خون
فصلنامه پژوهشی
بهار ۸۴ دوره ۲ شماره ۳

ساخت هِم کنترل برای الکتروفورز استات سلولز

دکتر لادن حسینی گوهری [۱]، دکتر عیسی نورمحمدی [۲]، دکتر زهره عطارچی [۳]

چکیده

سابقه و هدف

جهت پیشگیری از بروز خطا در تعیین هموگلوبینوپاتی‌ها به‌روش الکتروفورز بر روی استات سلولز، به‌کاربردن نمونه خون کنترلی حاوی هموگلوبین‌های F، A، S و یا C در کنار نمونه‌های بیماران الزامی است. زیرا عدم استفاده از هم کنترل موجب تفسیرهای نادرست می‌گردد که بیانگر ضعف در سیستم کنترل کیفی آزمایشگاه است. هدف از این طرح تحقیقاتی ساخت هِم کنترل برای الکتروفورز استات سلولز بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده تجربی (exprimental) و روش نمونه‌گیری انتخابی بود. ابتدا از بین نمونه های خون بیماران، آنهایی‌که دارای هموگلوبین غیرطبیعی بودند انتخاب وپس از لیز گلبول‌های قرمز وسانتریفوژهمولیزیت بادور ۲۵۰۰۰ دردقیقه ، لایه رویی، حاوی همولیزیت شفاف بامحلول درابکین طوری رقیق گردید که غلظت هموگلوبین به ۲۰ تا۳۰ گرم در لیتر رسید وهموگلوبین به سیانومت هموگلوبین تبدیل گردید . آنگاه پس از افزودن ساکاروز ومواد محافظ، هم کنترل ازصافی میلی پور(۰/۴۵µm) عبور داده شد . سپس در ویال‌های کوچک تقسیم ولیوفیلیزه گردید. محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

یافته‌ها

دراین تحقیق سه نمونه هم کنترل تهیه گردید . نمونه شماره یک حاوی هموگلوبین‌های D,F,A یا G، نمونه شماره دوحاوی هموگلوبین‌های S,A ونمونه شماره سه حاوی هموگلوبین‌های F,A بود. مقدارسیانور پتاسیم به‌کاررفته ۱۰ مرتبه کمتر از سایر روش‌های ساخت بود. هم کنترل تابیش از شش ماه پایداری داشت و انواع هموگلوبین به وضوح از یکدیگر جدا می‌شدند. محاسبه ضَریب پراکندگی (CV) و انحراف معیار (SD) نشان داد که روش ساخت از قابلیت تکرارپذیری خوبی برخوردار است.

نتیجه گیری

بنابراین روش ساخت پیشنهادی که براساس تجربه علمی وعملی انجام شده و در این طرح انتخاب گردیده ، بامقایسه باسایر روش‌ها در حالی‌که از پایداری وقابلیت تکرارپذیری خوبی برخوردار است دارای مراحل ساخت کمتری است، مقرون به صرفه است و به‌علت مصرف کم سیانور پتاسیم دارای ایمنی بیشتری برای کارکنان آزمایشگاهی می باشد .

کلمات کلیدی: هموگلوبین ، الکتروفورز، استات سلولز، هموگلوبینوپاتی

۱- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی- دانشیار دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲- PhD بیوشیمی تغذیه- دانشیار دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- پزشک عمومی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای آموزشی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

روش الکتروفورز هموگلوبین در pH قلیایی بر روی استات سلولز جهت افتراق انواع هموگلوبینوپاتی‌ها از یکدیگر از اهمیت خاصی برخوردار است و در این روش نیاز به الکتروفورز هم‌زمان هِم کنترل در کنار الکتروفورز نمونه‌های بیماران می‌باشد، زیرا عدم استفاده از هِم کنترل موجب تفسیر نادرست و نهایتاً منجر به تشخیص‌های غلط می‌گردد که بیانگر ضعف در سیستم کنترل کیفی آزمایشگاهی است (۲، ۱).

