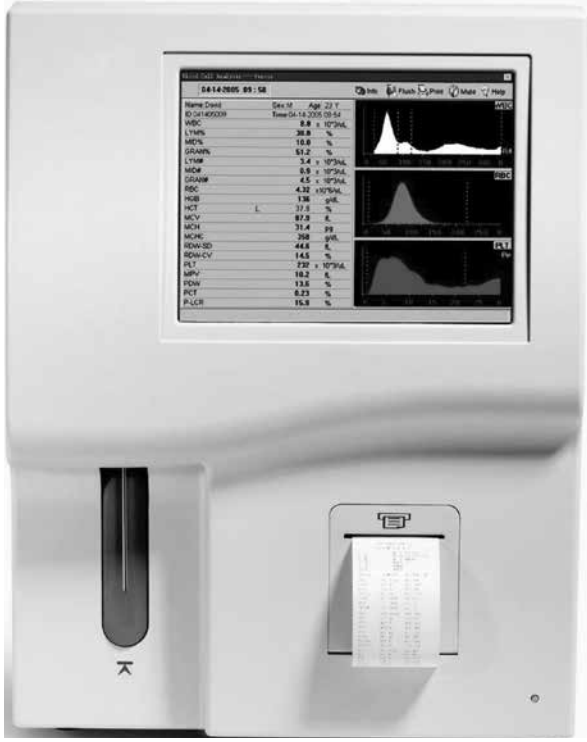


مهندس احسان درخشان نیا
derakhshannia@hotmail.com

اصول سل‌کانترهای هماتولوژی

در این شماره و شماره‌های آینده ماهنامه، تکنولوژی و اساس کار سل‌کانترها، تشخیص منابع خطا در این تجهیزات و کنترل کیفی در آزمایشگاه هماتولوژی را به طور کامل بررسی می‌کنیم.
در شروع لازم است به مقدمه‌ای در خصوص خون و بیماری‌های خونی بپردازیم.

خون

یک انسان بالغِ میان سال، حدود ۵ لیتر خون در حال گردش در عروق خود دارد که این خون مواد حیاتی ضروری را در اختیار بدن قرار داده و مواد مضر باقی مانده را از بدن جدا می‌نماید. خون به عنوان مایعی ضروری برای حفظ حیات، اکسیژن را از ریه‌ها به بافت‌های مختلف منتقل کرده و دی‌اکسید کربن را از بافت‌ها جمع آوری و به ریه‌ها می‌آورد. این مایع جهت رشد بدن، مواد غذایی را از دستگاه گوارش، و هورمون‌ها را از غدد درون‌ریز به سرتاسر بدن منتقل کرده و درنهایت جهت حفظ سلامتی، مواد مقابله کننده با بیماری‌ها را به بافت‌های بدن می‌رساند و مواد زاید را به کلیه‌ها منتقل می‌کند.

در ادامه به طور مختصر به اجزای تشکیل دهنده خون می‌پردازیم.

به طور کلی خون از دو بخش مایع و جامد (سلول‌ها یا گلبول‌های خون) تشکیل شده است (شکل۱). بخش مایع در حدود ٥٤ درصد و بخش سلولی در حدود ٤٦ درصد آن را تشکیل می‌دهد.

بخش مایع خون و عملکرد آن

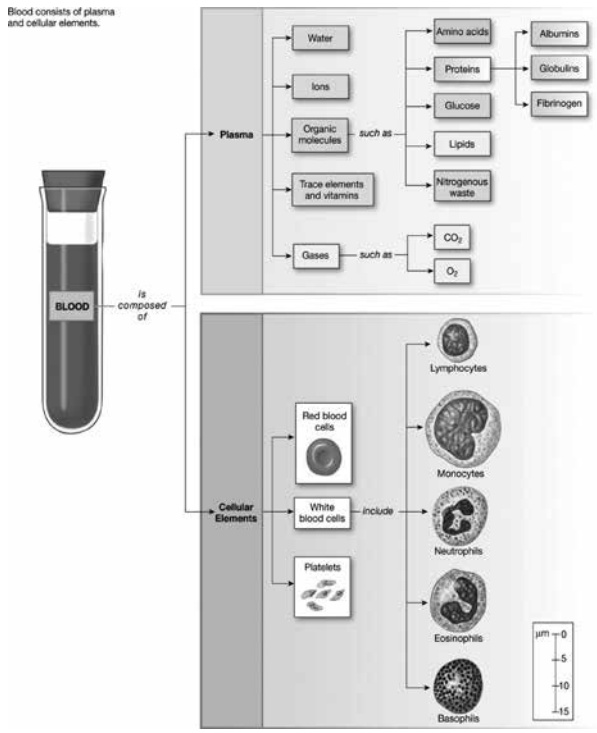
بخش مایع خون که پلاسما نام دارد مایعی است شفاف و متمایل به زرد که سلول‌های جامد خون و پلاکت‌ها را حمل می‌کند و در انعقاد خون نیز نقش دارد. بدون پلاسما، گلبول‌های حیات‌بخش خون قادر به ادامه زندگی نیستند. حدوداً ۹۰ درصد از مایع پلاسما را آب و مابقی را مواد پروتئینی و غیرپروتئینی تشکیل می‌دهند. مواد پروتئینی پلاسما عمدتاً شامل آلبومین، پروتئین‌های انعقادی، ایمنوگلوبولین‌ها، ترانسفرین، ماکروگلوبولین‌ها، و مواد غیر پروتئینی پلاسما شامل الکترولیت‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و آب است.

در صورتی که پروتئین‌های انعقادی از پلاسما جدا شود مایع باقی مانده سرم نامیده می‌شود. بنابراین سرم، پلاسمای فاقد فیبرینوژن و سایر پروتئین‌های انعقادی است. پروتئین‌های سرم حدود ٦ تا ٨ درصد خون را تشکیل می‌دهند. آلبومین‌ها و گلبولین‌های سرم از این مقدار پروتئین تقریباً سهم مساوی دارند. علاوه بر آب، پلاسما حاوی نمک‌ها و و مواد معدنی محلول، مثل کلسیم، سدیم، منیزیم و پتاسیم است.

آلبومین خون در کبد ساخته می‌شود و در درمان بعضی از بیماری‌های کبدی و کلیوی خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این آلبومین برای موارد اورژانس مثل تصادفات و یا سکته‌های قلبی و مواردی که نتوان در فرصت مناسب خون کامل را تهیه نمود به کار می‌رود. این پروتئین فشار اسمزی خون را حفظ می‌نماید و مسئول جابجایی بسیاری از ملکول‌های کوچک موجود در خون است.

