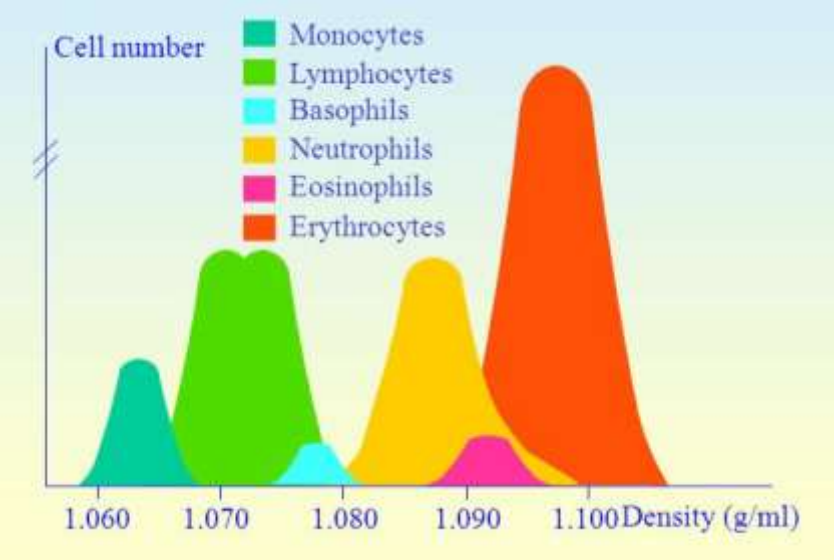
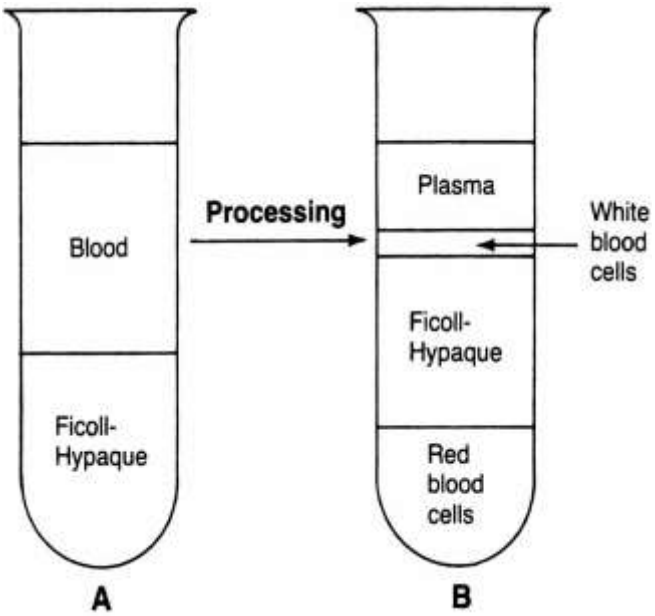
جداسازی سلول‌های منونوکلئر خون و شمارش

کلیات: لنفوسیت‌ها از مهمترین اجزاء پاسخ‌های ایمنی سلولی هستند. بخش عمدهٔ سلول‌های منونوکلئر خون لنفوسیت هستند (و به میزان کمتری منوسیت)، لذا بهترین منبع جداسازی لنفوسیت‌ها در انسان استفاده از خون محیطی است. (یادآوری می شود که بیش از ۷۰٪ این لنفوسیت‌ها را سلول‌های T تشکیل می‌دهند). بررسی لنفوسیت‌های T از جهات مختلفی اهمیت دارد و می‌تواند اطلاعاتی در مورد وضعیت ایمنی سلولی فرد بدهد. برای جداسازی سلول‌های منونوکلئر خون از بقیهٔ سلول‌های خون از روش گرادیان چگالی استفاده می‌شود. جداسازی سلولهای منونوکلئر با استفاده از شیب چگالی بر این اساس است که نوتروفیل‌ها و اریتروسیتها دارای چگالی یا دانسیته بیشتری



نسبت به سلولهای منونوکلئر هستند لذا اگر محلولی داشته باشیم که چگالی آن بیشتر از سلولهای منونوکلئر و کمتر از گلبولهای قرمز و نوتروفیلها باشد با استفاده از آن می‌توان این دسته از سلولها را از بقیه جدا نمود (شکل).

