مجله بهداشت ایران
سال سوم ، شماره ۲ ، پائیز ۱۳۵۲

روش جدید و سریع الکتروفورز هموگلوبین با استفاده از خون خشك شده روی کاغذ صافی

دکتر شموئیل رهبر *
دکتر حیدر حیدری *
ایران مصطفوی *

خلاصه :

روش ساده و سریعی برای الکتروفورز هموگلوبین به تعداد زیاد در جمعیت‌های مختلف ارائه شده است ، دراین روش نمونه‌ها بصورت یك قطره خون خشك شده در روی کاغذ صافی ضخیم از نوك انگشت گرفته میشود و بسادگی الکتروفورز میگردد . بعلت گرفتن خون از نوك انگشت و عدم احتیاج بجدا کردن گلوبولهای سرخ و تهیه هموليزا این روش بسیار راحت و ضمناً قابل اعتماد است در مدت ۸ ماه گذشته در حدود ۲۰٫۰۰۰ نمونه خون با این طریقه آزمایش شده توانسته‌ایم تعدادی هموگلوبین‌های شناخته شده قبلی مـانند هموگلوبین D پنجاب و هموگلوبین S و هموگلوبین L خلیج فـارس و هموگلوبین‌های جدیدی مثل هموگلوبین ـدانشگاه تهران و هموگلوبین همدان را برای اولین بار گزارش نمائیم .

مقدمه :

جستجو و مطالعه هموگلوبین‌های غیر طبیعی در افراد انسانی یکی از رشته‌های تخصصی موردتوجه محققین درسالهای اخیر بوده است. بخصوص‌مطالعه این هموگلوبین‌ها بشناخت علت بیماریهای همولیتك که فوق‌العاده شایع هستند کمك شایانی مینماید و از لحاظ مطالعه ژنتیك جمعیت و گروههای نژادی مختلف نیز این بررسی حائز اهمیت است.

تا کنون بررسی روی هموگلوبین‌های غیر طبیعی بیشتر بوسیله الکتروفورز در محیطهای مختلف انجام گرفته است و تکنیك‌های اخیر که نوارهای استات‌سلولز بعنوان محیط الکتروفورز بکار رفته است این امکان را فراهم آورده که با روش میکرومتد بتوان تعداد زیادی نمونه هموگلوبین را در زمان کوتاهی الکتروفورز کرد .

* گروه بیولژی‌کاربردی دانشکده پزشکی ـ دانشگاه تهران .

گر چه این روشها آزمایش تعداد زیادی نمونه هموليزا را در مدت کوتاهی میسر میکند ولی نمونه برداری از بیماران بصورت خون مخلوط با ماده ضد انعقادی و جمع‌آوری و ارسال آن بآزمایشگاه در مدت زمان کوتاهی که باعث خراب شدن و غیر استفاده بودن نمونه‌ها نشود و نگهداری آن در یخچال و سپس شستشوی گلبولهای سرخ و همولیز کردن آنها وقت و انرژی زیادی لازم دارد .

اخیراً بـرای تسهیل در نمونه‌برداری دو روش جدید ارائه شده کـه در آنها نمونه‌برداری بوسیله یك قطره خون از نوك انگشت و روی کاغذ صافی انجام میشود . نمونه‌های خشك شده را بآزمایشگاه منتقل نموده و یکی یکی در محلولهای همولیز کننده مانند محلول وینتروپ و غیره وارد و از همولیزای تهیه شده که مخلوط با پروتئینهای سرم میباشد الکتروفورز بعمل میآید . (۱) و (۲) .

این دو روش نیز دارای این عیب میباشد که هر نمونهٔ خشك شدهٔ خون روی کاغذ صافی باید دوباره در محلول همولیز کننده قرار گیرد تا همولیز شود البته مقداری پروتئینهای سرم در کار تداخل مینماید که مسلماً از لحاظ صرف وقت و انرژی مطلوب نیست .

روش زیر که در آزمایشگاه ما ابداع شده بسیار آسان و سریع و مطمئن است و در روز ۲۰۰ نمونه خون براحتی بوسیلهٔ دونفر آزمایش میشود و با تمهیدات خاصی سعی میشود که مقدار پروتئین‌های سرم که ممکن است در کار اختلالی ایجاد کند بسیار کم و ناچیز شود . این روش برای نمونه برداری در مناطق دور دست و انتقال به آزمایشگاه بسیار ساده و مناسب میباشد و احتیاج به تهیه همولیزای جداگانه برای هر نمونه ندارد .