گلبولین‌های سرم شامل سه دسته‌ی آلفا گلوبولین، بتا گلوبولین و گاما گلوبولین است. آلفا گلوبولین پروتئین‌های حاملی هستند که موادی مثل تیروکسین و یا ویتامین A را در خون منتقل می‌کند. بتا گلوبولین شامل پروتئین حمل کننده آهن یا ترانسفرین است. آنتی بادی‌ها اکثراً در دسته گاما گلوبولین‌ها

قرار می‌گیرند و در مقابله با بیماری‌های عفونی مثل سرخک و بعضی از انواع هپاتیت نقش دارد. به همین دلیل به هنگام عفونت یا واکسیناسیون، مقدار گاماگلوبولین‌های خون به میزان زیادی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، سرم خون حاوی چربی‌های متنوعی مثل کلسترول و تری گلیسیرید است.



شکل۱. اجزاء تشکیل دهنده خون

بخش جامد خون و عملکرد آن

بخش جامد خون شامل سلول‌های قرمز، سفید و پلاکت‌هاست. این عناصر در خون توسط شمارشگرهای سلولی قابل شناسایی هستند و جمعاً حدود ٤٦ درصد خون را تشکیل می‌دهند.

- گلبول‌های قرمز یا اریتروسیت‌های خون

یک قطره خون حاوی میلیون‌ها گلبول قرمز است که به طور مداوم اکسیژن را به تمام بدن منتقل کرده و مواد زاید را از بافت‌ها دور می‌کند. گلبول قرمز تنها به دلیل داشتن پروتئینی به نام هموگلوبین (ماده قرمز رنگ) این نام را به خود گرفته است. هموگلوبین به دلیل آنکه دارای عنصر آهن است به عنوان یک انتقال دهنده بسیار خوب برای اکسیژن و دی‌اکسید کربن عمل می‌کند.

با عبور خون از درون شش‌ها، ملکول‌های اکسیژن به هموگلوبین متصل می‌شود و هنگامی که خون در بافت‌های بدن جاری می‌شود، هموگلوبین اکسیژن را در سلول‌های بدن آزاد می‌سازد. پس از آن، ملکول‌های هموگلوبینِ تخلیه شده، با دی‌اکسیدکربن یا سایر گازهای مضر باقی مانده در بافت‌ها ترکیب شده و این گازها را از بافت‌های بدن دور می کند. متوسط طول عمر گلبول‌های قرمز ۱۲۰ روز است. استخوان‌های بدن به طور مداوم گلبول‌های قرمز جدید تولید کرده و موجودی بدن را از این سلول‌ها ثابت نگه می‌دارد. در یک میلی‌لیتر مکعب خون مرد بالغ به طور متوسط ۵،۰۰۰،۰۰۰ سلول و برای یک زن بالغ در حدود ٤،۳۰۰،۰۰۰ سلول وجود دارد. اگر تعداد گلبول‌های قرمز از تعداد نرمال بیشتر یا کمتر شود، شخص ممکن است علائم مختلفی را تجربه کند. اطلاعاتی که از شمارش سلول‌های قرمز به دست می‌آید می‌تواند در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار بگیرد.

- گلبول‌های سفید یا لکوسیت‌های خون

گلبول‌های سفید خون شامل لنفوسیت‌ها (لنفوسیت‌های B و T)، مونوسیت‌ها (که پس از استقرار در بافت های بدن ماکروفاژ نامیده می‌شود)، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها هستند (شکل ۱). گلبول‌های سفید خون به طور مرتب در جستجوی عوامل بیماریزا در بدن هستند و به محض ورود میکروب یا عوامل عفونی به بدن آنها را شناسایی و از راه‌های مختلف به آنها حمله می‌کنند. لنفوسیت‌های B، آنتی بادی‌های حفاظت کننده‌ای تولید می‌کنند که قدرت بیماری‌زایی میکروب‌ها را مهار می‌نماید و لنفوسیت‌های T در تولید این مواد، آنها را یاری نموده و در تحریک سایر گلبول‌های سفید بدن نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. دسته دیگری از این گلبول ها (ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها) باکتری‌ها را احاطه نموده و آنها را از بین می‌برند. ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌های موجود در خون نیز در مقابله با انگل‌ها و در ایجاد پاسخ‌های آلرژیک و افزایش حساسیت‌های ناخواسته نقش اساسی دارند. طول عمر گلبول‌های سفید خون کوتاه و حدوداً بین چند روز تا چند هفته است. یک قطره خون می‌تواند حاوی ۷۰۰۰ گلبول سفید باشد، البته این مقدار دریک فرد در زمان های مختلف متغیر است (بین ٤۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰). اگر یک عامل عفونی مهاجم دوباره وارد بدن شود و یا در بدن پایدار بماند، تعداد گلبول‌های سفید به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. بالا بودن تعداد گلبول‌های سفید خون به طور مداوم، علامت وجود لوسمی (نوعی سرطان خون) است. یک بیمار لوسمیک می‌تواند تا ۵۰،۰۰۰ گلبول سفید در یک قطره از خون خود داشته باشد.

- پلاکت‌ها

پلاکت‌ها نقش بسیار مهمی در جلوگیری از خونریزی از دست رفتن ناگهانی خون ایفا می‌کنند. پلاکت‌ها بدون رنگ بوده و شکل منظمی ندارند. سطوح چسبنده پلاکت‌ها به

آنها اجازه می‌دهد تا همراه با سایر مواد مورد نیاز جهت توقف خونریزی تشکیل لخته بدهند. به هنگام خونریزی، پلاکت‌ها در محل جراحت جمع شده و سعی در متوقف نمودن جریان خون می‌نمایند. کلسیم، ویتامین K و پروتئینی که فیبرینوژن نامیده می‌شود در ایجاد لخته به پلاکت‌ها کمک می‌کنند. کلسیم و ویتامین K برای ایجاد لخته خونی باید در خون وجود داشته باشند در غیراین صورت زمان لخته شدن خون طولانی‌تر خواهد شد و در فقدان کامل و دراز مدت آنها، خونریزی ایجاد شده می‌تواند تا مرگ فرد ادامه یابد.

شمارش پلاکت‌ها در تشخیص خونریزی‌های داخلی و بررسی عمکلرد قابلیت لخته شدن خون اهمیت به سزایی دارد ضمن اینکه شمارش پلاکت‌ها به دلیل اندازه کوچک آنها و نیز تمایل آنها برای بودن در کنار یکدیگر، کار مشکلی است. تعداد متوسط پلاکت‌ها در بدن یک فرد بالغ بین ۱۵۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰ در یک میلی‌متر مکعب است[۱].

