مهندس احسان درخشان نیا

اصول سل‌کانترهای هماتولوژی(بخش سوم)
روش‌های اپتیکال شمارش سلولی

همانطور که اشاره شد، سل‌کانترهای هماتولوژی روش‌های نوری مختلفی را جهت شمارش‌های سلولی به‌کار می‌برد. از جمله این روش‌ها، تکنولوژی پردازش تصویر و تکنیک‌های MAPSS یا همان پراکنش نوری است که این روش در اغلب اوقات با رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی نیز همراه است. واژه MAPSS مخفف عبارت Multi Angle Polarized Scatter Separation (تفکیک چند زاویه‌ای پراکنش نور پلاریزه) است.

تکنولوژی پردازش تصویر

این تکنیک برای شمارش سلولی نبوده بلکه به صورت عمده برای تشخیص افتراقی سلول‌ها و به عبارتی دیف سلول‌ها استفاده می‌شود. در روش پردازش تصویر، عکس کامپیوتری هزاران سلول اریتروسیتی و لکوسیتی نرمال و غیرنرمال به حافظه کامپیوتر پردازش‌کننده داده می‌شود و دوربین دیجیتالی کامپیوتر نیز به میکروسکوپ متصل می‌شود. میکروسکوپ به صورت اتوماتیک تمام سطوح لام رنگ‌شده را بررسی کرده و تک‌تک سلول‌های لکوسیتی مشاهده شده را با داده‌های حافظه خود تطبیق داده و سلول‌ها را دیف می‌کند. این دستگاه‌ها سلول‌ها را از روی تصویر دسته‌بندی می‌کنند بدین ترتیب که اسلایدها پس از تهیه، رنگ‌آمیزی شده و روی صفحه موتوردار میکروسکوپ قرار می‌گیرد. یک رایانه عمل پویش اسلاید را کنترل کرده و هرگاه لکوسیتی در میدان قرار بگیرد، پویش را به طور موقت متوقف و سلول را آنالیز می‌کند. ویژگی‌های نوری سلول‌ها (مانند اندازه، تراکم، شکل و رنگ هسته و سیتوپلاسم) را دوربین ثبت کرده و رایانه با پردازش این اطلاعات، آنها را به ارقام تبدیل می‌کند. چنانچه این مشخصات با مشخصات مربوط به گونه‌ای از سلول‌های طبیعی مطابقت نداشته باشد، به عنوان سلول ناشناس یا متفاوت دسته‌بندی می‌شود. مشخصات سلول ناشناس در دستگاه محفوظ می‌ماند تا اینکه در پایان شمارش به صورت مستقیم و از روی تصویر گرفته شده، توسط تکنولوژیست شناسایی و طبقه‌بندی شود.

نخستین دستگاهی که این تکنیک را به‌خدمت گرفت آنالیزر LARC (کامپیوتر تشخیص اتوماتیک لکوسیت‌ها) بود. این دستگاه در سال ۱۹۷۲ توسط شرکت Corning ساخته شد و به صورت روتین در آزمایشگاه‌های پزشکی به‌کار گرفته شد. طی مدت کوتاهی آنالایزرهای Hematrak و Diff-۳ نیز در سال ۱۹۷٤ وارد بازار شدند. با خرید تکنولوژی ساخت Diff-۳ توسط شرکت کولتر و تغییراتی در آن، مدل‌های دیگری مانند Coulter Diff و Diff ۳۵۰ نیز در سال ۱۹۷٤ وارد بازار شدند. شرکت Abbott نیز در سال ۱۹۷۸ دستگاهی بنام ADC-۵۰۰ را وارد بازار کرد که مدتی بعد، از دور خارج شد. در حال حاضر دستگاه های Hematrak و Diff-۳ از سری آنالیزرهای مبتنی بر پردازش تصویر در آزمایشگاه‌ها وجود دارد. در مدل‌های آخر Hematrak مثل ٤٥٠QP، ٤٨٠و ٥٩٠ علاوه بر شمارش افتراقی لکوسیت، مورفولوژی اریتروسیت‌ها و تخمین تعداد پلاکت‌ها نیز به صورت تمام اتوماتیک میسر شده است. حتی در مدل Hematrak-٥٩٠ یک برنامه شمارش رتیکولوسیت نیز وجود دارد که شمارش رتیکولوسیت‌ها را از روی اسلاید خاص خود امکان‌پذیر می‌سازد. می‌توان گستره‌های رنگ‌شده با رنگ‌های سیتوشیمیایی و ایمونوسیتوشیمیایی را نیز توسط این دستگاه‌ها مورد ارزیابی قرار داد.