روش کار و مواد لازم :

۱ــ نمونه‌برداری : با استفاده از یك قطره خون از نوك انگشت انجام میشود بدین شکل که قبلا نوارهائی از کـاغذ صافی نوع واتمن3MM بشکل (۱) بـریده و در دسترس قرار میدهند .

قسمت باریك نوار کاغذی را روی قطرهٔ خون قرار میدهیم تا بشکل لکه‌ای در انتهای باریك نوار قرارگیرد و نوارهارا برای چند دقیقه تقریباً بطوری عمودی در حالیکه لکه خون در پائین قرار دارد در هوای آزاد میگذاریم تا خشك شود ، دیده میشود کـه گلبول‌هـای سرخ در نوك بریده شده کـاغذ باقی میماند ولـی سرم خون بعلت حرکت کروماتوگرافی به بالاتر کشیده میشود و همین عامل سبب میشود که پروتئین‌های سرم در نوك کاغذ غلظت کمتری داشته باشد و در نوك نوار کاغذی بیشتر گلبولهای سرخ متمرکز شوند .

در انتهای پهن نوار اسم و یا شمارهٔ بیمار نوشته میشود و نوارها پس از خشك شدن در کیسه‌های پلاستیکی تمیز جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل میشود .

۲ــ الکتروفورز: الکتروفورز روی نواراستات سلولزبه‌روش میکرومتدگراهام و گرون‌بام (۳) انجام میشود . تا میونی که برای الکتروفورز بکار میرود بر دو نوع

است ، یکی تامپون تریس[1] که در مخزن قطب مثبت (آند) قرار میگیرد و تامپون دومی و رونال سودیك[2] درقطب منفی (کاتد) میباشد ، نوارهای استات سلولزرا پس ازخط‌کشی و نوشتن اسامی بیماران در مخلوطی از دوتامپون فوق با حجم مساوی خیس مینمائیم و پس از جذب رطوبت اضافی آنها بوسیله کاغذ صافی در دستگاه الکتروفورز قرار داده و جریان الکتریکی را برقرار مینمائیم . محل‌گذاردن نمونه در نقطه‌ای بین وسط نوار و طرف قطب مثبت میباشد . برای گذاردن نمونه‌ها نوك هر نوار کاغذی را که لکهٔ خون در آنجا خشك شده در ظرف کوچك آب مقطر طوری فرو میکنیم که فقط نوك آن کـه بیشتر حاوی گلبولهای سرخ است خیس شود . و بعد رطوبت اضافی آنرا با کاغذ صافی گرفته و همین نوك را که در اثرات آب مقطر گلبولهای سرخ آن همولیز شده است روی نوار استات سلولز قرار میدهیم ، بلافاصله مقداری همولیزا از نوك کاغذ روی نوار استات سلولز قرار میگیرد که برای آزمایش کافی است .

الکتروفورز بمدت یکساعت با ۳۰۰ ولت (دو میلی آمپر برای هر نوار بعرض ۵ سانتیمتر استات سلولز) انجام میشود ، در پایان بعلت رنگی بودن هموگلوبین باندهای هموگلوبین بخوبی دیده میشود و میتوان نوارها را با رنگ پانسو S رنگ‌آمیزی و در محلول پنج درصد اسید استیك شستشو کرد . نمونه‌های مشکوك و یا غیر طبیعی را جدا کرده و از روی اسم آنها میتوان دوباره برای آزمایشهای تکمیلی به بیماران مراجعه کرد.

شکل شماره ۲ نمونه‌ای از آزمایش انجام شده را روی بیمارانی که درگلبول‌های سرخ آنها HbA_HbL, HbA_HbS خلیج فارس و HbA - HbF بوده‌اند نشان میدهد و چنانچه دیده میشود حتی هموگلوبین جنینی که بروشهای معمولی از هموگلوبین بالغین جدا نمیشود با این روش جدا شده است .

نتیجه و بحث :

در شکل ۲ نمونه‌هائی از الکتروفورز هموگلوبین با روش ذکر شده دیده میشود که نشان میدهد دراین روش حتی هموگلوبین جنینی با مقادیر خیلی کم مثلا در نمونهٔ زیر ۱۲٪ از هموگلوبین (آ) بخوبی جدا میشوند . هموگلوبین‌های دیگری که مقدار آنها ۲۵ درصد کل هموگلوبین میباشد مانند هموگلوبین (ال) . خلیج فارس که عیب آنها در زنجیرهٔ آلفا است با این روش بخوبی جدا میشود حتی درد و بیمار ، هموگلوبین لیپور با نسبت ۱۲/۵ درصد نیز بخوبی جدا شده و قابل نشان دادن می‌باشد .

مزیت دیگر این روش این است که بعلت تجمع گلبول‌های سرخ در نوك بریده کاغذ صافی و حرکت کروماتوگرافی پروتئین‌های سرم به‌قسمتهای بالاتر و خشك شدن آنها در موقع همولیز کردن گلبولها ، چون فقط نوك کاغذ خیس میشود مقدار آلودگی همولیزا با پروتئین‌های سرم کم است و ازاین لحاظ ایجاد اشکال نمیکند ، مخصوصاً اینکه باندهای هموگلوبین قرمز رنگ است و حتی بدون رنگ آمیزی نیز تشخیص داده میشود ، امتیاز دیگر این روش آسانی نمونه برداری است ، بخصوص در مناطق دور دست

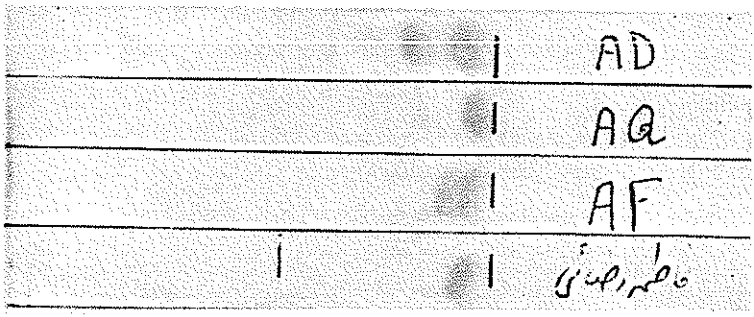
1_ Tris _ E D T A _ Borate PH = 9

2_ PH = 8/6

که بیماران به‌خون دادن از رگ رضایت نمیدهند ولی یك قطره خون از نوك انگشت براحتی قابل گرفتن است . ضمناً اسم نویسی نمونه‌ها خیلی ساده و در بالای نوار کاغذ صافی صورت می‌گیرد و از طرفی حمل و نقل و انتقال بآزمایشگاه و آماده کردن نمونه‌ها برای الکتروفورز نیز براحتی انجام میشود و نمونه‌های مشکوك و غیر طبیعی بدنبال این ممیزی برای آزمایشهای تکمیلی با سرعت قابل تشخیص‌اند ، چنانچه ذکر شد با این روش دراین آزمایشگاه در روزهای کار بطور متوسط ۲۰۰ نمونه خون آزمایش میشود و بعلت وفورهموگلوبین‌های غیرطبیعی درایرانیان هرروز نمونه‌های غیرطبیعی مشاهده‌کرده‌ایم.

در شش ماه گذشته با این روش در حدود ۲۰٫۰۰۰ نمونه خون آزمایش شده و نتایج بسیار جالبی گرفته شده است ، موارد بسیار فراوان بتاتالاسمی بشکل ماژور و می‌نور و بشکل دوبل هتروزیگوت با سایر هموگلوبین‌های غیر طبیعی مانند بیماری سیکل سل و تالاسمی و هموگلوبین (I) و بیماری سیکل سل ، هموگلوبین (D) پنجاب بشکل هتروزیگوت و دوبل هتروزیگوت همراه با بتاتالاسمی ، هموگلوبین ال خلیج فارس(٤) هموگلوبین دانشگاه تهران (٥) وهموگلوبین همدان، دوهموگلوبین اخیر برای اولین‌بار در جهان بوسیلهٔ آزمایشگاه ما شناخته شده است .

شکل شماره یك ــ نوارهای کاغذ صافی 3MM برای نمونه‌برداری :
طرف راست نوار آغشته بخون ، طرف چپ نوار ساده بریده شده



شکل شماره ۲ ــ الکترو فورز انجام شده روی استات سلولز با
روش ذکر شده

REFERENCES

1. Haynes, J.K., and Ingram, V.M., (1973). A simple screening procedure for moglobin, New Eng. J. Med., 88, 44.
2. Garrick, M.D., Dembure, P. and Guthrie, R., (1973). Sickle-cell Anemia and other Hemoglobinopathies, New Eng. J. Med., 288, 1265.
3. Graham, L. and Grunbaum, B.W., (1963). A rapid method for micro-electrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate., Amer. J. Clin. Path., 34, 567.
4. Rahbar, S., Kinderelerer, J.L. and Lehmann, H., (1969). Haemoglobin L, Persian Gulf, 2 (57) Glycine → Arginine, Acta Haematologica, 42, 169.
5. Rahbar, S., Nowzari, G. and Daneshmand, P., (1973). Haemoglobin Daneshgah, Tehran, Nature New Biology, 245, 148.