باتوجه به این‌که هِم کنترل‌های تجارتی که با هزینه‌های بالا در حجم‌های اندک وارد کشور می‌گردند، نمی‌توانند جوابگوی نیاز آزمایشگاه‌های کل کشور باشند، بر آن شدیم طی تحقیق ارایه شده با همکاری سازمان انتقال خون و دانشگاه علوم پزشکی ایران این هِم کنترل تهیه گردد، تا بتوان در آینده با تولید انبوه در حد نیاز آزمایشگاه‌های کل کشور، مشکل کمبود هِم کنترل را برطرف ساخت.

در این طرح جمعاً سه نمونه هِم کنترل غیرطبیعی تهیه و در صورت مطلوب بودن در ویال‌های کوچک تقسیم و لیوفیلیزه گردید و نتایج هم‌زمان در دانشگاه علوم پزشکی ایران و سازمان انتقال خون مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌تدریج طبق تجربیات مجری طرح، روش ساخت هِم کنترل بهینه گردید. روش فوق با مقایسه روش‌های ساخت هِم کنترل توسط سایر پژوهشگران ساده‌تر است و به‌علت مصرف کم سیانور جهت کارکنان، از ایمنی بیشتری برخوردار است .

مواد و روش‌ها

مطالعهٔ انجام شده از نوع تجربی است. ازبین نمونه‌های خون بیماران، نمونه‌هایی که حاوی هموگلوبین غیرطبیعی بودند انتخاب گردید.

روش تهیه هِم کنترل

ابتدا خون تام حاوی ماده ضد انعقاد EDTA را بادور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ نموده ، پلاسما را دورریخته و گلبول‌های قرمز راسه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ نمودیم، سپس گلبول‌های قرمز با هم حجم خود، محلول لایز (حاوی EDTA باغلظت ۰/۱ گرم درصد وسیانور پتاسیم باغلظت۰/۰۱ گرم درصد) لیز گردیدند. سپس با دور ۲۵۰۰۰ در دقیقه در حرارت ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه محتویات لوله سانتریفوژ شد، محلول رویی قرمز و شفاف با محلول حاوی فری سیانور پتاسیم ۰/۰۲ گرم درصد و سیانور پتاسیم ۰/۰۲ گرم درصد طوری رقیق گردید که غلظت هموگلوبین به ۲۰ تا۳۰ گرم در لیتر رسید. (اگرpH بین ۷/۲ تا ۷/۸ باشد نیاز به تنظیم آن نمی‌باشد). پس از افزودن ساکاروز وترکیبات محافظ و عبور گلبول‌های قرمز لیزشده از صافی میلی پور (۰/۴۵µm)، همولیز شفاف را در ویال‌های کوچک تقسیم و لیوفیلیزه نمودیم، سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و به مدت بیش از۶ ماه پایداری و قابلیت تکرارپذیری آن (با محاسبه انحراف معیار[1] و ضریب پراکندگی[2]) مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق که در گروه روش تحقیق تجربی قرار می‌گیرد، ۳ نمونه هِم کنترل غیرطبیعی تهیه گردید. نمونه شماره یک حاوی هموگلوبین‌های D,F,A و یا G، نمونه شماره دو حاوی هموگلوبین‌های A,S و نمونه شماره سه حاوی هموگلوبین‌های F,A می‌باشد.

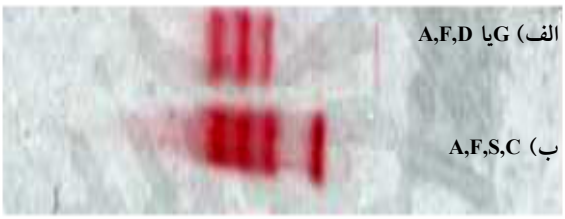
یافته‌ها

مقایسه حرکت الکتروفورتیک نمونه هِم کنترل شماره یک با حرکت الکتروفورتیک هِم کنترل تجارتی

به‌طوری‌که درشکل۱ مشاهده می‌گردد هِم‌کنترل حاوی هموگلوبین‌های G یا A,F,D ازنظرحرکت الکتروفورتیک هم‌تراز با هِم کنترل تجارتی (ساخت کارخانه هلنا) حاوی هموگلوبین‌های A,F,S,C می‌باشد. لازم به‌ذکر است که HbD یاHbG در الکتروفورز استات سلولز با هموگلوبین S حرکت می‌کند.

