱ سلول های چند هسته ای خون محیطی PMN رنگ آمیزی شده با سافرانین را نشان می دهد.

www.SID.ir

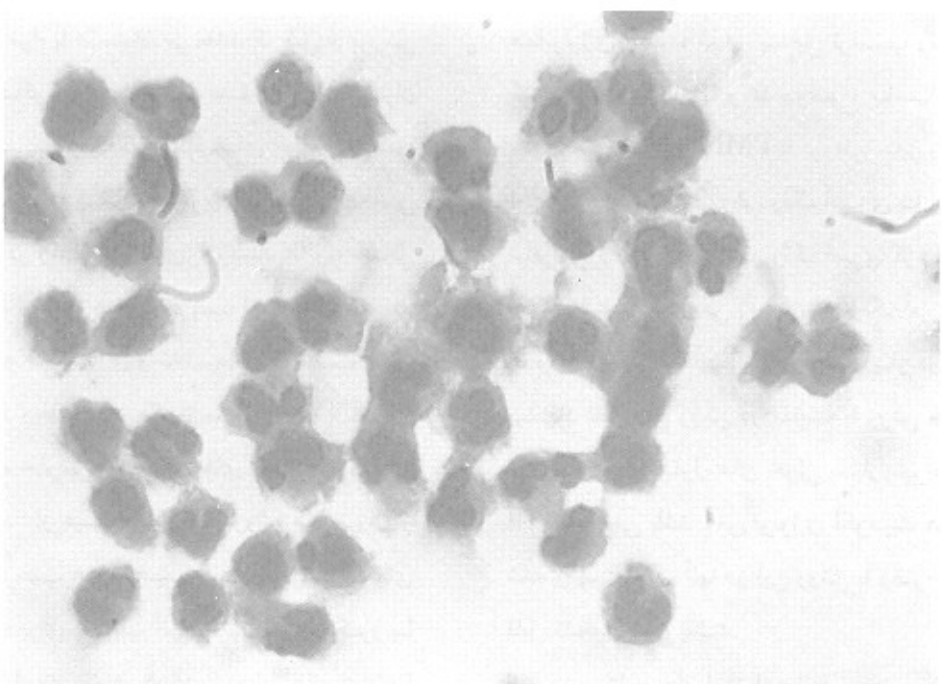
Archive of SID

جدول ۱) میزان جداسازی لکوسیت های تک هسته ای و چند هسته ای و حیات آنها (درصد) به تفکیک روش های جداسازی

	لکوسیت های چند هسته ای	لکوسیت های تک هسته ای	حیات لکوسیت های تک هسته ای و چند هسته ای
استاندارد	۸۰-۸۵*	۸۰	۹۸
همراه با دکستران	۹۸-۹۹	۹۸	۹۸
بدون دکستران	۹۸-۹۹	۹۹۸	۹۸

* اعداد به درصد می باشند.

تصویر ۱ : سلول های PMN جدا شده از خون محیطی با روش رنگ آمیزی سافرانین



بحث :

ویروس سیتومگال انسانی از عوامل مهم بیماریزا در افراد پیوندی خصوصا" دریافت کنندگان مغز استخوان می باشد . بنابراین شناسایی شاخص های پروتئینی و ژنتیکی این ویروس در طی عفونت فعال و خفته از راههای مبارزه با بیماری HCMV می باشد . یکی از اولین ابزار موثر در تشخیص عفونتهای HCMV استفاده از سلول های تک هسته ای و چند هسته ای MN و PMN می باشند (۱). بدلیل کاهش تعداد سلول های فوق در بیماران پیوندی خالص سازی و افزایش تعداد سلول های فوق در واحد حجم از خون محیطی به منظور تشخیص دقیق عفونت

www.SID.ir

Archive of SID

HCMV امری ضروری می باشد (۲) . برای انجام این عمل روشهای استانداردی وجود دارند که هر یک دارای نقص بوده و به اصلاح روش های جدا سازی لکوسیت ها از خون محیطی نیاز می باشد. در روش های استاندارد مرسوم در آزمایشگاههای تشخیص وتحقیقاتی باند حاصل مخلوطی از سلولهای MN و PMN بوده و حتی استفاده از Polymorphoprep بجای فیکول نیز نمی تواند دو باند کاملا" مجزا با خلوص بالا از سلول های فوق تهیه کند (۷-٦) . بنابراین با توجه به نیاز به باندهای با خلوص زیاد در بررسی عفونت های HCMV در بیماران پیوند مغز استخوان به جایگزینی روش های جدید همت گمارده شد .یکی از روش های پیشنهاد شده در این تحقیق روش همراه با دکستران می باشد که پس از بررسی درصدهای گوناگون دکستران ، درصد ۷-٦٪ دکستران T70 برای ترسیب کلیه لکوسیت های خون محیطی مناسبتر تشخیص داده شد . از برتریهای این روش می توان از تسریع در زمان جداسازی لکوسیت ها وبه حداقل رساندن تعداد لکوسیت های تخریب شده ، کاهش در هزینه پروسه جداسازی و تخلیص لکوسیت ها ، جداسازی تعداد زیادی از هریک از سلول های PMN و MN و بالاخره خلوص بالا سلول های جدا شده PMN و MN نام برد . از عیب های این روش می توان از آلودگی باند لکوسیت های ترسیب شده با گلبول های قرمز یاد کرد که برای تخریب آنها به شستشوی مکرر با آمونیوم کلرید نیاز می باشد. در این روش دکستران با افزایش دانسیته لکوسیت ها را از گلبولهای قرمز جدا کرده و آنها را ترسیب می دهد.