ایراد اصلی سیستم‌های مبتنی بر پردازش تصویر کُندی

عمل و شمارش تعداد کم سلول (حدود ۲۰۰ سلول) است، به‌طوری که می‌توان گفت در مقایسه با روش‌های دستی، تکرارپذیری و دقت آنها اندکی بیشتر است. این دستگاه‌ها به مرور زمان توسط سیستم‌های ارزان‌تر و مناسب‌تر جایگزین شدند. امروزه نسل جدیدی از این دستگاه‌ها به نام HemaCAM وارد بازار شده است که از سرعت بسیار مطلوبی برخوردار هستند.

شکل۱) HemaCAM

اساس روش‌های شمارش نوری

تکنولوژی الکترواپتیکال صرف نظر از روش خاص به‌کارگرفته شده، اساساً بر واکنش متقابل نور و ماده استوار است. هنگامی‌که یک پرتو نور به جسمی که دارای ضریب شکست یا دانسیته خاصی است، برخورد کند، چند حالت ممکن است برای آن اتفاق بیفتد:

۱- در همان زاویه تابیده شده بازتابش کند (Reflection).

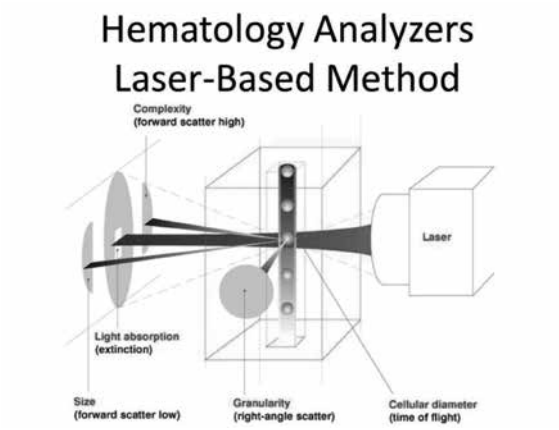
۲- تغییر جهت داده (Refraction) و یا در زاویه دیگری پراکنده شود (Diffraction).

۳- جذب ماده شده و به گرما تبدیل شود (Insorbtion).

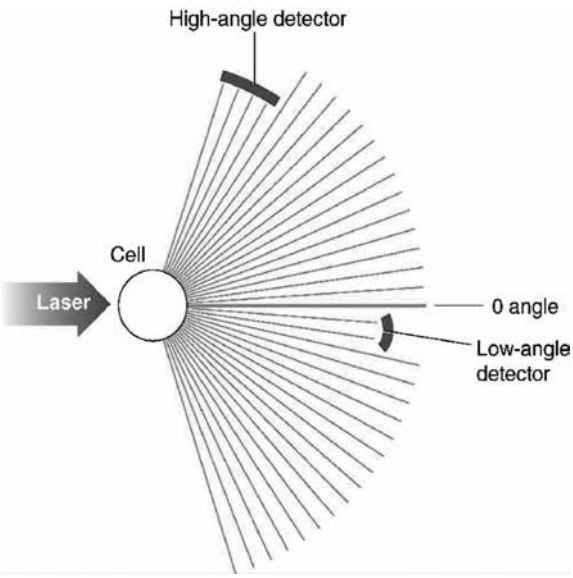
٤- جذب ماده شده و سپس با طول موج متفاوتی بازتابش شود (فلوئورسانس).