1- Standard Deviation
2- Coefficient of Variation

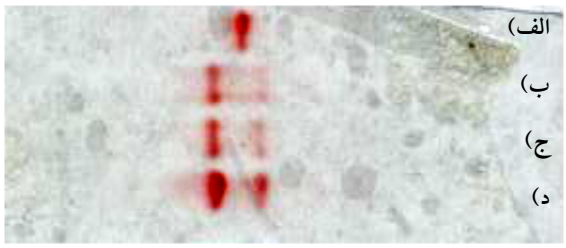
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱:الف- نمونه هم کنترل شماره یک (A,F,DیاG).
ب- هم کنترل هلنا (A,F,S,C)

مقایسه حرکت الکتروفورتیک نمونه هم کنترل شماره دو با حرکت الکتروفورتیک نمونه‌های بیماران

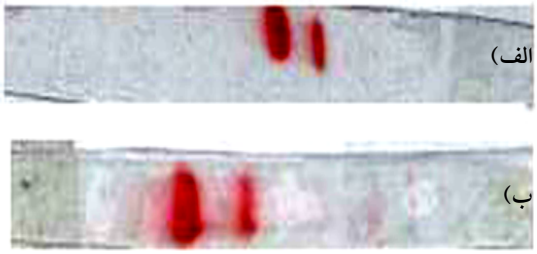
ابتدا گلبول‌های قرمز نمونه‌های بیماران را لیز نموده (یک قسمت نمونه خون تام+ ۳ قسمت محلول لایز) پس از ۵ دقیقه نمونه‌های بیمار سانتریفوژ کرده و محلول قرمز شفاف رویی را جدا والکتروفورز نمودیم. به‌طوری که در شکل۲ ملاحظه می‌گردد، حرکت الکتروفورتیک نمونه هم کنترل شماره دو(A,S) با حرکت الکتروفورتیک نمونه‌های بیماران حاوی هموگلوبین های S و A یکسان می باشد.



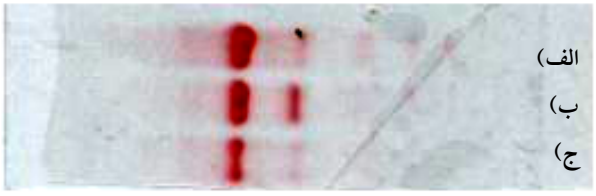
شکل ۲: الف- نمونه بیمار (HbF)
ب- S و HbA.
ج- نمونه بیمار(A,S)،
د- نمونه هم کنترل شماره دو (A,S)

ارزیابی پایداری نمونه هم کنترل شماره دو (A,S)

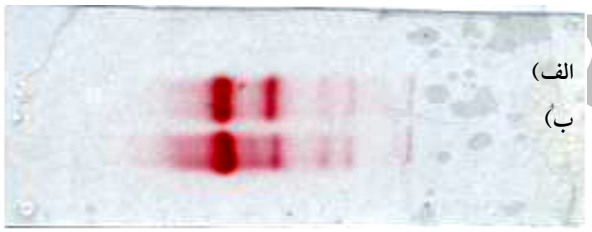
باتوجه به حجم کافی نمونه هم کنترل شماره دو، بررسی پایداری روی نمونه هم کنترل شماره دو انجام گرفت. مطابق شکل‌های ۳، ۴ و۵ نمونه فوق تامدت بیش از۷ ماه به‌صورت لیوفیلیزه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد پایدار می‌باشد. این هم کنترل پس از ذوب شدن به‌مدت ۲ هفته درحرارت۴درجه سانتی‌گراد پایدار می‌ماند(شکل۳).