خون محیطی حاوی مادهٔ ضد انعقاد، روی این محلول با دانسیته معلوم (ترکیبی قندی بنام فایکول) قرار می‌گیرد و سانتریفوژ می‌شود. با توجه به اینکه دانسیتهٔ سلولهای منونوکلئر ۱/۰۴۵ و دانسیتهٔ فایکول ۱/۰۷۷ پس از پایان این مرحله سلولهای منونوکلئر به صورت یک حلقه بالای فایکول قرار می‌گیرند (شکل). در این مرحله روش در لوله چهار لایه تشکیل می‌شود که به ترتیب از بالا به پائین عبارتند از:



- پلاسما (مایل به زرد)
- سلول‌های مونونوکلئر لنفوسیت‌ها (سفید)
- فایکول (بی‌رنگ و شفاف)
- گلبولهای قرمز (و لایه نوتروفیل‌ها)

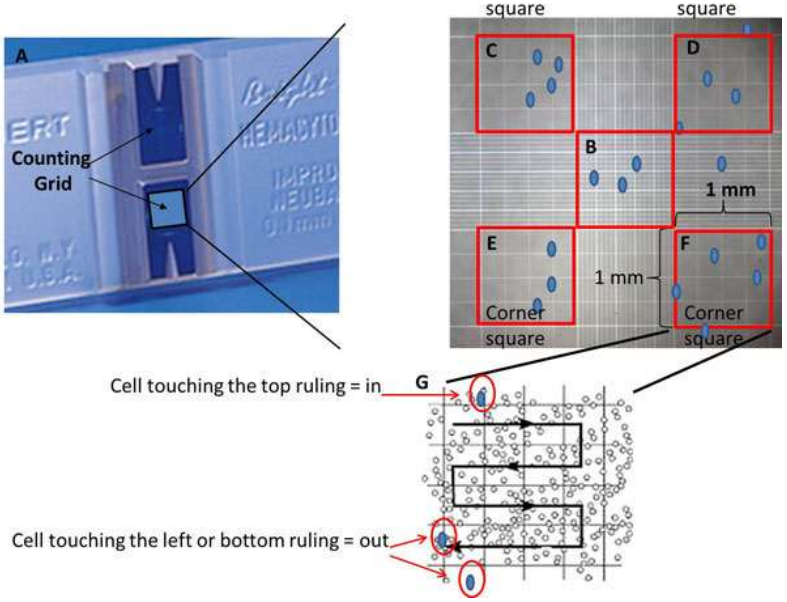
روش کار:

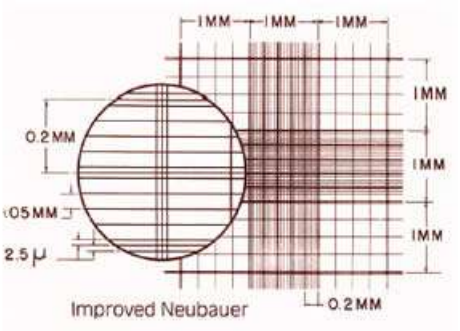
۱. ml ۲ فایکول در یک لوله کوتاه بریزید.
۲. یک سرنگ ۵ را هپارینه نمائید.
۳. ۳ میلی‌لیتر خون از فرد داوطلب بگیرید.
۴. خون گرفته شده را به آرامی از کنار دیواره لوله حاوی فایکول داخل آن بریزید بطوری که روی فایکول قرار گیرد.
۵. این مجموعه را با دور rpm ۲۸۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید.
۶. با پیپت پاستور لایه لنفوسیتها را برداشته در یک لوله تمیز بریزید.
۷. هم حجم لنفوسیت به آن نرمال سالین اضافه کرده و با دور rpm۱۵۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمائید. (مرحله شستشو).
۸. با استفاده از تریپان بلو درصد سلول‌های زنده و مرده را محاسبه کنید.
۹. تعداد لنفوسیت در واحد حجم (میلی لیتر) و تعداد لنفوسیت در کل نمونه خودتان را با استفاده از لام نئوبار شمارش و محاسبه کنید (در صورتیکه با جزئیات شمارش سلول آشنائی قبلی ندارید به توضیحات صفحه بعد مراجعه بفرمائید).
۱۰. محاسبات لازم برای کشت لنفوست ها در میکروپلیت را انجام دهید مثلا:
   i. در صورت نیاز به دویست هزار لنفوسیت در هر چاهک، نمونه شما قابل استفاده در چند چاهک است و چه حجمی از آن را باید بردارید؟
   ii. در صورتیکه این نمونه در بیست چاهک تقسیم شود در هر چاهک چند سلول وجود خواهد داشت؟

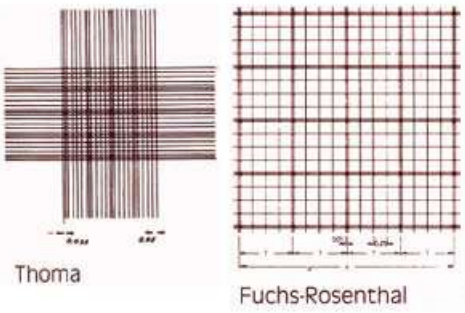
شمارش سلول

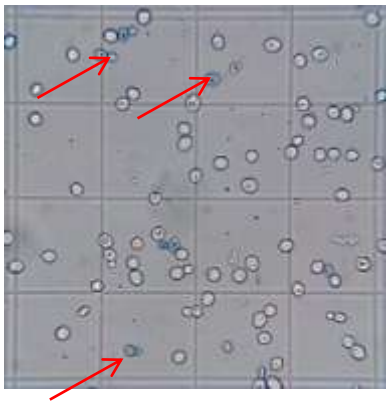
به طور معمول شمارش سلول توسط افراد با کمک میکرسکپ و لام نئوبار انجام میشود. در این لام ابعاد هر کادری که مشخص شده است یک میلی‌متر در یک میلی‌متر (و ارتفاع ۰,۱ میلی‌متر) و در نتیجه حجم مایعی که زیر این سطح است و سلولها در آن قرار دارند برابر ۰,۱ میلی‌متر مکعب (۰,۰۰۰۱ سانتی‌متر مکعب) می‌باشد. اگر تعداد سلول در کل این محدوده شمارش شود، تعداد در حجم فوق به دست آمده و با ضرب کردن در ۱۰۰۰۰ ، تعداد در سانتی‌متر مکعب (CC یا میلی لیتر–ml) محاسبه می شود.

اگر به جای شمارش کل محدوده، بخشی از خانه های آن را شمرده باشیم و همینطور اگر نمونه از قبل رقیق شده باشد، به همان نسبت در تعداد سلولها لحاظ میشود.





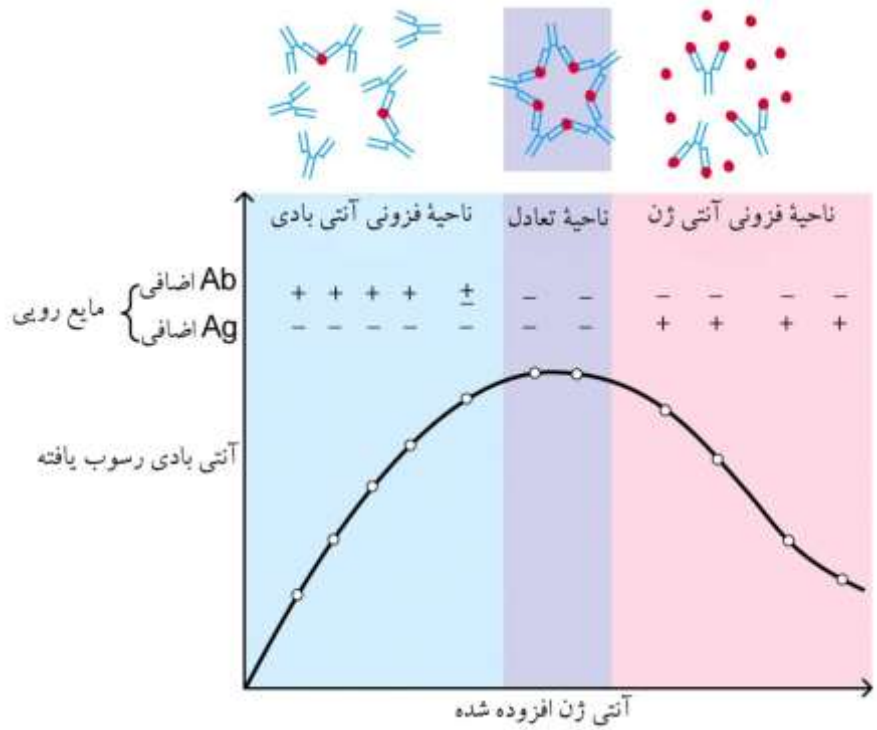




معمولا همزمان با شمارش سلول، به نمونه تریپان بلو (۰,۴٪ به نسبت مساوی) اضافه میشود تا تعداد سلول‌های زنده و مرده مشخص گردد. سلول های مرده رنگ می‌پذیرند (شکل).

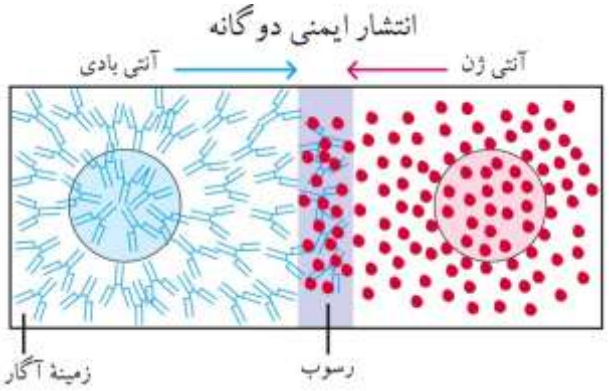
رسوبگذاری در ژل (انتشار شعاعی یا Radial Immunodiffusion - RID)

اساس و هدف تست: وقتی آنتی‌ژن‌های محلول در شرایط آزمایشگاهی با آنتی‌بادی مناسب خود مجاور می‌شوند در شرایط هم‌ارزی یا اکی‌والان (تعادل) پدیده‌ای قابل مشاهده به نام رسوبگذاری (پرسیپیتاسیون Percipitation) روی می‌دهد. بدیهی است برای اینکه آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها شبکه‌ای تشکیل دهند که به شکل رسوب قابل مشاهده باشد باید اولا چند ظرفیتی باشند و ثانیا در شرایط مطلوب قرار داشته باشند (شکل). برای فراهم کردن شرایط مناسب به عوامل متعددی باید توجه شود (دما، زمان و ...) اما وجود غلظت مناسب از



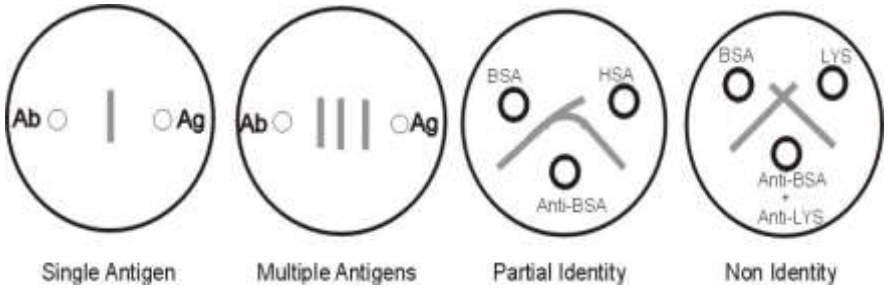
هر دو (آنتی‌ژن و آنتی‌بادی) بسیار ضروری است و اصلی‌ترین عامل محسوب می‌شود در شرایطی که یکی از این دو غلظت بیشتری داشته باشد رسوب ایجاد نمی‌شود یا مقدار آن کم است.

روش‌های مختلفی برای بررسی کیفی و اندازه‌گیری کمّی این رسوب وجود دارد که یکی از رایجترین آنها رسوبگذاری در ژل است (انتشار یا ایمونودیفوزیون Immunodiffusion). رسوبگذاری در ژل بر اساس انتشار آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در محیط نیمه جامد (معمولا ژل آگارز) است تا جایی که به غلظت بهینه (اپتیمم) برای ایجاد رسوب برسند. در این شرایط یک خط رسوبی تشکیل می‌شود.



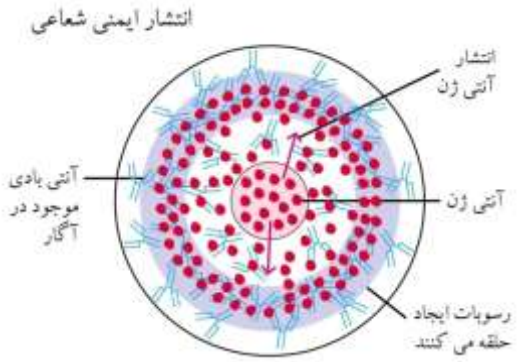
دو روش مشهور برای تست‌های انتشار در ژل وجود دارد که یکی از آنها روش اشترلونی یا انتشار دوجانبه (Ouchterlony = Double Diffusion) است و برای بررسی کیفی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و پی بردن به تفاوتها و شباهتهای بین آنتی‌ژنهای مختلف مناسب است.

در روش انتشار دوجانبه ؛ حفراتی در ژل ایجاد می‌شود و آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در حفرات مجزا ریخته می‌شوند. سرعت نفوذ هر کدام از این ملکولها در ژل نسبت مستقیم با غلظت و نسبت معکوس با وزن ملکولی آنها دارد. بنابراین محل و شکل و ضخامت خطوط رسوبی تشکیل شده در شرایط مختلف متفاوت است و می‌توان همزمان چندین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را بررسی کرد.



نمونه‌ای از خطوط تشکیل شده درروش ایمونودیفیوژن دوجانبه

روش دیگر انتشار شعاعی (Radial immunodiffusion)است که روشی کمّی بوده و از نظر حساسیت و دقت روش مناسبی برای اندازه‌گیری مقدار بسیاری از آنتی‌ژنهاست. در روش انتشار شعاعی غلظت یکی از این دو (معمولا آنتی‌بادی) ثابت است و بصورت یکنواخت در ژل پخش شده است و فقط آنتی‌ژن‌ها در حفرات ایجاد شده در ژل ریخته می‌شوند. همزمان با انتشار آنتی‌ژن در ژل؛ در محلی که غلظتهای مناسب وجود داشته باشد رسوب تشکیل می‌شود که به صورت هاله‌ای قابل مشاهده است. قطر این رسوب متناسب با غلظت آنتی‌ژن می‌باشد. این روش در آزمایشگاه ایمنولوژی بالینی کاربرد رایجی دارد و برای اندازه‌گیری غلظت اجزاء سرم مثل کمپلمان و ایمنوگلوبولین و ... به کار می‌رود.



روش کار: جهت انجام آزمایش از پلیتهایی استفاده می‌شود که چندین حفره دارند بنابراین علاوه بر سرم بیمار از چند کالیبراتور (استاندارد) که سرمهایی هستند با غلظتهای مشخص اجزاء سرم؛ استفاده‌می‌شود.

مراحل انجام تست بدین شرح می‌باشد:

۱. به تعداد کالیبراتورها چند حفره را شماره‌گذاری کنید و حفره‌هایی را که می‌خواهید سرم کنترل و مجهول را در آن بریزید بترتیب با C و X مشخص کنید.
۲. بکمک سمپلر و بدقت حجم مورد نیاز از هر نمونه را طبق پروتکل داخل چاهک از پیش تعیین شده بریزید.

- روش ریختن نمونه در چاهک بکمک سمپلر: برای گذاشتن نمونه؛ نوک سمپلر حاوی نمونه را در ته چاهک قرار داده و به آرامی شروع به تخلیه سمپلر کنید و همزمان با پر کردن چاهک؛ نوک سمپلر را از چاهک خارج نمائید زیرا چاهکها برای پذیرش حجم مورد نظر ایجاد شده‌اند و توجه بیشتر، در گذاشتن نمونه و سرریزنکردن از چاهک نتیجه دقیقتری را بهمراه دارد. ریختن نمونه به شکل نادرست اعم از کم و زیاد ریختن حجم سرم و یا حوادثی که حرکت رسوبی واکنش را از حالت دایره خارج نماید مانند سرریز شدن نمونه از چاهک و لبریز شدن روی ژل و نیز زخمی کردن ژل سبب دریافت نتیجهٔ نادرست می‌شود.

۳. پس از گذاشتن نمونه‌ها در چاهکهای مربوطه سرپوش پلیت راگذاشته و حدود ده دقیقه آن را بدون حرکت قرار دهید تا سرمها به درون ژل نفوذ نمایند. پس از جذب نمونه‌ها در ژل؛ پلیت را وارونه در روی سطحی صاف در دمای آزمایشگاه به مدت تعیین شده برای هر ایمونوگلوبولین قرار دهید.(IgA=24h; IgG=48h; IgM=72h)

۴. قطر رسوب دایره مربوط به هر یک از کالیبراتورها؛ کنترل و نمونه بیماران را جداگانه بکمک خط‌کش مخصوص RID اندازه‌گیری کنید. مشاهده و اندازه گیری واکنش رسوبی دایره‌ها در مقابل پس زمینه سیاه و تابش نور از پهلو به شکل دقیقتری انجام می‌گیرد.

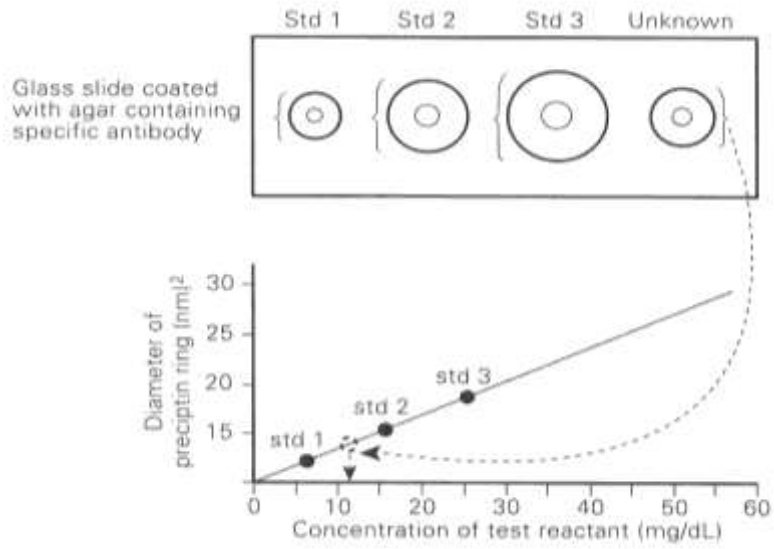
● روش کار با خط‌کش مخصوص RID: این خط‌کش دو محور اندازه‌گیری دارد؛ یکی خط‌کش میلیمتری در لبه و دیگری مثلث اندازه‌گیری قطر دایره رسوبی تا ۱۰mm در وسط می‌باشد.این مثلث شامل دو خط کج و یک خط موازی با افق ، در وسط بشکل میانه می‌باشد؛ خطوط کوتاه عمودی با فاصله معینی دو خط کج را مدرج کرده‌اند ارقام پایین مثلث قطر دایره رسوبی و ارقام بالای آن مجذور قطر دایره رسوبی (d^2) را نشان می‌دهند. برای اندازه‌گیری قطر دایره‌های رسوبی؛ پلیت را پشت خط‌کش در راس مثلث قرار داده و آنقدر جابجا کنید تا محیط خارجی دایره با دو خط کج کاملا مماس شود وخط میانه درست از وسط چاهک بگذرد.در این حالت رقم پایین خط عمودی که از وسط چاهک می‌گذرد قطر دایره رسوبی می‌باشد.برای اندازه‌گیری هاله‌های بیضی‌شکل (که بر اثر عدم دقت در زمان ریختن نمونه‌ها در چاهک ایجاد می‌شوند)

- قطری را که میانگین قطر بزرگ وکوچک می‌باشد مدنظر قرار می‌گیرد.
- در صورتیکه دایره ایجاد شده بیش از ۱۰mm باشد از لبه و مدرج خط‌کش استفاده می‌شود.
- منحنی استاندارد را با کمک مقادیر بدست آمدهٔ کالیبراتورها رسم و غلظت سرم مجهول را بدست آورید.

۵. پس از رسم منحنی، از نقطه مربوط به مجذور قطر دایرهٔ رسوبی سرم کنترل (C)؛ خطی موازی محور افقی رسم کرده تا منحنی راقطع کند سپس از آنجا خطی عمودی رسم کنید وتا روی محور افقی ادامه دهید. غلظت بدست آمده باید در محدوده مقادیر موجود در جدول ۲ باشد که در این صورت نشان می‌دهد که اندازه‌گیری دایره‌ها و رسم منحنی درست بوده است.

۶. برای بدست آوردن غلظت نمونهٔ مجهول؛ مانند نمونهٔ کنترل عمل کنید (با استفاده از مجذور قطر دایره رسوبی آن) و غلظت را بدست آورید.

● روش رسم منحنی و اندازه‌گیری غلظت: بر روی محور افقی؛ غلظت ایمونوگلوبولین در کالیبراتورهای مورد استفاده (مقادیر را از جدول پیدا کنید و دقت شود اشتباهاً اعداد غلظت مربوط به ایمونوگلوبولین دیگری استفاده نشود) و بر روی محور عمودی؛ مجذور قطر دایره‌های رسوبی هر کالیبراتور (d^2) را جداگانه علامت‌گذاری کنید و سپس منحنی خطی نقاط بدست آمده را رسم نمائید.



غلظت ایمونوگلوبولینها در سرم کنترل			
Unit	IgA	IgG	IgM
mg/dl	۱۰۵–۲۵۰	۶۵۰–۱۲۳۰	۵۰–۱۴۵

غلظت ایمونوگلوبولینها در کالیبراتورهای کیت مورد استفاده			
پروتئین	کالیبراتور شماره ۱ mg/dl	کالیبراتور شماره ۲ mg/dl	کالیبراتور شماره ۳ mg/dl
IgA	۱۶۰	۳۰۰	۵۴۰
IgG	۹۰۰	۱۵۰۰	۲۰۵۰
IgM	۶۵	۱۵۰	۲۴۰

پس از رسم منحنی، از نقطه مربوط به مجذور قطر دایرهٔ رسوبی سرم کنترل (C)؛ خطی موازی محور افقی رسم کرده تا منحنی راقطع کند سپس از آنجا خطی عمودی رسم کنید وتا روی محور افقی ادامه دهید. غلظت بدست آمده باید در محدوده مقادیر موجود در جدول ۲ باشد که در این صورت نشان می‌دهد که اندازه‌گیری دایره‌ها و رسم منحنی درست بوده است.

برای بدست آوردن غلظت نمونهٔ مجهول؛ مانند نمونهٔ کنترل عمل کنید (با استفاده از مجذور قطر دایره رسوبی آن) و غلظت را بدست آورید.

نکته۱: در صورتیکه کاغذ نیمه لگاریتمی در اختیار داشته باشیم بجای استفاده از مجذور قطر؛ می‌توانیم نمودار غلظت به قطر دایره‌های رسوبی را روی این کاغذ رسم نموده که منحنی خطی‌تری بدست می‌آید و جواب دقیقتر خواهد بود.

نکته۲: اگر قطر دایره رسوبی نمونه بیمار خارج از دامنه کالیبراتور باشد باید با رقیق کردن نمونه؛ آزمایش را تکرار کرد و در زمان محاسبه غلظت ضریب رقت سرم را در نظر گرفت.

- **مواردی که باید حتما در گزارش کار ذکر شود:**

قطر تمام دایره‌های رسوبی ومجذور آنها

منحنی استاندارد

غلظت بدست آمده جهت کنترل و مقایسه آن با مقادیر جدول ۲

غلظت نمونه مجهول

منابع:

پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران، ۱۳۸۱، ص۲۵۷-۲۹۱.

رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹، ص ۱۲۰-۱۲۸.

Turgeon ML, Immunology & serology in laboratory medicine. Mosby Publication, 1996, ch.8.