بیماری‌های خون

بیماری‌های زیادی وجود دارد که در ابتدا سلول‌های خونی را درگیر می‌کنند. بعضی از این بیماری‌ها در نتیجه تولید نامناسب و یا ناکافی یک دسته از سلول‌های خاص به وجود می‌آیند. برای مثال، فاکتورهای بسیار زیادی وجود دارند که می‌توانند باعث افزایش و کاهش تعداد گلبول‌های سفید شوند. فاکتورهایی مانند استرس، ورزش و بی‌حس کننده‌ها می‌توانند به طور موقتی تعداد گلبول‌های سفید را افزایش دهند. چنین تغییری، افزایش فیزیولوژیکی نامیده می‌شود. اما تغییر در تعداد گلبول‌های سفید که در اثر یک بیماری ایجاد می‌شود تا زمان به کنترل درآمدن بیماری باقی می‌ماند و چنین تغییری، تغییر پاتولوژیک نام دارد. معمولاً تغییر تعداد کل گلبول‌های سفید به دلیل تغییر در تعداد یکی از پنج دسته از این گلبول‌ها است. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون، لکوسیتوز نام دارد. عواملی که ممکن است باعث لکوسیتوز شوند شامل عفونت و بیماری‌های خاصی مانند لوسمی می‌شوند. در لوسمی، گرچه بیمار تعداد زیادی گلبول سفید در بدن خود دارد اما این گلبول‌ها به طور درستی در بدن وی تقسیم نشده‌اند و در نتیجه نمی‌توانند ایمنی لازم را فراهم آورند. در نتیجه بیمار مستعد پذیرش انواع عفونت‌ها می‌شود. کاهش در تعداد گلبول‌های سفید ممکن است به دلیل عفونت‌های ویروسی، تشعشعات یونی، داروهای خاص و یا شیمی درمانی اتفاق بیفتد. عفونت ایدز مثال دیگری است که باعث کاهش گلبول‌های سفید خون می‌شود.

چون گلبول‌های قرمز وظیفه حمل اکسیژن را بر عهده دارند، کاهش در تعداد آنها باعث کاهش اکسیژن رسانی به اعضا خواهد شد. این وضعیت، کم خونی نام دارد. علائم کم‌خونی شامل خستگی، ضعف و سردرد می‌شود. کم‌خونی شدید باعث افزایش ضربان قلب می‌شود.

برخی از کم خونی‌ها ممکن است در اثر کمبود ویتامین‌هایی نظیر B۱۲ یا اسید فولیک ایجاد شوند. همچنین، کم‌خونی ممکن است زمانی اتفاق بیفتد که سرعت از دست دادن خون بیشتر از سرعت تولید سلول توسط مغز استخوان باشد. نمونه‌ای از این قضیه وجود یک زخم خونریزی کننده است.

مردمی که در ارتفاعات زندگی می‌کنند به دلیل اینکه کمبود اکسیژن، بدن را به تولید گلبول‌های قرمز بیشتر تحریک می‌کند، دچار افزایش تعداد گلبول‌های قرمز هستند.

پلی سیتمی–Polycythemia vera نام بیماری است که طی آن تعداد گلبول‌های قرمز و سایر سلول‌های خون به شدت افزایش می‌یابد.

- **بیماری‌های ارثی**

برخی از بیماری‌های خونی نظیر هموفیلی، ارثی هستند. هموفیلی بیماری است که در آن یکی از فاکتورهای مورد نیاز برای لخته شدن خون وجود ندارد و یا ضعیف است. از دیگر بیماری‌های ارثی خون حالتی است که بیمار دچار اختلالات هموگلوبین می‌شود. به عنوان مثال، کم خونی سلول داسی–شکل حالتی است که در آن، بدشکلی هموگلوبین باعث ایجاد اختلال در عملکرد آن می‌شود.

- **بیماری‌های ثانویه یا اکتسابی**

اختلال در سلول‌های خون ممکن است به دلیل بیماری‌هایی در سایر ارگان‌های بدن اتفاق بیفتد. چنین حالتی را بیماری‌های ثانویه یا اکتسابی گویند. برای مثال، گلبول‌های قرمز غیر عادی ممکن است در افرادی که از بیماری فشار خون بالا رنج می‌برند دیده شود، چراکه گلبول‌های قرمز هنگام عبور از رگ‌های تنگ و کوچک ممکن است آسیب ببینند. افراد مبتلا به دیابت ممکن است از حالاتی رنج ببرند که در آن فرد به کندی از بند عفونت‌های احتمالی رهایی می‌یابد که به این دلیل اتفاق می‌افتد که گلبول‌های سفید به صورت کامل وظیفه خود را انجام نمی‌دهند و یا لنفوسیت‌ها (دسته‌ای از گلبول‌های سفید) حالتی غیرعادی را در مونونوکلئوز عفونی–Infectious mononucleosis، که نوعی عفونت ویروسی است، پدید می‌آورند.

سلول‌های خون، همچنین ممکن است در برخورد با درمان‌های خاص و یا داروهای مشخص تحت تاثیر قرار بگیرد. مقادیر بالای آسپرین باعث ایجاد اختلال در عملکرد

پلاکت‌ها می‌شود. و یا اگرچه شیمی درمانی برای جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی طراحی شده است اما چنین داروهایی قدرت انتخاب ندارند و ممکن است باعث توقف تولید سلول‌های خونی شوند. در نتیجه سلول‌های خونی بیمارانی که شیمی درمانی می‌شوند، به صورت مرتب شمارش می‌شود تا اطمینان حاصل شود که تعداد سلول‌های آنها به مرز خطرناکی نرسد[۱و۲و۳].

شمارش‌های سلول‌ها

از زمانی که اهمیت خون شناسی در آزمایش‌های تشخیص طبی مشخص شد روش‌های تجزیه و تحلیل خون نیز همواره در تغییر و تحول بوده است. امروزه آزمایش CBC به کمک دستگاه‌های الکترونیک متداول شده که در مقایسه با تکنیک‌های معمول پیشین مزایای زیادی دارد؛ چراکه این تجهیزات دقت و سرعت بیشتری دارند و در عین حال اطلاعات کامل‌تری را یک جا در اختیار ما قرار می‌دهند. واضح است که این شمارنده‌ها امتیازهای بسیار زیادتری نسبت به شمارش سلولی به روش دستی یا چشمی دارند.

در روش دستی شمارش سلولی توسط محفظه‌ی هموسیتومتر، شخص آزمایش کننده سلول‌ها را به صورت واقعی مشاهده کرده و شمارش می کند. بنابراین اطمینان حاصل می‌کند که ذرات گرد و غبار، حباب‌ها و یا مواد خارجی دیگری به عنوان سلول شمارش نمی‌شود. با وجود اینکه از نظر تئوری این روش صحت دارد ولی در واقع خطای بسیار بالایی داشته و فاقد دقت لازم است. چنانچه ناچار به استفاده از این روش به عنوان روش مرجع باشیم می‌بایست بر روی یک نمونه چندین آزمون مکرر انجام گیرد. برآورد شده است که یک نتیجه نسبتاً مطمئن در این روش نیاز به ۲۰ تا ۳۲ بار شمارش مکرر دارد که همین امر باعث طولانی و خسته کننده بودن این روش می شود. درنتیجه کمیته بین‌المللی استاندارد سازی هماتولوژی (ICSH) روش مرجع را برای شمارش سلولی، استفاده از شمارشگرهای الکترونیک اتوماتیک یا نیمه اتوماتیک معرفی کرده است.