شکل۳ : الف- نمونه هم کنترل شماره دو (A,S) در روز ساخت
ب- نمونه هم کنترل شماره دو (A,S)۱۰ روز پس از ذوب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد



شکل ۴: الف- نمونه بیمار ب- نمونه هم کنترل شماره دو (A,S)
تاریخ ذوب ۳ ماه پس از ساخت ج- نمونه بیمار



شکل ۵: الف- نمونه هم کنترل شماره دو(A,S) تاریخ ذوب ۷ ماه
پس از ساخت ب- نمونه بیمار(A,S)

ارزیابی پایداری نمونه هم کنترل شماره سه (A,F)

با توجه به حجم اندک هم کنترل، پایداری نمونه شماره سه ۷ ماه پس ازساخت مورد بررسی قرار گرفت (شکل۶).

شکل ۶: الف- نمونه بیمار (A,S) ب- نمونه هم کنترل شماره سه
(A,F) تاریخ ذوب ۷ ماه پس از ساخت

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی قابلیت تکرار پذیری

در مورد هموگلوبینوپاتی‌ها تعیین درصد باندهای غیرطبیعی جهت تشخیص اهمیت دارد. بنابراین به مدت ۴ ماه درصد HbS و HbA مربوط به هِم کنترل نمونه دوم به روش دانسیتومتری تعیین گردید و با استفاده از نرم‌افزارSPSS، میانگین و ضریب انحراف معیار به دست آمد. نتایج، در جدول ۱ آمده است و از قابلیت تکرارپذیری خوبی برخوردار است.

	ماه	میانگین درصد	انحراف معیار درصد	ضریب پراکندگی
HbA	۴	۷۱/۱۳	۱/۷۷	۲/۴۹
HbS	۴	۲۶/۵۳	۱/۴۴	۵/۴۳

جدول ۱ : میزان انحراف معیار و ضریب پراکندگی نمونه هِم کنترل شماره دو در طول ۴ ماه

بحث

یکی از روش‌های مناسب جهت جداسازی انواع هموگلوبینوپاتی‌ها، الکتروفورز در pH قلیایی بر روی استات سلولزمی‌باشد. بااین روش می‌توان هموگلوبین‌های H,E,C,G,D,S هم‌چنین بعضی از انواع هموگلوبین‌های نادر را تشخیص داد (۱).

جداسازی براساس جمع جبری بارمولکول هموگلوبین صورت می‌گیرد، و چون الکتروفورز درpH بالاتر نسبت به نقطه ایزوالکتریک Hb انجام می‌شود، جمع جبری بار آن منفی و از کاتد به طرف آند حرکت می‌کند. هدف از این کار تحقیقی تهیه هِم کنترل غیر طبیعی برای الکتروفورز استات سلولز بود .جهت تهیه هِم کنترل دراین پروژه سعی گردید از ساده‌ترین روش‌ها با توجه به امکانات موجود در آزمایشگاه‌های کشور استفاده گردد؛ لذا مقالات مختلفی مورد مطالعه قرار گرفت (۲،۳،۴). روش پیشنهادی رفرانس که روشی ساده و قابل دسترس به‌نظر می‌رسید، به‌عنوان پایه اصلی انتخاب و با اعمال تغییراتی چون کاهش سیانور پتاسیم مصرفی از ۰/۱۵ گرم درصد به۰/۰۲ گرم درصد وحذف فایکول به‌عنوان رسوب دهنده، روش سهل‌تر و انجام پذیرتر گردید (۲). استفاده از فایکول جهت تهیه همولیزیت موجب کاهش pH می‌گردد که لازم است باسود، مجدداً pH هِم کنترل را تا حدود ۶/۸ تنظیم نمود. هم‌چنین در مرحله استفاده از سیانور پتاسیم باغلظت بالا علاوه بر سمی بودن، موجب قلیایی شدن pH می‌گردد که باید pH را با اسید ۶ مولار به ۶/۸ رسانید (۲). این تنظیم pH علاوه بر وقت گیر بودن موجب رقیق شدن غلظت هِم کنترل وتغییر در ساختمان هموگلوبین‌ها می‌شود و از طرفی استفاده از فایکول در تمام آزمایشگاه‌های کشور میسر نمی‌باشد، درحالی‌که در روش ساخت حاضر تنها به کمک عمل سانتریفوژ با دور بالا، همولیزیت شفاف به‌دست آمد.