همچنین با بررسی روش های دیگر از جمله روشی که در کیت های تشخیص آنتی ژنهای HCMV در خون (Antigenemia) بکار برده می شود؛ مشاهده گردید که دور بالای سانتریفیوژ نیز می تواند در ترسیب لکوسیت ها موثر باشد . در این تحقیق با بهینه سازی روش مورد استفاده در کیت Antigenemia روش بدون دکستران ارزیابی شد . در این روش با مخلوط کردن نمونه خون محیطی با آمونیوم کلرید و سانتریفیوژ آن در دور بالا علاوه بر ترسیب لکوسیت ها ، گلبول های قرمز آلوده کننده نیز کاملا" از بین رفتند . سپس رسوب گلبول های سفید به آسانی با فیکول به باند سلول های MN و رسوب سلول های PMN تفکیک شد . این روش از تمام برتریهای یاد شده در مورد روش همراه با دکستران برخوردار بوده و همچنین در مقایسه با روش همراه با دکستران نیز سریعتر ، ارزانتر و با همان دقت قادر به جداسازی و تخلیص لکوسیت های PMN و MN از یکدیگر می باشد .

در مورد تایید خلوص سلول های بدست آمده از هریک از روش های طراحی شده از روشهای رنگ آمیزی هماتولوژی استفاده شد . بدلیل ترسیب رنگ رایت و گیمسا بر روی سلولها و عدم وضوح مناسب هسته های سلول های MN و PMN به بررسی سایر روشهای رنگ آمیزی پرداخته شد . روش رنگ آمیزی با رنگ حیاتی سافرانین (که این رنگ در رنگ آمیزی گرم در آزمایشگاه باکتری شناسی بکار می رود) برای رنگ آمیزی لکوسیت ها و تایید خلوص آنها برای اولین بار در این پروژه پیشنهاد شد . این روش در مقایسه با روش های مرسوم در رنگ آمیزی سلول های خونی بسیار سریعتر و آسانتر قابل انجام می باشد . مورفولوژی لکوسیت های تخلیص شده و هسته های آنها در این روش با وضوح بسیار بالا قابل تشخیص می باشند.

از بررسی نتایج حاصل از این تحقیق چنین بر میآید که روش های طراحی شده همراه با دکستران و بدون استفاده از دکستران در مقایسه با روش استاندارد ، سلول های PMN و MN را سریعتر ، ارزانتر و دقیقتر با خلوص و درصد حیات بسیار مناسب از خون محیطی جدا می نمایند.

بنابراین پیشنهاد می شود روشهای فوق با توجه به امکانات آزمایشگاههای تحقیقاتی و طبی انتخاب شده و در تشخیص عفونت های فعال و خفته HCMV در بیماران پیوند مغز استخوان بکار گرفته شوند. البته با ادامه

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات اخیر می توان توانایی های روش های راه اندازی شده را در تشخیص عفونت سایر ویروس ها و میکروبها در سایر بیماران پیوندی و بیماری های دیگر مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدرانی:

از مسئولین محترم دانشگاه تربیت مدرس که اعتبار مالی لازم را در اختیار قرار داده اند کمال تشکر را داریم. همچنین از کلیه همکاران شاغل در مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی دکتر البرزی که در طی این تحقیق مرا یاری نموده اند تشکر می نمایم .

REFERENCES:

1- Boeokh M. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes of the allogenic marrow transplantation. Blood 1992; 80:1358-64.

2-Boivin G, Handfield J, Toma E, et al. Comparative evaluation of the CMV DNA load in PMN leukocytes and plasma of HIV-infected subjects. J Infect Dis 1998; 177:355-60.

3-Modarres SH, Nassir Oskoii N. A survey of CMV infection in children and child bearing women in Iran. IJMS 1994; 19:163-6.

4 -Schafor P, Tenschert W, Cremaschi L , et al. Utility of major leukocyte subpopulations for monitoring CMV infections in renal transplant recipients by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 1008-14.

5- Nolte FS, Emmens RK, Thurmond CP. Early detection of HCMV uremia in bone marrow transplant recipients by DNA amplification. J Clin Virol 1995; 24 : 1263-66.

6- Kouch F, Gressier B, Luyckx M, et al. A simple method for isolating human and rabbit PMN neutrophils. Biol Pharm Bull. 2000; 23: 1382-3.

7- Reinat F, Ballesteros F, Galmes M, et al. Efficiency of the extraction method with saline dextran in the PP65 antigenemia assays against human CMV. Enferm Infec Microbiol Clin 2000; 18: 389-91.

8 - Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. J Immunol Methods 1989; 121: 105-13.

9- Kouch F, Levert H, Gressier B , et al. Reduced NH4Cl hemolysis time enhances the number of isolated functional rabbit PMN neutrophils. APMIS 2000; 108: 417-21.

10- Cabanis A, Gressier B, Lebegue, et al . A rapid density gradient technique for separating PMN granulocytes. APMIS 1994; 102: 119-21.

www.SID.ir