اساس کار سل‌کانترهای هماتولوژی

سل‌کانترها یا آنالیزرهای هماتولوژی دستگاه‌هایی هستند که قادرند نمونه خون بیمار را برداشته، با محلول‌های لیزکننده، رقیق‌کننده و یا محلول‌های رنگ‌آمیزی مخلوط کرده و بعد از ارزیابی و شمارش سلول‌ها، تعیین مقدار هموگلوبین و دیگر اندکس‌های هماتولوژیکی و شمارش افتراقی لوکوسیت‌ها، نتایج را به صورت نمودارهای سیتوگرام، هیستوگرام و یا اسکاترگرام در دو فرمت چاپ شده و یا صفحه نمایش LCD به اپراتور دستگاه عرضه کنند.

سل‌کانترهای هماتولوژی از سه بخش اصلی هیدرولیک، پنوماتیک و الکترونیکی تشکیل می‌شوند که :

- برداشت محلول‌ها و نمونه‌های خون مورد نیاز دستگاه (آسپیره کردن)، رقیق‌سازی نمونه، مخلوط کردن نمونه با محلول‌ها، افزودن محلول لیزکننده به نمونه، تخلیه محلول‌ها و فاضلاب به بیرون و در نهایت شستشو و آماده سازی مجدد (Stand–by)، وظیفه سیستم هیدرولیک:
- تولید خلاء و فشار منفی ثابت جهت کنترل دریچه‌ها و همچنین کنترل حرکت محلول‌ها و نمونه در داخل سیستم هیدرولیک، وظیفه سیستم پنوماتیک:
- پردازش اطلاعات و داده‌های دستگاه توسط یک CPU یا میکروپروسسور وظیفه سیستم الکترونیکی

دستگاه است. دستگاه‌های جدید دارای بخش چهارمی به نام سیستم رباتیک نیز هستند که قادر است به‌صورت اتوماتیک اقدام به میکس خون و نمونه برداری از ویال‌های CBC نماید. از فرآیندهای پردازش داده‌ها در این تجهیزات می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

✔ اندازه‌گیری و پردازش سیگنال‌های حاصل از عبور سلول‌ها از ناحیه حساس شمارش سلولی

✔ محاسبه و انتقال نتایج به چاپگر یا هر خروجی دلخواه در سیستم

✔ ترسیم گراف پارامترهای اصلی (سیتوگرام‌ها، اسکاترگرام و یا هیستوگرام‌های مربوط به گلبول‌های قرمز، سفید و یا پلاکت‌ها)

✔ کنترل زمان اندازه‌گیری و توالی تست‌ها

✔ تحلیل آماری داده‌ها، اجزای برنامه کنترل کیفی و کالیبراسیون سیستم

✔ ذخیره و بازیابی پاسخ‌ها

✔ سیستم اپتیکال قرائت بارکُد جهت به حداقل رساندن اشتباهات دفتری و ...

از دیدگاه تکاملی آنالیزرهای هماتولوژی را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد:

۱–سل‌کانترهای نیمه اتوماتیک: مثل سل‌کانتر CBC$_9$ که در آن مرحله رقیق‌سازی در خارج از دستگاه و به روش دستی انجام گرفته و سپس برای شمارش و آنالیز نهایی به دستگاه داده می‌شود.

۲–سل‌کانترهای اتوماتیک: این دستگاه‌ها بین ۸ تا ۱۸ پارامتر هماتولوژی را اندازه‌گیری و محاسبه کرده و قادرند شمارش افتراقی سه قسمتی لکوسیت‌ها را انجام دهند که از این جهت به آنها ۳Part هم گفته می‌شود. بیشتر سل‌کانترهای موجود در بازار کشورمان را این دستگاه‌ها تشکیل می‌دهند که از جمله آنها می‌توان سیسمکس‌های سری K، Helena، Hycell، کولتر S–Plus، Mindray و .. را نام برد.

۳–سل کانترهای تمام اتوماتیک: این دستگاه‌ها قادرند تا ۳۲

پارامتر هماتولوژی را اندازه‌گیری و محاسبه کنند. همچنین امکان شمارش ۵ تا ۷ قسمتی لکوسیت‌ها را نیز فراهم می‌آورند. از جمله این سل‌کانترها می‌توان تکنیکون‌های سری H۱ و سیسمکس‌های سری XE-۲۱۰۰ و XT-۲۰۰۰i، کولترهای LH۷۵۰ و GEN-S و نهایتاً سل‌کانترهای Abott-Cell Dyn اشاره کرد.

سل‌کانترای هماتولوژی شمارش تام و افتراقی سلول‌های خونی را براساس ویژگی‌هایی نظیر اندازه، تراکم، غلظت و حجم سلولی، تراکم و لوبولاریتی هسته، خواص بیوشیمیایی و آنزیماتیک سیتوپلاسم، رسانایی الکتریکی سلول، وضعیت گرانول‌ها و پراکنش نور تابشی به آنها انجام می‌دهد. از نظر اصول کار و روش ارزیابی سلول‌ها، دو روش عمده در سل‌کانترهای هماتولوژی وجود دارد:

- **تغییر در هدایت الکتریکی**

این روش، خود شامل دو روش زیر است:

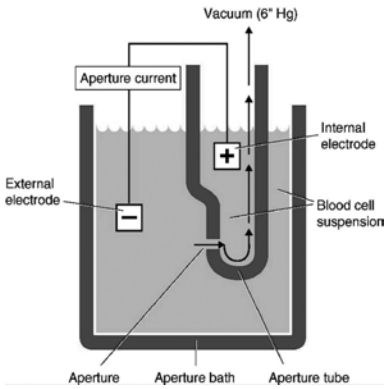
- روش امپدانس یا مقاومت الکتریکی
- روش کاپاسیتانس یا ظرفیت الکتریکی

- **روش‌های اپتیکال یا نوری.**

در این شماره، به بررسی روش تغییر در هدایت الکتریکی و دو موردِ روش امپدانس و کاپاسیتانس بسنده می‌کنیم. بررسی روش اپتیکال می‌ماند برای شماره‌های بعد.