لذا نظر به این که فراهم نمودن خون جهت ساخت هِم کنترل به سادگی صورت نمی‌گرفت و حجم نمونه معمولاً بسیار محدود بود، ترجیح داده شد بر پایه تجربیات علمی عملی، در سال‌های متمادی این هِم کنترل تهیه و به تدریج نحوه ساخت هِم کنترل بهینه گردد.

پیشنهادات

به‌طور خلاصه باعنایت به مزایای ذکر شده شامل مصرف کم سیانور پتاسیم، کم هزینه بودن روش و کوتاهی زمان ساخت نسبت به سایر روش‌ها، عدم نیاز به تنظیم pH و پایداری حداقل ۶ الی ۷ ماه و قابلیت تکرارپذیریSD,CV مناسب، این روش جهت تولید انبوه هِم کنترل برای الکتروفورز استات سلولز در pH قلیایی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که هزینه این طرح را متقبل شدند، و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی که وسایل مورد نیاز جهت این تحقیق را در اختیار گذاشتند. با تشکر از خانم بخشایش کارشناس مسؤول مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و خانم‌ها دکتر دادرسان، مستعان، ناگهی، دلفی که در انجام آزمایش‌ها همکاری‌های لازم را مبذول داشته‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Gwendolyn M, Clarke, Trefor N.Giggins. Laboratory Investigation of hemoglobinopathies and Thalassemias :Review and Update .Clinical chemistry 2000;46:1284-1290.
2- Gary J, Proksch, GJ, and Dean P, Bonderman, DP. Preparation of lyophilized abnormal hemoglobin control for cellulose acetate electrophoresis. Am. J Clin Pathol. 1980; 74(1): 64-7.
3- Bonderman, DP, Proksch GJ, Haskins S. A lyophlized hemoglobin control prepared from stroma free hemolysates. Clin-Chem. 1980; 26(2): 305-8.
4- Golias T. Helena Laboratories electrophoresis manual, Texas, Helena Laboratories Inc., 1978.

Archive of SID

www.SID.ir

Preparation of heme control for cellulose acetate electrophoresis

Hosseini Gohari L. [1,2] ***, Noormohammadi E.*** [1] ***, Attarchi Z.*** [2]

[1]*Iranian University of Medical Sciences, Paramedicine College and Cellular and Molecular Research Center*
[2]*Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center*

Abstract

Background and Objectives
To avoid laboratory errors in the detection of hemoglobinopathies, a control sample containing hemoglobin (Hb) A,F,S or C should run with each set of samples.The aim of this project was to prepare a lyophilized heme control for the cellulose acetate electrophoresis.

Materials and Methods
After lysing the red blood cells, the hemolysate was centrifuged at 25000 rpm. The clear red supernatant was diluted with drabkin reagent to 20-30 gr/L and Hb was converted to cyanomethemoglobin. After adding sucrose and preservatives, the hemolysate was passed through milipore filter (0.45 µm) and then aliqouted and lyophilized.

Results
In this project three heme control samples were prepared. The first sample contains Hbs A,F,D or G ,the second one contains Hbs A,S, and the third contains Hb A,F. Although the amount of potassium cyanide used is 10 times less than other methods , the stability is more than 6 months at 4^{o}C; moreover, and the electrophoretic patterns have good resolution and the obtained CV and SD show good reproducibility.

Conclusions
The preparation method in this project is simple, reliable, cost effective and in comparison with other methods has less amount of potassium cyanide; therefore, it is safe for the laboratory staff.

Key words: Hemoglobin , Cellulose acetate, Electrophoresis, Hemoglobinopathy

Correspondence: Hosseini Gohari L., PhD, Iranian University of Medical Sciences, Paramedicine College and Cellular and Molecular Research Center
Tel.: (+9821) 8054355; Fax : (+9821) 8054355
E-mail: *lhgh@iums.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir