

**گزارش فاز مطالعاتی**

**دستیابی به دانش فنی و تولید " محلول لایز"**

**پژوهشکده تکنولوژی تولید جهاد دانشگاهی خوزستان**

 **گروه پژوهشی شیمی**

**مجری : سید جعفر سقانژاد**

**چکيده**

برای تعیین پارامترهای خونی از قبیل تعداد گلبول های سفید (WBC)، گلبول های قرمز (RBC) و پلاکت ها به عنوان ذرات معلق عمده در خون، نیاز به شمارش آنها می باشد. در قدیم از صفحات مشبک و محاسبات دستی توسط خوانش و مشاهده تعداد آنها در زیر میکروسکوپ اضافه می شد. امروزه با استفاده از دستگاه های آنالیز خون، می توان تمامی پارامترهای خونی و تعداد این ذرات را اندازه گیری کرد. برای این کار نیاز به حلال های مناسب می باشد که بتوان هر کدام از ذرات به طور جداگانه مورد اندازه گیری قرار داد. برای تعیین گلبول های قرمز با توجه به تعداد زیاد این گلبول ها (حدود 5 میلیون بر میکرولیتر) از محلول های ایزوتونیک (دارای فشار اسمزی یکسان) که حاوی نمک و افزدونی های دیگر هستند استفاده می شود. پس از شمارش گلبول های قرمز، این گلبول ها باید از نمونه حذف شوند تا امکان اندازه گیری دیگر ذرات میسر شود. برای این کار

**کلمات کليدي**: محلول لایز، سورفکتنت های کاتیونی، فشار اسمزی، محلول ایزوتونیک، هموگلوبین، گلبول های سفید (WBC)، پلاکت ها، گلبول های قرمز (RBC)

**فهرست**

[1-1 مقدمه 6](#_Toc158736049)

[1- 2 محلول های شمارش گلبول قرمز (ایزوتون) 6](#_Toc158736050)

[1- 3 دستگاه سل کانتر (شمارشگر سلول های خونی) 7](#_Toc158736051)

[**2- 1 موارد استفاده از سل کانتر (آنالایزر هماتولوژی)** 8](#_Toc158736052)

[2- 2 روش های اندازه گیری و شمارش سلول ها در سل کانتر 8](#_Toc158736053)

[3- 1 **اجزای اصلی سل کانتر** 9](#_Toc158736054)

[3- 1- 1 **اصول شمارش سلول های خونی** 10](#_Toc158736055)

[**3- 1- 2 سیستم نوری جهت اندازه گیری و ثبت حجم اندازه گیری : رقیق سازی** 11](#_Toc158736056)

[3- 1- 3 روش اندازه گیری خون کامل 11](#_Toc158736057)

[3- 1 – 4 روش اندازه گیری خون رقیق شده 11](#_Toc158736058)

[3- 2 محلول ها و مواد مورد نیاز در دستگاه سل کانتر 12](#_Toc158736059)

[2- 3- 3 اندازه گیری هموگلوبین 13](#_Toc158736060)

[3- 4 محلول لایز 13](#_Toc158736061)

[3- 3- 4- 1 بررسی محلول تهیه شده با محلول استاندارد 18](#_Toc158736062)

[4- 3- 4- 2 پایدارکننده های هموگلوبین 21](#_Toc158736063)

[5- 4- 1 مروری بر محلول های تجاری ارائه شده 21](#_Toc158736064)

[6- مراجع: 25](#_Toc158736065)

**فهرست شکل ها**

[**شکل 1**: ساختار گلبول قرمز در محیط های هایپرتونیک، ایزوتونیک و هیپوتونیک 6](#_Toc158736109)

[**شکل 2**: دستگاه سل کانتر 7](#_Toc158736110)

[**شکل 3**: رابطه اندازه گیری با روش متداول و استفاده از محلول ابداعی 18](#_Toc158736111)

[**شکل 4:** تعداد لوکوسیت ها با روش افتراق بر اساس اندازه 19](#_Toc158736112)

[**شکل 5:** عدم امکان افتراق بین گونه های مختلف لوکوسیت 22](#_Toc158736113)

[**شکل 6:** شناسایی دو قله برای گونه های لوکوسیت 22](#_Toc158736114)

[**شکل 7**: ایجاد افتراق برای اندازه گیری انواع لوکوسیت ها در خون 24](#_Toc158736115)

 **فاز مطالعاتی**

# 1-1 مقدمه

محلول های هماتولورژی، برای تعیین پارامترهای خونی بسیار اهمیت دارند. این محلول ها به چند دسته تقسیم می شوند. محلول های تعیین تعداد گلبول های قرمز، محلول های تعیین تعداد گلبول های سفید و پلاکت ها و محلول اندازه گیری هموگلوبین.

# 1- 2 محلول های شمارش گلبول قرمز (ایزوتون)

محلول های تعیین تعداد گلبول های قرمز یا محلول شمارش گلبول قرمز که به محلول های ایزوتون مشهورند، دارای غلظت مشابه از املاح هستند به طوری که پس از قرار گیری گبول قرمز در این محلول ها تغییر اندازه ای را نخواهد داشت و درنتیجه متورم یا چروکیده نمی شود. درنتیجه محلول های ایزوتون باید تنها باعث پراکنده شدن گلبول ها در محلول شده و از لخته شدن آنها جلوگیری کنند. محلول ها از لحاظ ویژگی اسمزی به سه دسته هیپوتونیک، هایپر تونیک و ایزوتونیک تقسیم بندی می شوند (شکل 1).



**شکل 1**: ساختار گلبول قرمز در محیط های هایپرتونیک، ایزوتونیک و هیپوتونیک

پس از تعلیق گلبول ها در محلول، تعداد گلبول ها به روش های مختلفی از جمله کولتر اندازه گیری می شود.

# 1- 3 دستگاه سل کانتر (شمارشگر سلول های خونی)

سل کانتر cell counter از دو واژه cell سلول) و counter شمارش تشکیل شده است. یکی از شاخص های سلامت در انسان، طبیعی بودن تعداد و ابعاد سلول های خونی است. بنابر این، بررسی سلول های خونی می تواند عامل مهمی در تشخیص بیماری ها باشد. در گذشته از روش های دستی جهت شمارش سلول های خونی استفاده می شد، اما به دلیل آنکه این روش ها بسیار وقت گیر و از دقت کمی برخوردار و مستعد خطاهای متعددی است، محققان پس از سال ها تلاش توانستند دستگاه های شمارنده سلول های خونی را عرضه کنند. وظیفه اصلی این دستگاه ها، تهیه گزارش سریع و دقیق به روشی ساده از پارامترهای اصلی خون است (شکل 2).



**شکل 2**: دستگاه سل کانتر

**سل كانتر** يا دستگاه‌هاي شمارنده سلول ، يكي از دستگاه‌ ههاي آزمايشگاهي طبي است كه از گروه آناليزورهاي هماتولوژي مي‌باشد . اين دستگاه توسط **والاس كولتر** در سال 1965 ساخته شده است . كولتر با ابداع روش امپدانس الكتريكي و به‌كارگيري آن در شمارش سلولهاي خوني، نخستين تحليل‌گر هماتولوژي را به آزمايشگاههاي پزشكي عرضه نمود.سل كانترها در آغاز راهشان به صورت دستي بودند كه علاوه بر محدوديت‌هاي بسيار زياد ، كميتهاي بسيار كمي را هم اندازه‌گيري مي‌كردند . انجام آزمونCBC به روش دستي بسيار وقت‌گير، هزينه‌بر، طاقت‌فرسا و در برخي موارد با دقت پايين بود و است .(به‌ويژه در مورد شمارش اريتروسيتها)

# **2- 1 موارد استفاده از سل کانتر (آنالایزر هماتولوژی)**

به طور کلی دستگاه های سل کانتر یکی از پرکاربرد ترین و اصلی ترین تجهیزات آزمایشگاهی است. این دستگاه ها تعداد گلبول های قرمز (RBC)، گلبول های سفید (WBC) و پلاکت ها را اندازه گیری می کنند و قابلیت ارزیابی هموگلوبین، هماتوکریت MCHC، MCH، MCV، مورفولوژی گلبول های قرمز و شمارش افتراقی سلول های سفید را هم دارند. این دستگاه ها امروزه به صورت گسترده ای در جهان مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از این آنالیزرهای هماتولوژی مزایایی چون افزایش دقت و سرعت کار، افزایش صحت نتایج، کاهش خطاهای کاربری و کاهش هزینه ها را در پی دارد.

# **2- 2 روش های اندازه گیری و شمارش سلول ها در سل کانتر**

تحلیلگرهای هماتولوژی در نخستین مرحله تکاملی خود عمدتاً بر پایه پیشرفت هایی که در زمینه الکترونیک و نور حاصل شده بود، طراحی شدند. شناخته شده ترین مثال این مورد به سال ۱۹۵۰ بر میگردد، یعنی زمانی که والاس کولتر، اصل «امپدانس الکتریکی» را در نخستین شمارش گر سلول های خونی بهکار گرفت. کولتر روش جدیدی را جهت شمارش پارتیکل های فلزی موجود در یک سوسپانسیون ابداع کرد و سپس این فن آوری را جهت شمارش سوسپانسیون سلول های خونی به کار برد. این عمل در واقع نقطه عطفی در اتوماسیون (خودکار شدن) آزمون های هماتولوژی به شمار می رود، در نتیجه به تدریج در دستگاههای شمارنده، فنآوریهای دیگری نظیر پراکنش نور، رادیوفرکانس و فلوئورسانس بهکار گرفته شد.

در گذشته سل کانتر ها بر اساس اندازه، سلول ها را شمارش می کردند اما امروزه از روش های جدیدی مانند اسکاتر استفاده می شود. انواع مختلفی از این نوع دستگاه ها وجود دارد که از روش های مختلفی برای اندازه گیری و شمارش سلول ها استفاده می کنند اما تقریبا تمام آنها از یکی از چهار روش معرفی شده استفاده می کنند. امپدانس (روش امپدانس الکتریکی- تغییر هدایت الکتریکی)، اپتیکال (الکترواپتیکال)، سیتوکمیکال و تلفیقی. از بین روش های موجود روش امپدانس به علت مزایای و کارکردهای بسیار بالا بیشتر استفاده می شود. سل کانتر های اپتیکال توسط نور و قوانین حاکم بر آن اندیکس های هماتولوژی را گزارش می کند. سیتوشیمی هم روشی است که به طور انحصاری در یک نوع دستگاه استفاده می شود.

# **3- 1 اجزای اصلی سل کانتر**

بخش هیدرولیک: وظایف سیستم هیدرولیک شامل: برداشت محصول های مورد نیاز دستگاه و Aspirating نمونه خون یا، تخلیه محلول ها یا خون برداشت شده یا Dispensing، رقیق سازی نمونه یا Diluting، مخلوط کردن نمونه و محلول ها یا Mixing و افزایش محلول لیز کننده یا Lysing است.

* بخش پنوماتیک: وظیفه اصلی سیستم پنوماتیک تولید خلاء یا فشار ثابت جهت کنترل دریچه ها و همچنین کنترل حرکت محلول ها و نمونه در داخل سیستم هیدولیک است
* بخش الکترونیک: این سیستم توسط یک ریز پردازنده (میکروپروسسور) کنترل می شود و وظایف زیر را به عهده دارد:
* اندازه گیری و پردازش سیگنال های حاصل از تغییر امپدانس
* محاسبه و انتقال نتایج به چاپگر یا هر خروجی دلخواه در سیستم
* ترسیم گراف پارامترهای اصلی
* کنترل زمان اندازه گیری و توالی تست ها
* اجرای برنامه Q.C و کالیبراسیون سیستم
* ذخیره و بازیابی نتایج

# **3- 1- 1 اصول شمارش سلول های خونی**

نمونه رقیق شده مورد اندازه گیری توسط یک فشار منفی به داخل روزنه WBC و RBC مکش می شود. در سیستم اندازه گیری، یک لوله شیشه ای دقیق که لوله اندازه گیری نامیده می شود، وجود دارد که وظیفه آن کنترل ثابت بودن حجم نمونه مورد اندازه گیری در طول یک سیکل شمارش است. در بالا و پایین این لوله اندازه گیری دو سنسور نوری قرار داده شده که فاصله بین این دو سنسور، حجم نمونه مورد اندازه گیری را مشخص می کند و از آنجایی که این فاصله همیشه ثابت است، حجم های اندازه گیری شده در دیسک های مختلف شمارش نیز ثابت است.

سلول های سفید خون (WBC)، سلول های قرمز خون (RBC) و پلاکت ها به روش امپدانس الکتریکی شمارش شده و سایز بندی می شوند. این روش بر اساس اندازه گیری تغییرات در مقاومت الکتریکی بین دو الکترود مثبت و منفی پایه گذاری شده است. شایان ذکر است که تغییرات در مقاومت الکتریکی بین دو الکترود، ناشی از عبور ذرات و سلول های خونی با اندازه های مختلف از روزنه بین الکترودهای مثبت و منفی است. الکترودها در زیر سطح محلول در دو طرف یک روزنه که Aperture نامیده می شود، قرار داده شده اند و تشکیل یک مسیر الکتریکی را می دهند.

سلول های خونی دارای اندازه های مختلفی است. بر اساس این اندازه ها، هر سلول که از درون روزنه عبور کند موجب افزایش امپدانس الکتریکی بین دو الکترود می شود. بدین ترتیب می توان امپدانس های ایجاد شده را به سلول های مشخص نسبت داد.

دستگاه سل کانتر سلول های خونی را به تنهایی شمارش و بر اساس اندازه دسته بندی می کند. حجم مشخصی از نمونه رقیق شده آماده قرائت از روزنه ۷۰ میکرومتری RBC و نیز از روزنه ۱۰۰ میکرومتری WBC عبور کرده و شمارش انجام می گیرد. همچنین یک سیستم نوری برای قرائت هموگلوبین در دستگاه سل کانتر طراحی شده است. این سیستم دارای دو سنسور نوری است. وقتی محلول آماده شمارش از سنسور بالایی عبور می کند، سیکل شمارش آغاز می شود و با عبور از مقابل سنسور پایینی این سیکل خاتمه می یابد. لذا در کلیه سیکل های شمارش حجم ثابت و مشخصی از محلول آماده شمارش می شود. بنابراین اگر یک حباب و یا یک لخته خون در محلول آماده وجود داشته باشد، سیستم سریعا اخطار می دهد و اپراتور متوجه خطا در شمارش می شود.

# **3- 1- 2 سیستم نوری جهت اندازه گیری و ثبت حجم اندازه گیری : رقیق سازی**

در خون کامل سلول ها بسیار نزدیک به یکدیگر هستند ، بنابراین برای جداسازی و روان سازی آن باید از یک محلول رقیق ساز ایزوتونیک استفاده کنیم. در سل کانترهایی که به روش امپدانس الکتریکی کار می کنند ، به دو روش می توان سیکل اندازه گیری را آغاز نمود: روش اندازه گیری خون کامل و روش اندازه گیری خون رقیق شده.

# 3- 1- 3 روش اندازه گیری خون کامل

در این روش 13 میکرولیتر از خون کامل توسط دستگاه مکش می شود ، سپس با 5/3 میلی لیتر محلول ایزوتون رقیق می گردد (269 : 1 نسبت رقیق سازی اولیه). سپس این محلول رقیق شده اولیه به دو قسمت تقسیم می گردد:
الف) 6/15 میکرولیتر از محلول رقیق شده اولیه مکش می شود و با 6/2 میلی لیتر محلول ایزوتون مجددا رقیق می گردد (رقیق سازی ثانویه 44833 : 1). این محلول برای شمارش سلول های قرمز خون (RBC) و پلاکت ها (PLT) مورد استفاده قرار می گیرد .
ب) بقیه محلول رقیق شده با نیم میلی لیتر محلول لایز ترکیب می شود (نسبت رقیق سازی ثانویه 308 : 1). این محلول برای شمارش سلول های سفید (WBC) و اندازه گیری غلظت HGB مورد استفاده قرار می گیرد.

# 3- 1 – 4 روش اندازه گیری خون رقیق شده

در این روش اپراتور ابتدا 20 میکرولیتر از خون کامل را با 6/1 میلی لیتر محلول ایزوتون رقیق می سازد (نسبت رقیق سازی خارجی 80 : 1) ، سپس 7/0 میلی لیتر از محلول رقیق شده خارجی توسط دستگاه مکش می شود و مجددا با 5/2 میلی لیتر محلول ایزوتون رقیق می گردد (نسبت رقیق سازی اولیه در داخل دستگاه 366 : 1) ، سپس این محلول رقیق شده اولیه به دو قسمت زیر تقسیم می گردد:

الف) 8/24 میکرولیتر از محلول رقیق شده اولیه مکش شده و مجددا با 3 میلی لیتر محلول ایزوتون رقیق
می گردد (نسبت رقیق سازی ثانویه 44274 : 1). این محلول برای شمارش های RBC و PLT مورد استفاده قرار می گیرد.

ب) بقیه محلول رقیق شده اولیه با 36/0 میلی لیتر محلول لایز ترکیب شده و برای شمارش WBC و اندازه گیری غلظت HGB مورد استفاده قرا می گیرد (نسبت رقیق سازی ثانویه 366 : 1).
هنگامی که سلول های خون از روزنه مخصوص شمارش عبور می نمایند ، به طور لحظه ای تغییراتی در امپدانس و الکترود مثبت و منفی دو طرف روزنه ایجاد می شود و چون این تغییر امپدانس ارتباط مستقیمی با اندازه سلول عبور کرده دارد ، می توان امپدانس های ایجاد شده را به نوع سلول ارتباط داد.

# **3- 2 محلول ها و مواد مورد نیاز در دستگاه سل کانتر**

* محلول ایزوتون یا Diluent: برای رقیق کردن خون از یک محلول ایزوتونیک که می تواند محیطی شبیه پلاسمای خون را تأمین نماید ، استفاده می شود . بدین ترتیب که یک رسانای مناسب جهت شمارش سلول های خونی ایجاد می گردد.
* محلول لیز کننده یا Lyse: از این محلول برای از بین بردن غشای سلول های قرمز در کاپیلاری مخصوص شمارش WBC استفاده می شود ، بدین ترتیب تداخل اندازه بین سلول های قرمز و سفید در شمارش آنها از بین می رود . همچنین از جذب نوری مخلوطی که از لایزوهموگلوبین تشکیل گردیده است ، برای اندازه گیری غلظت هموگلوبین استفاده می شود.
* محلول شستشو یا Rinse: محلول شستشو نوعی دترجنت است که برای شستشوی تیوب ها و کاپیلاری ها و مرطوب نگه داشتن آنها پس از هر سیکل اندازه گیری مورد استفاده قرار می گیرد .
* محلول شستشوی آنزیماتیک یا E – Z Cleanser: یک محلول آنزیمی مخصوص است که برای پاک کردن بهتر تیوب ها وکاپیلاری به صورت روزانه مورد استفاده قرار می گیرد (قبل از خاموش کردن دستگاه) و ضرری برای قسمت های پلاستیکی دستگاه ندارد.
* محلول پاک کننده پروب ها یا Probe Cleanser: از این محلول برای پاک کردن و حل کردن لخته خون های به جای مانده در پروب ها و تیوب ها و کاپیلاری دستگاه استفاده می شود و معمولا این محلول باید 15 دقیقه در این مسیرها قرار گیرد تا مؤثر واقع شود.
* کالیبراتور: یک محصول خنوی با پارامترها و مقادیر مشخص و ثابت است که به صورت تجارتی و مطابق با استانداردهای مرجع پزشکی تولید می شود و از آن برای کالیبره کردن دستگاه سل کانتر استفاده می شود.
* کنترل: یک محصول خونی با پارامترها و مقادیر مشخص وثابت است که به صورت تجارتی در سه نوع Low ، Normal و High تولید می شود. خون کنترل باید روزانه برای چک کردن عملکرد دستگاه سل کانتر مورد استفاده قرار گیرد.

# 3- 3 اندازه گیری هموگلوبین

برای اندازه‌گیری هموگلوبین خون ابتدا نمونه خون با محلولی حاوی پتاسیم فری‌سیانید (K۳Fe(CN)۶) و پتاسیم سیانید (KCN) ترکیب می‌شود. در اثر این ترکیب پتاسیم فری‌سیانید آهن موجود در خون را اکسید می‌کند و متهموگلوبین تشکیل می‌شود. سپس پتاسیم سیانید با متهموگلوبین ترکیب می شود و سیانمتهموگلوبین (HiCN) را تشکیل می‌دهد. در طی این فرآیند بیشتر مشتقات هموگلوبین (اکسی هموگلوبین، متهموگلوبین و کربوکسی هموگلوبین) به HiCN تبدیل می‌شوند. سپس این محلول به دست آمده را در اسپکتروفتومتر قرار می‌دهند. HiCN در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر دارای بیشترین جذب است. بنابراین مقدار جذب را در این طول‌موج اندازه‌گیری می‌کنند.

# 3- 4 محلول لایز

برای اندازه گیری تعداد گلبول های سفید و مشخص کردن نوع آنها (لنفوسیت، نوتروفیل و مخلوط بازوفیل، ائوزینوفیل و غیره)، پلاکت­ها و هموگلوبین، در ابتدا باید گلبول های قرمز را از بین برد یا اصطلاحاً هضم نمود که این واژه در انگلیسی لایز نام دارد. درنتیجه محلول لایز، باعث هضم گلبول­های قرمز شده به طوری که با این کار هم می­توان گلبول های سفید و پلاکت ها را اندازه گیری کرد و همچنین می­توان غلظت هموگلوبین را مشخص نمود. این فرایند در اتاقک های مجزایی در دستگاه انجام می شود. به طوری که برای اندازه گیری هموگلوبین، پس از لایز شدن، غلظت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر موجود در دستگاه در طول موج 540 نانومتری اندازه­گیری می­شود.

محلول هایی که در گذشته برای اندازه گیری هموگلوبین استفاده می شد، حاوی مقادیری سیانید بود که به روش دابکین مشهور بوده و در اثر تبدیل هموگلوبین به سیانومت­هموگلوبین اندازه گیری غلظت را انجام می داد. در این روش قدیمی که به علت استفاده از سیانید بسیار از لحاظ زیست محیطی آسیب رسان بود، درنتیجه تلاش برای تهیه محلول های لایز که عاری از سیانید بوده و امکان اندازه گیری نوع گلبول های سفید را نیز داشته باشند انجام شده است.

در بعضی از محلول­ها از یون سیانید در محلول­های آبی قلیایی با pH برابر 9 استفاده شده است. در این معرف ها، فریسیانید وجود ندارد، به جای آن هموگلوبین توسط اکسیژن اتمسفری به حالت فریک اکسید می شود. گونه های فریک هموگلوبین در ادامه به یون های سیانید متصل شده تا تولید یک ماده رنگزا[[1]](#footnote-1) نموده که با اندازه گیری آن، هموگلوبین اندازه گیری می­شود.

در محلول دیگری که در ثبت اختراع به شماره 4286963 آمریکا به ثبت رسیده است، معرف اندازه گیری لوکوسیت ها و هموگلوبین در خون تام است. این معرف حاوی یک نمک آمونیوم نوع چهارم یا فنوکسی آلکانول و یک پلی الکل در یک بافر اسیدی است (pH در محدودده 5-5/3) و همچنین حاوی سیانید نمی باشد. البته در این ثبت اختراع اشاره شده است که فقدان سیانید، نامطلوب است و منجر به ناپایداری رنگ تشکیل شده با هموگلوبین می­شود.

اوشیرو در سال 1982، استفاده از یک معرف حاوی سدیم دوسیل سولفات که معادل سدیم لوریل سولفات (SLS) است، به عنوان یک سورفکتانت آنیونی و تریتون ایکس-100 به عنوان یک سورفکتانت غیریونی در یک بافر خنثی (pH برابر 2/7) را گزارش نمود. گلبول های قرمز توسط SLS لایز می­شوند. حضور تریتون ایکس-100 از رسوب SLS در دمای کمتر از °C 5 جلوگیری می­کند. واکنش ظرف مدت 5 الی 10 دقیقه کامل شده و تولید ماده رنگزای سبزرنگ می کند که دارای بیشینه جذب 539 و 572 نانومتر است.

در سال 1984، یک روش برای تعیین هموگلوبین تام با استفاده از معرف حاوی سورفکتانت غیریونی مانند تریتون ایکس-100 که در NaOH، 1/0 نرمال حل شده گزارش شده است. واکنش در مدت 1 الی 2 دقیقه کامل شده و یک رنگ سبز تشکیل می شود که بیشینه جذب 575 نانومتر و یک شانه در 600 نانومتر دارد. طبق نظر نویسندگان، اگر سورفکتانت غیریونی را با سورفکتانت های کاتیونی یا آنیونی تعویض کنیم، در این روش کارایی ندارد.

با این حال، امروزه سیستم های هماتولوژی خودکار نیازمند روش های سریع با عملکرد کمتر از 30 ثانیه برای کامل شدن واکنش هستند. در این حالت تعیین هموگلوبین، در روش های اخیر که جواب دهی سریع دارد، معرف حاوی سیانید است که در pH بالا و غلظت زیاد سیانید انجام می شود. درنتیجه، این معرف ها بسیار سمی بوده و همچنین ناپایدارند، زیرا سیانید در اثر هیدرولیز بازی تبدیل به فرمآمید و فرمات می شود.

درنتیجه سیانید اضافی باید به معرف اضافه شود تا جبران تخریب در اثر هیدرولیز را نماید [1].

در سال 1993 میلادی، تاکاشی از شرکت الکترونیک پزشکی TOA ژاپن یک معرف برای اندازه گیری لوکوسیت ها و هموگلوبین در خون را در ثبت اختراع آمریکا به شماره ثبت 5242832 ارائه نمود. طبق گفته نویسنده، این محلول عاری از سیانید بوده، قابلیت حفظ هموگلوبین به حالت پایدار را برای مدت زمان طولانی دارد. این معرف حداقل حاوی یک سورفکتانت کاتیونی از نوع نمک چهارتایی آمونیوم با غلظتی که قادر به همولیزکردن اریتروسیت ها در خون بوده و اکسایش هموگلوبین را داشته باشد است. همچنین این محلول حاوی نمک های پیریدینوم که حداقل حاوی یک سورفکتانت کاتیونی، غیریونی یا آموتری بوده و دارای یک پایدارساز هموگلوبین است [2].

در این محلول از حداقل یک **پایدارساز هموگلوبین** استفاده شده است که شامل موارد زیر می باشد.

1) تیرون با غلظت ppm 1/0 تا ppm 1000



2) 8-هیدروکسی کینولین با غلظت ppm 1/0 تا ppm 1000



3) بی پیریدین با غلظت ppm 10 تا ppm 10000



4) 1، 10-فنانترولین و مشتقاتش با غلظت ppm 10 تا ppm 3000



5) ترکیبات فنولی با غلظت ppm 1/0 تا ppm 1000



6) بیس فنول A با غلظت ppm 1/0 تا ppm 1000



7) پیرازول و مشتقاتش با غلظت ppm 1/0 تا ppm 10000



همچنین محلول دارای pH در بازه 3 تا 9 می باشد.

غلظت کلی نمک چهارتایی آمونیوم در بازه 1/0 تا 15 گرم بر لیتر است.

غلظت کلی نمک پیریدینیوم در بازه 1/0 تا 15 گرم بر لیتر است.

غلظت کلی سورفکتانت غیریونی در بازه 1/0 تا 15 گرم بر لیتر است.

غلظت کلی سورفکتانت آمفوتری در بازه 1/0 تا 15 گرم بر لیتر است.

غلظت کلی سورفکتانت کاتیونی در بازه 1/0 تا 15 گرم بر لیتر است.

با ترکیب درصد مشخص از اجزای فوق الذکر، لوکوسیت ها را می توان به دو یا سه بخش تقسیم کرد. لنفوسیت های، مونوسیت ها، ائوزینوفیل ها و بازوفیل ها یا نوتروفیل ها.

# 3- 4- 1 بررسی محلول تهیه شده با محلول استاندارد

برای تایید کارایی محلول، رابطه بین نتایج اندازه گیری تعداد لوکوسیت ها با روش متداول و استفاده از یک دستگاه F-800، که توسط شرکت Toa ساخته شده است. نتایج اندازه گیری تعداد لوکوسیت ها با استفاده از نمونه به صورت زیر است (شکل 3).



**شکل 3**: رابطه اندازه گیری با روش متداول و استفاده از محلول ابداعی

یکی از ویژگی های مهم محلول های لایز، تشخیص ترکیب درصد لوکوسیت ها می باشد که در دستگاه های عادی به سه بخش تقسیم می شود. درصد لنفوسیت ها، درصد مخلوط بازوفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل ها و درصد نوتروفیل ها. در صورتی محلول مناسب است که بتواند ترکیب درصد این ذرات و نوع آنها را مشخص کند. در این ثبت اختراع، نویسنده به ترکیب درصد اشاره نموده است.

در این نمودار، درصد و یا کسر هر نوع لوکوسیت بر اساس اندازه مشخص شده است (شکل 4).



**شکل 4:** تعداد لوکوسیت ها با روش افتراق بر اساس اندازه

محققان معمولا از ترکیب درصد زیر برای ساخت محلول لایز استفاده نموده اند:

|  |  |
| --- | --- |
|   | بازه غلظت |
| ترکیب درصد نمونه 1لوریل تری متیل آمونیوم کلریدلوریل دی متیل آمینو استیک اسید بتائینتیرونبافر فسفاتسدیم کلریدآب مقطر | 1/0 تا 15 گرم1/0 تا 15 گرم1/0 تا 1000 میلی گرمیک 15 تا یک 60 ام مولار1 تا 10 گرمتا یک لیتر |
| ترکیب درصد نمونه 2میریستیل تری اتیل امونیوم برمید پلی اکسی اتیلن نونیل فنیل اترتیرونفسفات بافرسدیم کلرید آب مقطر  | 1/0 تا 12 گرم1/0 تا 12 گرم1/0 تا 1000 میلی گرمیک 15 تا یک 60 ام مولار1 تا 10 گرمتا یک لیتر |
| ترکیب درصد نمونه 3لوریل تری متیل آمونیوم کلریدستیل تری متیل آمونیوم کلریدتیرونفسفات بافرسدیم کلرید آب مقطر | 3/0 تا 10 گرم01/0 تا 2 گرم1/0 تا 1000 میلی گرمیک 15 تا یک 60 ام مولار1 تا 10 گرمتا یک لیتر |

واکنشگرهای با ترکیب درصد 1 تا 3 به عنوان همولیز کننده و شویش دهنده اریتروسیت ها با عملکرد سورفکتانت های از نوع نمک چهارتایی آمونیوم یا آمفوتری برای ایجاد هموگلوبین و تبدیل آن به متهموگلوبین استفاده شده است که برای پایدارسازی برای مدت طولانی از تیرون کمک گرفته شده است.

# 3- 4- 2 پایدارکننده های هموگلوبین

از ترکیبات مختلفی به عنوان پایدارکننده هموگلوبین استفاده شده است. از آن جمله می توان به تیرون، 8-هیدروکسی کینولین، بی پیریدین، 1،10-فنانترولین، سالیسیلیک الکل، بیس فنول آ، پیرازول، 1-فنیل-3-پیرازولون، 3-متیل-1-فنیل-5- پیرازول، ایمیدازول، 4-فنیل ایمیدازول، 2-اتیل ایمیدازول، 1-متیل ایمیدازول را نام برد.

# 4- 1 مروری بر محلول های تجاری ارائه شده

از جمله بهترین محلول های اشاره شده با ترکیب درصد مشخص که پاسخ های خوبی را در خصوص توزیع اندازه ذره لوکوسیت ها ازائه داده است، می توان به ترکیبب درصد سورفکتانت های نمک های چهارتایی آمونیوم لوریل تری متیل آمونیوم کلرید و ستیل تری متیل آمونیوم کلرید اشاره نمود. در بقیه موارد، با استفاده از ترکیب درصدهای نامناسب از مواد، محلول قابلیت ایجاد افتراق بین لوکوسیت ها را نداشته و درنتیجه نامناسب است.



**شکل 5:** عدم امکان افتراق بین گونه های مختلف لوکوسیت



**شکل 6:** شناسایی دو قله برای گونه های لوکوسیت

در شکل 3 و شکل 4، فرمولاسیون نامناسب باعث شده که اندازه گیری درصد لوکوسیت ها که باید در سه قله باشد به ترتیب در یک قله و دو قله ظاهر شده است. درنتیجه نمی توان ترکیب درصد را بدون لحاظ نمودن این موارد به کار برد [2].

در یک ثبت اختراع دیگر که توسط شرکت معتبر کولتر به شماره 4962038 در ثبت اختراعات آمریکا به ثبت رسیده است [3]، یک محلول با استفاده از سورفکتانت های کاتیونی اشاره شده است که دارای ترکیب درصد زیر است :

|  |  |
| --- | --- |
| **ترکیب** | **بازه غلظت** |
| دودسیل تری متیل آمونیوم کلرید (محلول 50%) تترادسیل تری متیل آمونیوم برمیدپتاسیم سیانیدآب |  60 گرم بر لیتر6 گرم بر لیتر300 میلی گرم بر لیترتا حجم یک لیتر |

در پتنت دیگری که توسط شرکت ژاپنی Toa ثبت شده است، محلول برای اندازه گیری گلبول های سفید و پلاکت ها ارائه شده است که حاوی یک سورفکتانت پلی اکسی اتیلن از نوع غیریونی می باشد که دارای زنجیره 6 تا 24 کربنی است. همچنین حاوی یک بافر برای تنظیم pH در محدوده 3 الی 11 می باشد. اندازه گیری هموگلوبین با استفاده از این محلول امکان تشخیص سرطان خون و کم خونی را فراهم می نماید. همچنین در این پتنت، امکان اندازه گیری ائوزینوفیل ها نیز فراهم شده است (شکل 7) که تشخیص آنها در شرایط آلرژی بسیار حائز اهمیت است [4].



**شکل 7**: ایجاد افتراق برای اندازه گیری انواع لوکوسیت ها در خون

همچنین در پتنت دیگری که از همین شرکت ژاپنی ارائه شده است، از انواع سورفکتانت های کاتیونی استفاده شده است که می توان به دودسیل تری متیل آمونیوم برمید، لوریل تری متیل آمونیوم کلرید، میریستیل تری متیل آمونیوم برمید، ستیل تری متیل آمونیوم کلرید، استئاریل تری متیل آمونیوم کلرید، ستیل دی متیل اتیل آمونیوم کلرید، ستیل پیریدینیوم کلرید اشاره نمود [5].

# مراجع:

[1] Benezra J, Malin MJ, inventors; Technicon Instruments Corp, assignee. Cyanide-free hemoglobin reagent. United States patent US 4,853,338. 1989 Aug 1.

[2] Sakata T, inventor; Sysmex Corp, assignee. Reagent for measurement of leukocytes and hemoglobin in blood. United States patent US 5,242,832. 1993 Sep 7.

[3] Carter JH, Ledis SL, Crews HR, Sena T, Larsen FL, inventors; Coulter Electronics Inc, assignee. Multi-purpose blood diluent and lysing agent for differential determination of lymphoid-myeloid population of leukocytes. United States patent US 4,528,274. 1985 Jul 9.

[4] Hamaguchi Y, Tsujino Y, inventors; Sysmex Corp, assignee. Reagent and method for measuring leukocytes and hemoglobin in blood. United States patent US 5,116,539. 1992 May 26.

[5] Sakata T, Akai Y, Takarada K, Kouzuki C, Hyousa Y, inventors; Sysmex Corp, assignee. Reagent for analyzing leukocytes and a method for classifying leukocytes. United States patent US 5,538,893. 1996 Jul 23.

1. Chromogen [↑](#footnote-ref-1)