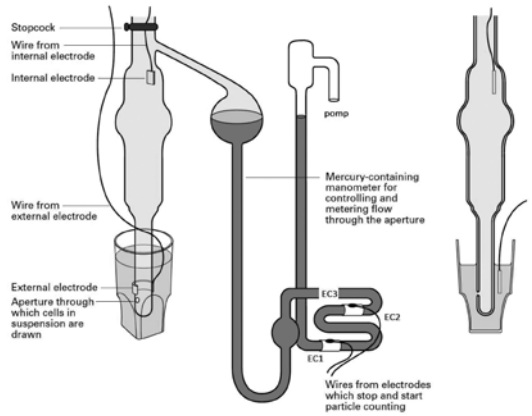
روش امپدانس الکتریکی

روش امپدانس الکتریکی (EI) که تحت عنوان روش مقاومت الکتریکی نیز شناخته می‌شود، عمده‌ترین روش به کار گرفته شده در سل‌کانترهای هماتولوژی است که اولین بار در سال ۱۹۵۶ توسط والاش کولتر ابداع شد. تمامی سلول‌ها به دلیل غشای فسفولیپیدی و به دلیل استقرار فسفولیپیدهای بدون بار در سطح سلول، به عنوان ذرات بیولوژیک نیمه‌رسانا عمل می‌کنند. برای شمارش و آنالیز سلول‌ها، ابتدا خون توسط سیستم‌های هیدرولیک و پنوماتیک دستگاه سل‌کانتر، در یک رقیق‌کننده هادی جریان الکتریکی (محلول ایزوتون) به فرم سوسپانسیون تبدیل شده و سپس به یک چمبر شمارش سلولی ارسال می‌شود، طی این فرآیند، خون تا ۶۲۵۰ برابر رقیق می‌شود. در داخل چمبر شمارش، لوله کوچکی به نام لوله Aperture وجود دارد که در قسمت تحتانی-کناری آن سوراخی بنام روزنه Aperture تعبیه شده و داخل آن با مایع ایزوتون پر شده است. در سمت داخل لوله، الکترودی با ولتاژ DC منفی و در سمت خارج لوله، الکترودی با ولتاژ DC مثبت قرار دارد که این دو الکترود با توجه به خاصیت رسانایی مایع ایزوتون و با توجه به وجود روزنه Aperture بین یکدیگر تبادل الکترونی انجام داده و در نتیجه یک جریان الکتریکی پیوسته با فرکانس پایین بین آنها شکل می‌گیرد. انتهای فوقانی لوله نیز به یک پمپ وصل می‌شود که در زمان خاصی عمل پمپاژ را انجام می‌دهد و باعث می‌شود تا فرآیند شمارش طی زمان خاصی مثل ۱۰ تا ۲۰ ثانیه انجام شود که با توجه به سرعت و قدرت ثابت پمپ، در این مدت زمان حجم مشخص و ثابتی از سوسپانسیون سلولی شمارش می‌شود. درنهایت حجم سوپانسیون شمارش شده براساس واحدهای استانداردی مثل میکرولیتر، میلی‌لیتر و ... محاسبه و گزارش می‌شود. لازم به ذکر است که سل‌کانترها سوسپانسیون خونی را در عرض مدت زمان خاصی مورد شمارش قرار می‌دهند که این زمان معادل حجم خاصی از محلول خواهد بود. برای این منظور، انتهای فوقانی لوله Aperture به یک لوله بزرگتر به نام لوله جیوه که در قسمت میانی آن حباب شیشه‌ای وجود دارد متصل می‌شود. داخل این لوله جیوه مایعی قرار دارد که کل سیستم به یک پمپ خلاء متصل می‌شود. جیوه به دلیل خاصیت سیال بودن و سنگینی‌ای که دارد می‌تواند باعث حرکت آرام سوسپانسیون سلولی و دیگر مایعات شود. در انتهای لوله‌ی دوم سه الکترود دیگر وجود دارد که EC۱، EC۲ و EC۳ نامیده می‌شود. عمل پمپاژ باعث بالا آمدن جیوه و پرکردن حباب شیشه‌ای می‌شود که طی این فرآیند جیوه تا الکترود EC۳ حرکت کرده و بالا می‌آید. به محض عبور جیوه از EC۳ جریان برق پمپ قطع شده، جیوه در EC۳ مانده و دستگاه آماده (Ready) می‌شود. هنگام شمارش سلولی به دلیل بالا قرار گرفتن سطح جیوه نسبت به سطح لوله Aperture و با توجه به سنگینی جیوه، با زدن کلید استارت، شیر پمپ باز شده و جیوه پایین می‌آید. به محض رسیدن جیوه به الکترود EC۲ زمان شمارش سلولی آغاز و با رسیدن جیوه به الکترود EC۱، شمارش تمام می‌شود. در اثر این فرآیند و باتوجه به متصل بودن لوله‌ی جیوه به لوله Aperture، هم‌حجم مقدار جیوه‌ی موجود بین دو الکترود EC۱ و EC۲، سوسپانسیونِ رقیق شده سلولی نیز از روزنه Aperture عبور کرده و وارد لوله می‌شود و حین این عمل، سلول‌ها شمارش و ارزیابی می‌شود.



شکل۲. شکل شماتیک از ساختار سل‌کانترهای پایه امپدانس الکتریکی که در آنها سلول‌ها با عبور از یک Aperture، باعث ایجاد پالس الکتریکی متناسب با تعداد و سایز سلول می‌شود.

شکل۳. شکل شماتیک از ساختار ابتدایی سیستم هیدرولیک در دستگاه‌های سل‌کانتر با روش امپدانس الکتریکی

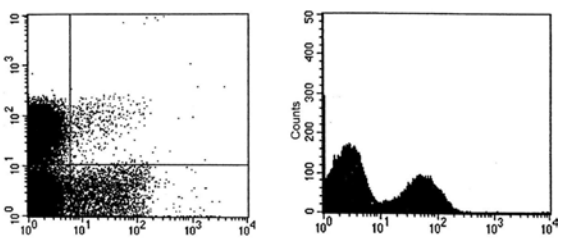


هنگامیکه یک سلول نیمه‌رسانا از منطقه حساس روزنه عبور می‌کند، باعث تغییر ولتاژ الکتریکی و ثابت دی‌الکتریک ناشی از آن شده و یک پالس و یا نوسان الکتریکی ایجاد می‌کند. تعداد پالس‌ها برابر با تعداد سلول‌های شمارش شده و مساحت زیر پالس متناسب با حجم سلول شمارش شده است که می‌توان آن را به صورت رابطه زیر بیان کرد (قانون اهم):

که در این رابطه، E – ولتاژ، R – مقاوت، I– جریان الکتریکی است. در این رابطه، چنانچه I ثابت باشد، تغییرات ولتاژ–E متناسب با حجم سلول–R خواهد بود. بنابراین هرگونه افزایشی در R متناسب با E و اندازه پالس ایجاد شده خواهد بود.

پالس‌های ایجاد شده در Aperture پس از ارزیابی و تصحیح توسط تیوب‌های فتومولتی‌پلایر–PMT تقویت شده و توسط یک موج نگار یا اسیلوسکوپ به شکل قابل مشاهده درمی‌آیند. همانطور که اشاره شد، بزرگی و پهنای این پالس‌ها متناسب با حجم سلول و تعداد آنها متناسب با تعداد سلول‌های عبوری در واحد زمان است. پالس‌های ایجاد شده بر مبنای بزرگی خود دسته‌بندی شده و میانگین نتایج حاصله به صورت یک نمودار توزیع فراوانی (هیستوگرام توزیع حجمی) ترسیم می‌شود. در این نمودار تعداد نسبی سلول‌ها در محور عمودی–Y و اندازه حجم آنها در محور افقی–X رسم می‌شود. بنابراین هیستوگرام مذکور، سلول‌ها را از نظر توزیع حجمی به تصویر می‌کشاند. آستانه‌های حجمی تعبیه شده برای هر نوع سلول، جمعیت‌های سلولی را در هیستوگرام‌ها از هم تفکیک کرده و شمارش سلولی بین پایین‌ترین و بالاترین آستانه هر جمعیت مشخص می‌شود. بدین ترتیب، با توجه به اختلاف حجم سلول‌ها، می‌توان علاوه بر شمارش تام، شمارش افتراقی آنها را هم به‌دست آورد که نتایج حاصله به شکل یک سری داده‌های عددی و یا نمودارهای سلولی ارائه می‌گردند. این نمودارها در واقع چگونگی توزیع حجمی سلول‌های مختلف خون را نشان می‌دهند و بدین ترتیب اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با شمارش کامل سلولی، اندازه متوسط سلولی (MCV و MPV) و چگونگی توزیع حجم سلول‌ها (RDW و PDW) حاصل می‌شود. نمودارهای سلولی می‌توانند به صورت هیستوگرام و یا سیتوگرام باشند. در هیستوگرام، نموداری زنگوله‌ای شکل نشان داده می‌شود که به عنوان مثال در هیستوگرام RBC، پیک نمودار، معادل میانگین اندازه همه‌ی سلول‌های شمارش شده، عرض و پهنای نمودار معادل آنیزوسیتوز و اختلاف اندازه‌ی اریتروسیت‌ها (RDW) و ارتفاع نمودار معادل فراوانی نسبی اریتروسیت‌ها محسوب می‌شود. برخلاف هیستوگرام، در نمودار سیتوگرام، هر سلول به صورت یک نقطه با مختصات X و Y نمایش داده می‌شود و مجموع اریتروسیت‌ها با توجه به اندازه (X) و میزان هموگلوبین خود (Y) در محور مختصات قرار می‌گیرند. البته لازم به ذکر است که سیتوگرام فقط در دستگاه‌های پیشرفته با پایه پراکنش نوری وجود داشته و دستگاه‌های امپدانس فاقد آن هستند.

شکل٤. نمودار هستوگرام (سمت راست) و سیتوگرام (سمت چپ).



سل‌کانترهای امپدانسی دارای دو چمبر جداگانه جهت شمارش سلول‌های خونی هستند که در یک چمبر به‌نام چمبر RBC/PLT شمارش اریتروسیت‌ها و پلاکت‌ها به صورت همزمان انجام شده و در چمبر دیگر بنام چمبر WBC/HGB شمارش تام و افتراقی لکوسیت‌ها و همچنین سنجش میزان هموگلوبین پس از تخریب اریتروستها توسط معرف‌های لیزکننده و درابکین صورت می‌گیرد. از آنجایی که به ازای هر ۷۰۰ اریتروسیت، حدود ۱ تا ۲ لکوسیت وجود دارد و از طرف دیگر چون رقت سلول‌ها در در چمبر اریتروسیتی تا ٦٢٥٠ هم می‌رسد، لذا شمارش لکوسیت‌ها در بین اریتروسیت‌ها اختلال و خطای چندانی را ایجاد نمی‌کند.

رقیق‌سازی خون طی یک تا سه مرحله انجام می‌شود به طوریکه خون در مرحله اول ۱ به ۱۲۵ با ایزوتون رقیق شده و مقداری از آن بعد از مخلوط شدن مجدد ۱ به ۱ با محلول درابکین و لایز که در مجموع ۱ به ۲۵۱ رقیق می‌شود، به چمبر

WBC/HGB رفته و مقدار دیگری از آن برای بار دوم تا ۵۰ برابر دیگر با ایزوتون رقیق شده (۱ به ٦٢٥٠) و به چمبر RBC/PLT می‌رود. درواقع نمونه خون کامل پس از مکش به داخل دستگاه با یک رقیق‌کننده ایزوتونیک مخلوط شده و به دو قسمت تقسیم می شود. اولین قسمت این خون پس از رقیق‌سازی مجدد به چمبر شمارش اریتروسیت-پلاکت رفته و قسمت دیگر آن پس از مخلوط شدن با معرف لیز کننده-درابکین به چمبر شمارش گلبول‌های سفید منتقل می‌شود. در این چمبرها بسته به نوع سل‌کانتر، هر سوسپانسیون سلولی یک بار و در برخی سل‌کانترها مثل کولتر، سه بار شمارش می‌شود. چنانچه سوسپانسیونی سه بار شمارش شود؛ هم‌خوانی حداقل دو پاسخ از سه پاسخ، جهت پذیرفته شدن پاسخ‌ها توسط پردازشگر دستگاه الزامی است. در چمبر شمارش لکوسیتی بسته به نوع دستگاه، حدود ۲۰ تا ۵۰ هزار گلبول سفید مورد ارزیابی و شمارش قرار می‌گیرد و سپس یک هیستوگرام لکوسیتی به همراه شمارش نسبی و مطلق هر یک از زیرگروه‌ها توسط دستگاه ارائه می‌شود.

در چمبر WBC/HGB علاوه بر Aperture، یک فتومتر با طول موج ٥٤٢ نانومتر نیز تعبیه شده است تا میزان نور جذبی توسط سیانومت‌هموگلوبین حاصل از واکنش هموگلوبین با محلول درابکین را هم اندازه‌گیری کند.

لیز اریتروسیت‌ها از سه جهت حائز اهمیت است:

۱- باعث آزاد شدن هموگلوبین داخل آنها می‌شود تا در حضور محلول درابکین به سیانومت‌هموگلوبین تبدیل شده و میزان جذب آن قرائت شود.

۲- لیز شدن و حذف اریتروسیت‌ها باعث حذف اثر تداخلی آنها در شمارش لکوسیت‌ها می‌شود.

۳- محلول لایز باعث لیز نسبی در لکوسیت‌ها نیز می‌شود، بطوریکه غشاء لکوسیت‌ها دچار منافذ ریزی شده و همانند بالن خالی شده‌ای برروی سطح هسته‌های خود می‌خوابد. بدین ترتیب لکوسیت‌ها برخلاف اریتروسیت‌ها و پلاکت‌ها بر اساس اندازه‌ی هسته‌ی خود و نه اندازه‌ی کل سلول، شناسایی می‌شوند.

طبق استاندارد سل‌کانترها، در چمبر RBC/PLT، پالس‌هایی با حجم زیر ۲fL به عنوان آشغال، پالس‌های ۲۰-۲ fL به عنوان پلاکت و پالس‌های ۳٦۰-۳٦ fL به عنوان گلبول قرمز در نظر گرفته می‌شوند. از طرف دیگر در چمبر WBC/HGB، پالس‌های ، پالس‌های ۹۰-۳۵ fL به عنوان سلول‌های کوچک (مثل لنفوسیت)، پالس‌های ۱٦۰-۹۰ fL به عنوان سلول‌های متوسط (مثل مونوسیت، بازوفیل و ...) و پالس‌های ٤٥٠-۱٦۰ fL به عنوان سلول‌های بزرگ (مثل نوتروفیل، ائوزینوفیل) درنظر گرفته می‌شوند.

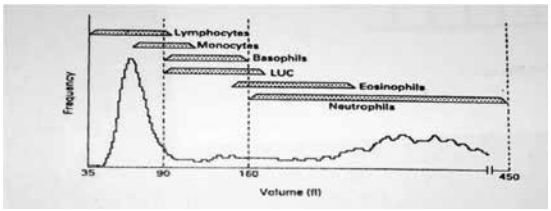
دستگاه‌هایی که به شیوه‌ی امپدانس عمل می‌کنند گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها را تنها بر اساس اختلاف در اندازه‌ی آنها شناسایی می‌کنند ولی چنانچه ذکر شد، در این روش لکوسیت‌ها در اندازه و شکل طبیعی خود ارزیابی نشده، بلکه پس از مجاورت با محلول لیزکننده شناسایی و دسته‌بندی می‌شوند. درواقع این محلول، با ایجاد منافذی در غشاء لکوسیت‌ها باعث از دست رفتن آب آنها و چروکیده شدن غشاء سلولی برروی هسته می‌شود. بنابراین در این سل‌کانترها، محلول لایز باعث لیز نسبی لکوسیت‌ها و لیز کامل اریتروسیت‌ها شده و پس از تاثیر محلول لایز، هسته لکوسیت‌ها به نسبت دانسیته کوچکتر شده و پس از جمع شدن غشاء سلولی روی هسته، سلولی حاصل می‌شود که اندازه‌ی آن متناسب با خصوصیات هسته هر گروه از گلبول‌های سفید خواهد بود. لازم به ذکر است که این اندازه‌ها الزاماً تناسبی با اندازه‌ی واقعی این سلول‌ها در لام خون محیطی ندارد.

در گستره خون محیطی رنگ‌آمیزی شده با گیسما، اندازه‌ی سلول‌ها در حالت طبیعی به ترتیب عبارتند از:

لنفوسیت (۱٤۰ – ۱۹۵ fL) < گرانولوسیت (۲۹۰-۲٤٥ fL) < منوسیت (۳۵۰-۳۰۰ fL) بوده درحالیکه پس از تاثیر معرف لایز، این ترتیب به صورت:

لنفوسیت (۹۵-۳۵ fL) < مونوسیت (۱۲۰-۸۰ fL)، بازوفیل (۱۵۰-۱۲۰ fL)، ائوزینوفیل (۱۸۰-۱٤۰ fL) < نوتروفیل (-۱٦۰ ٤٥٠ fL) در می‌آید. سلول‌های بلاست (LUC)، لنفوسیت‌های آتیپیک و گرانولوسیت‌های نارس (پرومیلوسیت، میلویست و متامیلوسیت) بیشتر در ناحیه میانی یا ناحیه مونوسیت قرار می‌گیرند اما بر اساس نوع دستگاه و جایگاه آستانه‌ی تشخیصی آن، ممکن است در نواحی سلول‌های بزرگ و سلول‌های کوچک نیز قرار بگیرند.

شکل۵. توزیع لکوسیت‌ها در هیستوگرام سه‌قسمتی



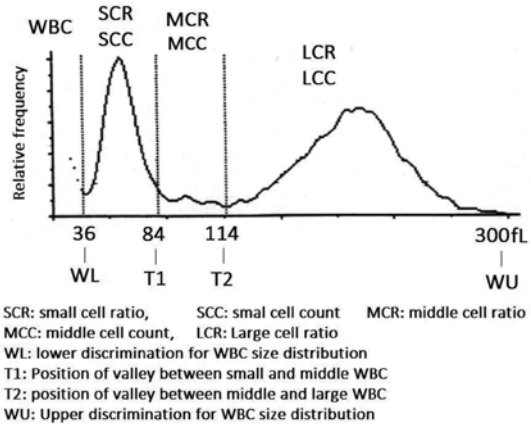
بنابراین لکوسیت‌ها پس از آنکه در حضور معرف‌های لیزکننده دست‌خوش تغییرات فوق شدند، به‌هنگام عبور از روزنه، متناسب با حجم‌شان باعث تغییر در هدایت الکتریکی روزنه شده و بدین ترتیب پالس‌های حاصل از آنها توسط آستانه‌های متمایز کننده (WL، T۱، T۲ و WU) از هم افتراق داده می‌شوند. در سل‌کانترهای سیسمکس، هیستوگرام سه‌قسمتی

لکوسیت‌ها تحت سه بخش Small cells (لنفوسیت‌ها)، Middle cells (ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها، مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌های آپیتیک و درصورت وجود سلول‌های بلاست، پرومیلوسیت، ملوسیت و پلاسماسل) و Large cells (نوتروفیل) نشان داده می‌شوند که ناحیه سلول‌های کوچک را با SCR یا SCC، ناحیه سلول‌های متوسط را با MCR یا MCC، ناحیه سلول‌های بزرگ را با LCR یا LCC، مرز بین MCR با SCR را با T۱ و مرز بین MCR با LCR را با T۲ نشان می‌دهند که ائوزینوفیل‌ها معمولاً در T۲ و بلاست‌ها و مونوسیت‌ها اغلب در T۱ مستقر می‌شوند. سلول‌های شمارش‌شده اگر مثلاً در مرز T۲ قرار بگیرند، دستگاه اخطار T۲ می‌دهد که می‌تواند دلیل بر وجود ائوزینوفیل باشد. WL مرز ابتدایی قابل شمارش برای لکوسیت‌ها و WU مرز انتهایی قابل شمارش برای لکوسیت‌ها می‌باشد.

ضریب همبستگی و هم‌خوانی در شمارش لنفوسیت‌ها به طریقه دستی و دستگاهی حدود ۸۵ درصد است که بیانگر آن است که شمارش لنفوسیت‌ها در دستگاه‌هایی که به روش امپدانس کار می‌کنند از دقت و تکرارپذیری خوبی برخوردار است. هرچند هم‌خوانی نسبتاً خوبی در شمارش نوتروفیل‌ها نیز دیده می‌شود ولی در ناحیه Mid cell هم‌خوانی خوب نبوده و سلول‌های مختلفی که از نظر امپدانس الکتریکی مثل هم عمل می‌کنند (مونوسیت،ائوزینوفیل و بازوفیل) در این ناحیه قرار می‌گیرند که افزایش این نوع سلول‌ها باعث هشدارهای T۱ یا T۲ می‌شود.

این نوع دستگاه‌ها از این جهت که قادرند لکوسیت‌ها را به سه دسته مجزا تقسیم کنند، تحت عنوان سل‌کانترهای سه قسمتی یا ۳Part شناخته می‌شوند.

شکل۶. توزیع لکوسیت‌ها در هیستوگرام سه‌قسمتی

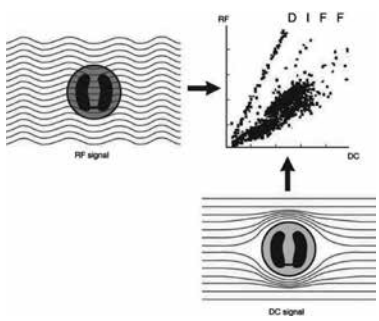


همان طوری که اشاره شد، سیستم‌های امپدانس ملاک اصلی از تفکیک و شمارش سلولی را در اندازه سلول قرار می‌دهند. از این رو گاهی آشغال و گرد و غبارهای بزرگ، وجود کاندیدیا- Candida و کریپتوکوکوس- Cryptococcus در خون، تکه‌های سیتوپلاسم لکوسیتی ناشی از شیمی‌درمانی لوسمی‌ها، شیستوسیت‌ها (یا قطعات حاصل از گلبول قرمز قطعه قطعه شده) و میکروسیت‌های بسیار کوچک نیز به عنوان پلاکت شمرده می‌شوند. همچنین در پدیده‌ی پلاکت‌های اقماری، پلاکت‌های متصل به لکوسیت در کل به عنوان یک لکوسیت شمرده شده و از تعداد پلاکت‌ها بطور کاذب کاسته می‌شود یا در پدیده‌ای دیگر، تجمعات بزرگ پلاکتی حاوی ۳۰ تا ۱۰۰ پلاکت در کل به عنوان یک لکوسیت شمرده شده و از تعداد پلاکت‌ها کاسته می‌شود. از طرفی دیگر گاهی اریتروسیت‌های حاوی انگل مالاریا نیز به عنوان لکوسیت (به ویژه ائوزینوفیل) شمارش می‌شوند.

در شماره بعد به بررسی عوامل موثر در شمارش سل‌کانترهای امپدانسی می‌پردازیم.

روش کاپاسیتانس (EC) یا روش رادیوفرکانس (RF)

همانطور که پیشتر اشاره شد، روش امپدانس الکتریکی تنها می‌تواند حجم کلی سلول‌ها را اندازه‌گیری کند. این روش از ارزیابی خصوصیات دیگر سلول نظیر تراکم هسته، گرانولاسیون سیتوپلاسمی و ... ناتوان است. در روش کاپاسیتانس الکتریکی که نخستین بار توسط شرکت سیسمکس ابداع شد، سیگنال‌های کاپاسیتانس الکتریکی نه‌تنها به حجم سلول، بلکه به محتویات داخلی سلول مثل هسته و گرانول‌ها نیز بستگی دارند. در این روش از یک جریان الکترومغناطیس با طول موج بالا (رادیوفرکانس یا RF) استفاده می‌شود. سلول‌های خونی به هنگام عبور از ناحیه حساس روزنه، باعث تغییر ظرفیت (کاپاسیتانس) الکتریکی این ناحیه می‌شوند که این تغییر متناسب با حجم سلول، تراکم و حجم هسته، نسبت هسته به سیتوپلاسم، گرانول‌های سیتوپلاسمی و به طور کلی محتویات داخل سلولی می‌باشد. این تغییر ایجاد یک پالس الکتریکی می‌کند که پس از تقویت، توسط اسیلوسکوپ بصورت قابل- مشاهده درمی‌آید. دستگاه‌های بر پایه کاپاسیتانس قادرند تفکیک ۵ قسمتی (۵Part) از لکوسیت‌ها داشته باشند.

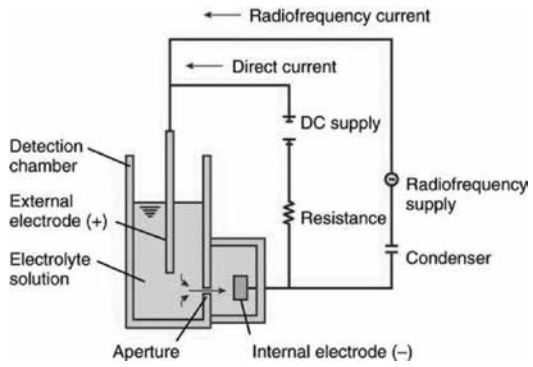


شکل۷. استفاده از امواج الکترومغناطیسی با طول موج بلند رادیوفرکانس جهت آنالیز سلول‌ها در دستگاه‌های سل‌کانتر بر پایه کاپاسیتانس الکتریکی

در روش کاپاسیتانس الکتریکی از یک الکترود پوشیده

از پلاستیک که از بیرون قابل مشاهده نیست، استفاده می‌شود. در حقیقت اختلاف اساسی دو روش کاپاسیتانس و امپدانس الکتریکی این است که در روش امپدانس، جریان مستقیم با ولتاژ پایین (DC) قابلیت عبور از غشاء سلولی را نداشته و درنتیجه تغییر مقاومت، متناسب با حجم سلول است. در حالی که فرکانس رادیویی (RF) که در روش کاپاسیتانس الکتریکی به‌کار گرفته شده است، می‌تواند از غشا و سیتوپلاسم سلول عبور کند ولی قدرت عبور از هسته را ندارد. بنابراین تغییراتی که توسط سلول در کاپاسیتانس الکتریکی حاصل می‌شود متناسب با حجم سلول و نیز محتویات داخلی سلول می‌باشد. امروزه تمامی دستگاه‌های شرکت سیسمکس از دو روش امپدانس و کاپاسیتانس الکتریکی به طور همزمان استفاده می‌کنند. از آنجا که اصول این دو روش مشابه است، بنابراین این نوع دستگاه‌ها نیز در کل جزء روش‌های امپدانس طبقه‌بندی می‌شوند.

شکل۸. استفاده از امواج الکترومغناطیسی با طول موج بلند رادیوفرکانس جهت



آنالیز سلول‌ها در دستگاه‌های سل‌کانتر بر پایه کاپاسیتانس الکتریکی

منابع

۱- کتاب فرآورده‌های بیولوژیک خون و داروهای بیولوژیک موثر بر خون، تالیف دکتر محمد ربانی، دکتر وجیهه اکبری، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲-کسری پورنگ، « شمارش و طبقه‌بندی سلول‌ها به روش اندازه گیری امپدانس »، پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی برق گرایش طراحی مدارات مجتمع آنالوگ، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر دانشگاه تبریز.

3-Bhardwaj, J., Ashraf, H. and McQuarrie, A. Dry Silicon Etching for MEMS. Symposium on Microstructures and Microfabricated Systems. May ٤-٩, Montreal, Canada.

٤-کتاب هماتولوژی سلولی و ملکولی تالیف دکتر نادر وظیفه‌شیران

5-Barbara J.Bain. Blood Cells: a Practical Guide. ٤th ed.

فرم اشتراک ماهنامه نشریه آزمایشگاهی ۱۳۹۶

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦ تکمیل تمام موارد فوق الزامی است ♦

اشتراک یکساله (با پست عادی)	۱،۰۸۰،۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی)	۵۰۰،۰۰۰ ریال
اشتراک یکساله (با پست سفارشی)	۱،۲۰۰،۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی)	۶۰۰،۰۰۰ ریال

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی - ۳۶ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به دفتر ماهنامه فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۹۱۵۲-۴۰۷۲-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸۴۲۳۴-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com نمابر: ۸۹۷۷۶۷۶۹ تلفن: ۰۹۱۲۷۳۳۳۴۰۷