سل‌کانترهای مبتنی بر روش نوری ممکن است برخی از این حالت‌ها و یا ترکیبی از آنها را به کار گیرد که حالت فلئورسنت و پراکنش نور (انکسار) از اهمیت بالایی در روش‌های اپتیکال برخوردارند. منبع پرتوهای به کار گرفته شده در روش‌های نوری اغلب یک لامپ تنگستن-هالوژن و یا یک لیزر (نظیر لیزر نئون-هلیوم) است. از آنجا که پرتو لیزر در یک طول موج واحد تابش می‌شود، تحت عنوان پرتو مونوکروماتیک یا تک‌رنگ خوانده می‌شود. پرتوهای لیزر دارای حداقلِ واگرایی بوده و نوع، شدت و انسجام خاصی دارند که آن را از نور سفید متمایز می‌کند. چنین خصوصیاتی این پرتوها را جهت شمارش و یا افتراق انواع سلول‌ها مناسب ساخته است.

در این تکنولوژی، سلول‌هایِ خونیِ رقیق شده (سوسپانسیون سلولی) داخل جریانِ پیوسته‌ای از محلول الکترولیتی می‌شود. جریان پیوسته و غلافی‌شکل محلول الکترولیتی باعث هدایت و عبور سلول‌ها به صورت تک ردیفی از کانال فلوسل (معادل تمرکز هیدرودینامیک که در قسمت دوم از سری مقالات اصول سل‌کانترهای هماتولوژی در شماره قبل به آن پرداخته شد) می‌شود. در این کانال، سلول‌ها در محل خاصی از مقابل منبع نور پلاریزه عبور کرده و مورد مواجهه پرتوهای نوری (لیزری و غیرلیزری) این ناحیه قرار می‌گیرد. بسته به نور موجود و وضعیت سلول، نورِ برخورد کرده به سلول ممکن است جذب شود، برگشت پیدا کند (بازتابش) و یا در جهت‌های گوناگون (صفر درجه، ۲ تا ۳ درجه و ۹۰ درجه) پراکنده شود که در سیستم‌های مختلف برای هر مورد آشکارسازهای مناسبی تعبیه شده است. زاویه صفر(۰) درجه اغلب با اندازه سلول، زاویه ده(۱۰) درجه با ساختار و پیچیدگی سلول، زاویه نود(۹۰) درجه پلاریزه با لوبولاریتی هسته سلول و زاویه نود(۹۰) درجه دپلاریزه با میزان ائوزینوفیل خون ارتباط و همبستگی دارد. دستگاه، پراکنش‌های نوری را در دو زاویه رو به جلوی ۰ تا ۳ درجه(LA-FSC(FSS و ۵ تا ۱۵ درجه(HA-FSC(FLS و یک زاویه جانبی ۹۰درجه (SSC(SDS مورد ارزیابی قرار می‌دهد که LA-FSC یا همان LAFS برای ارزیابی سایز و حجم سلول، HA-FSC یا همان HAFS برای ارزیابی محتویات سلولی، گرانولیتی، هموگلوبین و پیچیدگی‌های درون سلولی و SSC/SDS برای ارزیابی لوبولاریتی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در برخی از دستگاه‌ها مانند Cell-dyne در مقابل پراکنش ۹۰ درجه SSC/SDS یک فیلتر پلاریزه نیز تعبیه شده است که فقط در مقابل ائوزینوفیل و شیزونت مالاریایی ایجاد نور دپلاریزه کرده و باعث شناسایی این دو سلول می‌شود. زاویه صفردرجه FSS اغلب محور Y و زوایای FLS و SSC اغلب دو محور X و Z نمودارهای سیتوگرام‌های سه‌بعدی را تشکیل می‌دهند.

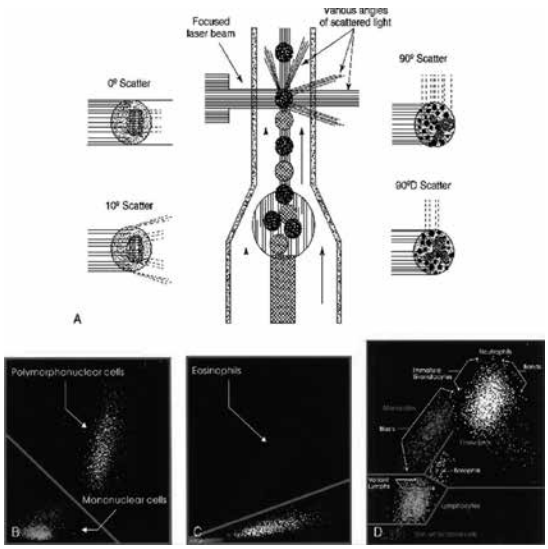


شکل۲. اساس کار سل‌کانترهای پایه پراکنش نوری که در آن سوسپانسیون سلولی رقیق‌شده حین عبور از مقابل نور لیزر براساس اندازه، پیچیدگی، لولاریتی، گرانولاسیون و غلظت هوگلوبین به چهار زاویه صفر، ۲ تا ۳، ۱۰ تا ۱۵ و ۹۰ درجه پراکنش پیداکرده و سلول‌ها از هم تفکیک داده می‌شود.



شکل۳. اساس کار سل‌کانترهای پایه پراکنش نوری که در آن سوسپانسیون سلولی رقیق‌شده حین عبور از مقابل نور لیزر براساس اندازه، پیچیدگی، لولاریتی، گرانولاسیون و غلظت هوگلوبین به چهار زاویه صفر، ۲ تا ۳، ۱۰ تا ۱۵ و ۹۰ درجه پراکنش پیداکرده و سلول‌ها از هم تفکیک داده می‌شود.

آشکارسازهای نوری که از نوع فتودیودها و یا لوله‌های فتومولتی‌پلایر(PMT) هستند عمل کاوش، آمپلی‌فیکاسیون و تبدیل پرتوهای پراکنده شده را به سیگنال‌های الکتریکی برعهده دارد. لنزهای این سیستم‌ها به گونه‌ای تعبیه شده که از ورود نورهای اضافی غیر از پرتوهای نوری پراکنده شده توسط سلول، به آشکارسازها جلوگیری می‌کند. یک‌سری از آینه‌ها و فیلترها نیز طول موج‌های مختلف نوری را از هم متمایز کرده و آنها را به آشکارسازهای نوری عرضه می‌کند. فتودیودها، فتون‌های نوری را به سیگنال‌های الکترونیکی که از نظر بزرگی متناسب با میزان نور جمع‌آوری شده است، تبدیل می‌کند. فتومولتی‌پلایرها به منظور جمع‌آوری و تقویت سیگنال‌های ضعیف‌تر (مثلا سیگنال‌های مربوط به زاویه ۹۰ درجه) تعبیه شده‌اند و مبدل‌های آنالوگ به دیجیتال نیز پالس‌های الکترونیکی حاصل را جهت آنالیز در سیستم CPU، به سیگنال‌های دیجیتالی تبدیل می‌کند. در نهایت CPU سیگنال‌های نهایی را پردازش و به سه صورت عددی، هیستوگرام و یا سیتوگرام در صفحه LCD یا در برگه‌های پرینت دستگاه نشان می‌دهد.



شکل۳. تکنیک MAPSS، خون بیمار در محلولی رقیق می‌شود که لکوسیت‌ها را به شکل تقریباً طبیعی نگه می‌دراد ولی اریتروسیت‌ها را نسبت به نور لیزر تراوا یا شفاف می‌سازد. سپس چهار اندازه‌گیری پراکنش نور به‌طور مشابه برروی هر لکوسیت انجام می‌گیرد. پراکنش نور به سمت جلو در زاویه صفر درجه، اندازه سلول را تعیین می‌کند. میزان پراکنش نور در زاویه‌ی باریک ۱۰ درجه متناسب با پیچیدگی سلول بوده. پراکش نور دپلاریزه در زاویه ۹۰ درجه برای شناسایی ائوزینوفیل‌ها نسبتاً اختصاصی عمل می‌کند و پراکنش نور ۹۰ درجه (ارتوگونال) سلول‌های گرانولار را جدا می‌کند که به لوبولاریتی معروف است. ترکیب‌های مختلف این چهار زاویه جهت شمارش افتراقی ۵-قسمتی یا ۵Part لکوسیت‌ها به‌کار گرفته می‌شوند.

همان طور که اشاره شد، پراکنش رو به جلوی نور در زاویه ۰ تا ۳ درجه (زاویه کوچک یا LAFS)، متناسب با حجم و اندازه‌ی سلولی، در زاویه ۵ تا ۱۵ درجه متناسب با گرانولیتی، درجه پیچیدگی (کمپلکسیتی) و شاخص انکسار درون سلولی (CHCM) و پراکنش ارتوگونال در

زاویه ۹۰ درجه یا پراکنش جانبی (SSC) که از شکست و بازتابش نور توسط ساختارهای بزرگ تر درون سلولی ناشی می‌شود، متناسب با لوبولاسیون هسته است. در سیستم‌های تکنیکون-بایر ترکیبی از پراکندگی نور در زاویه‌های کوچک و بزرگ در جهت آنالیز سلولی به‌کار گرفته شده است. با قرار دادن یکی از ویژگی‌های پراکنشی نور (ماند سایز سلول) در مقابل ویژگی دیگری از سلول (مانند لوبولاریتی، گرانولیتی/کمپلکسیتی و یا فعالیت میلوپراکسیدازی)، یک سری سیتوگرام‌ها یا پراکنش‌نگارهای دوبعدی (اسکاترگرام) حاصل می‌شود که آنالیز آنها اطلاعات کمی و کیفی مفیدی را به هماتولوژیست می‌دهد.

هنگامی‌که یک پرتو الکترومغناطیس تک رنگ با طول موج λ از محیط زمینه‌ای دارای ضریب شکست n است، عبور کرده و به سلولی که از نظر حجم، شکل و ضریب شکست به عنوان یک ذره هموژن یا یک‌دست درنظر گرفته می‌شود، برخورد کند، یک پرتو پراکنده یا منحرف شده ایجاد می کند که شدت آن با توجه به زاویه پراکنش متفاوت است. شدت پراکنش و زاویه‌های آن، تابعی از خصوصیات سلول متفرق کننده، به خصوص اندازه، شکل، چگالی و ضریب شکست آن است.

شاخص CHCM

به طورکلی سلولی که از غشا تشکیل شده و دارای سیتوپلاسمی مملو از پروتئین، الکترولیت و ارگانل‌های مختلف است، باعث انکسار یا شکست نور تابشی می‌شود که هر سلول با توجه به اجزای ساختاری خود دارای یک ضریب انکسار متفاوت است. اریتروسیت بالغ فاقد هسته و ارگانل‌های سیتوپلاسمی بوده، غشاء لیپیدی این سلول تقریباً ۷ نانومتر ضخامت داشته، سیتوپلاسم اریتروسیت هموژن بوده و حدود ۹۵درصد مواد سیتوپلاسمی آن را آب و هموگلوبین تشکیل می‌دهد و دارای ضریب انکسار تقریبی ۱.٤٦ است. با توجه به این داده‌ها، هر گلبول قرمز را می‌توان یک محلول آبکی یکنواخت دانست که میزان ضریب شکست نور در آن از یک سلول به سلول دیگر فقط تحت تاثیر شکل سلول و میزان هموگلوبین آن قرار دارد. با کروی ساختن این سلول‌ها توسط برخی مواد شیمیایی، تفاوت آنها در مورفولوژی از بین رفته و همه RBCها کروی می‌شود، از این رو میزان MCHC و غلظت هموگلوبین هر RBC مهم ترین عامل در ضریب انکسار داخلی آن سلول خواهد بود.

دستگاه‌های اپتیکال بر خلاف دستگاه‌های امپدانس، میزان شکست نور RBCها در زاویه ۵ تا ۱۵ درجه‌ی HAFSC را به طور مستقیم به عنوان MCHC سلولی در نظر می‌گیرند و مثل دستگاه‌های امپدانسی MCHC را از طریق نسبت هموگلوبین به هماتوکریت محاسبه نمی‌کنند. بنابراین به دلیل محاسبه مستقیم MCHC و به منظور مشخص ساختن روش محاسبه آن و تفکیک آن از MCHC معمولی، نگارش MCHC مستقیم و اوپتیکال را به صورت معکوس و به صورت CHCM می‌نویسند. بدین صورت، هر اریتروسیت که از فلوسل می‌گذرد، مانند یک کوت عمل کرده و جهت دو پارامتر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد:

۱- میزان هموگلوبین یا دانسیته سلولی

۲- اندازه سلولی

لازم به ذکر است که سل‌کانترهای جدید که بر پایه VCS هستند هر سه روش امپدانس، کاپاسیتانس و MAPSS را همزمان مورد استفاده قرار می‌دهند و از این رو هردوی MCHC و CHCM را گزارش می‌کنند.

در غالب سل‌کانترهای اوپتیکال، RBCها نخست توسط موادی چون سدیم دودسیل سولفات (SDS) و فرمالین به شکل کروی درآمده و در این شکل فیکس می‌شود تا تمامی زوایای آن هم‌شکل شده و شکل مقعر از هر طرف و دیسکوسیدی آنها به جای غلظت MCHC آنها، باعث تغییر پراکنش نور نشود. در مورد لکوسیت‌ها گرانول‌های سیتوپلاسمی نیز ضریب انکسار سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مثلاً درمورد دو سلول نوتروفیل و ائوزینوفیل که حجم تقریباً مشابهی در گردش خون دارند، حجم نوتروفیل در سیستم های پراکنش نور بزرگ تر از ائوزینوفیل ظاهر می‌شود. بنابراین روش‌های نوری برای تعیین اندازه‌ی لکوسیت‌ها، به تنهایی چندان مناسب نبوده و اغلب در دستگاه‌های جدید توسط هر دو روش امپدانس و اوپتیکال ارزیابی می‌شود. به طور کلی لکوسیت‌ها از طریق ویژگی‌هایی چون اندازه‌ی سلولی، شدت گرانولیتی، رنگ پذیری گرانول‌های سیتوپلاسمی و لوبولاریته هسته شمارش تفکیک می‌شود. این نوع از سل‌کانترها از این جهت که قارند با ترکیب چهار زاویه پراکنشی، بین لکوسیت‌ها، تشخیص افتراقی ۵ قسمتی انجام بدهند، به سل‌کانترهای ٥PART معروفند که با به کارگیری برخی از تکنیک‌های دیگر می‌توانند تا ٦PART یا ٧PART نیز ارتقا پیدا کنند.

با پیشرفت دستگاه‌های فلوسایتومتری که درواقع سل‌کانترهای اوپتیکال هماتولوژی نیز جزئی از آنها هستند، پرتوهای منوکروماتیک لیزری گوناگونی به کار گرفته شدند. عمده‌ترین لیزرهای سازگار شده جهت روش‌های فلوسیتومتری شامل لیزر نور آرگون (٤٨٨ و ٥٢٠ نانومتر)، یون کریپتون (٥٢٠ و ٦٤٧ نانومتر)، لیزرز هلیم-نئون (٦٣٣ نانومتر) و لیزر هلیوم کادمیون (٤١١ نانومتر و UV) هستند. پیشرفت در به کارگیری منابع مختلف لیزری باعث طراحی سل‌کانترهایی شده که در آنها قابلیت کاربردی، ضریب اطمینان و هزینه تمام شده بهبود یافته است. از جمله لیزرهایی که به طور گسترده در آنالیزرهای هماتولوژی به کار گرفته می‌شود، لیزر نیمه هادی سرخ و لیزر نیمه هادی آبی است. در آنالیزر سیسمکس R-١٠٠٠ (برای شمارش رتیکولوسیت) لیزر یون آرگون با طول موج ٤٨٨ نانومتر و توان خروجی ٧.٥ میلی‌وات به همراه رنگ فلوئورکروم اورامین به کار گرفته شده‌است، بدین ترتیب اندازه سلول‌ها با استفاده از پراکنش نور FSC و محتویات سلول (یعنی RNAی رتیکولوسیت) با فلوئورسانس و پراکنش نور جانبی SSC مشخص می‌شود.

محدودیت‌های روش اوپتیکال

این محدودیت‌ها را می‌توان بر اساس دو پارامتر حساسیت و وضوح در نظر گرفت. حساسیت تکنولوژی اوپتیکال برحسب دو متغیر

١- شدت تغییر

٢- واکنش متقابل سیستم به این تغییر

تعریف می‌شود. این حساسیت تحت تاثیر عاملی نظیر میزان نویز الکتریکی و نیز محدودیت ناشی از شدت نور قرار دارد. البته یک محدودیت اساسی دیگر نیز در حساسیت سیستم های اوپتیکال وجود دارد که از حرکات براونی ملکول‌های مایع رقیق‌کننده ناشی می‌شود. این حرکات باعث ایجاد یکسری تغییرات تصادفی در دانسیته مایع می‌شود که میزان اثرا آن معادل پراکنش نور شیئی به قطر ٠.١ میکرومتر است. مسئله دیگر وضوح یک سیستم نوری است. میزان وضوح از طریق حجم دید- View Volumeتوصیف می‌شود. حجم دید در واقع یک بعد فیزیکی است که در آن واکنش متقابل بین نور و ماده احساس می‌شود و می‌توان با متمرکز کردن پرتو نوری و یا قرار دادن یک روزنه جلوی آشکارساز آن را تعیین کرد.

یکی دیگر از محدودیت‌های سیستم‌های اوپتیکال این است که تمامی سلول‌های خونی دارای ضریب شکست یکسان نیست، بنابراین نمی‌توان برای تمامی آنها از یک ضریب کالیبراسیون استفاده کرد. همچنین در این سیستم‌ها فرض براین است که سلول‌ها هموژن و یک‌دست هستند. این مطلب تقریباً درمورد گلبول‌های قرمز صادق است ولی برای گلبول‌های سفید که ساختار درونی آنها متفاوت بوده و ضریب شکست‌های متفاوتی دارند، صدق نمی‌کند. بنابراین روش‌های نوری برای تعیین اندازه گلبول‌های سفید چندان مناسب نیستند و برای تعیین اندازه‌ی گلبول‌های قرمز نیز به دلیل متفاوت بودن اشکال آنها و تفاوت در میزان هموگلوبین، محدودیت‌هایی دارد. لذا جهت حل این مشکل، گلبول‌های قرمز را توسط محلول‌های شیمیایی خاص مانند SDS به شکل کروی درآورده و توسط پارافرم‌آلدهید نیز فیکس می‌کنند.

از محدودیت‌های دیگر این روش، اختلال در تشخیص سلول‌های خونی در نمونه‌های کهنه‌ای است که بیش از ٨ تا ١٢ ساعت از نمونه‌گیری آن گذشته باشد. این محدودیت در شرایط نگهداری در دمای ٤ تا ٦ درجه یخچال نیز پایدار بوده و رفع نمی‌شود، لذا توصیه بر این است که همواره از نمونه خون تازه تهیه شده برای این نوع از دستگاه‌ها استفاده شود. این محدودیت باعث می‌شود تا استفاده از خون کنترل نیز برای این نوع از دستگاه‌ها بسیار سخت و گران‌قیمت باشد.

استفاده از خاصیت جذب نور توسط سلول

علاوه بر پراکندگی، بخشی از نوری که به سلول یا ذره می‌تابد، می‌تواند در طول موج‌های خاصی جذب شود. سیستم های اپتیکال به این جزء از نور نیز حساس بوده و می‌توانند آن را مورد ارزیابی و سنجش قرار دهند. درواقع جهت تقویت و افزایش این میزان جذب، درمدل‌های مختف سیستم‌های اپتیکال، سلول‌ها به روش‌های مختلفی نیز رنگ آمیزی می‌شود. مثلاً:

- رنگ‌آمیزی گرانول‌های آزور (حاوی آنزیم میلو پراکسیداز) نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها توسط آب اکسیژنه و ٤-کلر-١-نفتول که در کانال پراکسیداز سیستم‌های H١، H٦٠٠٠، و سری‌های جدید Advia انجام می‌گیرد.
- رنگ‌آمیزی منوسیت‌ها با استفاده از فعالیت آلفا نفتیل بوتیرات‌استراز (ANBE)

- رنگ‌آمیزی گرانول‌های حاوی هپارین بازوفیل‌ها توسط آلیسان‌بلو و یا استرابلو که در کانال بازوفیل سیستم H٦٠٠٠ انجام می‌گیرد.
- رنگ‌آمیزی گرانول‌های لیزوزومی مونوسیت، نوتروفیل و آزینوفیل توسط رنگ حیاتی کلرازول‌سیاه که در سیستم‌های کولتر odiff انجام می‌گیرد.

لکوسیت‌ها پس از رنگ‌آمیزی در کانال‌های مختلف با قرار گرفتن در جریان سلولی فلوسل، مورد تابش پرتوهای نور لیزر قرار می‌گیرند. با استفاده از یک آشکارساز زمینه تاریک که به پراکنش نور حساس است، اندازه سلولی و با استفاده از یک آشکارساز زمینه روشن که به تراکم رنگ حساس است، میزان جذب نوری این سلول‌ها که با رنگ‌پذیری سلول نسبت مستقیم و با میزان بازتابشِ نورِ برخورد کرده به سلول نسبت عکس دارد، اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین هر سلول مانند یک نقطه با مختصات X (میزان رنگ پذیری) و Y (اندازه سلول) است. سلول‌ها یا نقطه‌هایی که دارای خصوصیات مشابه هستند به صورت توده یا کلاستر در محل‌های خاص خود قرار می‌گیرد که برخی از نرم‌افزار ها قادرند آنها را با رنگ‌های مختلف و متمایز نشان دهند. به کلاسترهای حاصل از سلول‌های مختلف که در یک محور مختصات، سایز (Y) و شدت پراکسیدازی (X) متفاوت دارند یک سیتوگرام گفته می‌شود.

استفاده همزمان از رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی و پراکنش نوری توسط شرکت تکنیکون و با همکاری پژوهشگران دانشکده پزشکی دانشگاه مونت‌سینا- Mount Sinai School of Medicine توسعه پیدا کرد. دو تن از پژوهشگران این مرکز با نام‌های آنسلی و اورنستین، روش دسته بندی سلول‌ها بر اساس ویژگی‌های سیتوشیمیایی آنها را توصیف کردند. براین اساس، نخستین سل‌کانتر شمارش افتراقی، هولوگD بود که در سال ١٩٧٤ به صورت تجاری وارد بازار شد. در این سل‌کانتر، سلول‌ها در سه کانال مختلف شمارش و دسته‌بندی می‌شود:

١- در کانال اول (کانال پراکسیداز)، که برپایه‌ی یک واکنش آنزیمی، میلوپراکسیداز موجود در گرانول‌های آزور لکوسیت‌ها را از طریق سوبسترای کلرونفتول و در دمای ٧٥ درجه سانتی‌گراد رنگ می‌کند (رنگ خاکستری)، سلول‌ها توسط میزان جذب نوری و پراکنش FSC مورد شناسایی قرار می‌گیرند. اختلاف در اندازه سلولی و میزان رنگ پذیری سلول‌ها در این کانال، دسته‌بندی و شمارش سلول‌های ائوزینوفیل، نوتروفیل، نوتروفیل، مونوسیت، بلاست و لنفوسیت را در ٥ پارت امکان‌پذیر می‌سازد.

٢- در کانال دوم (کانال لیپاز) که موازی کانال اول است، استراز غیراختصاصی داخل سلولی به منظور تشخیص اختصاصی مونوسیت‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. سوبسترای این واکنش آنزیمی، آلفا نفتول بوتیرات استراز (ANBE) است که در یک PH خاص امکان رنگ‌آمیزی مناسب مونوسیت‌ها را فراهم می‌سازد.

٣- سومین کانال (کانال بازوفیل)، شمارش اختصاصی بازوفیل‌ها را براساس واکنش غیرآنزیمی هپارین موجود در گرانول‌های این دسته از سلول‌ها با رنگ آلسین‌بلو را امکان‌پذیر می‌سازد.

نمونه‌برداری در سیستم همولوگD به‌طور خودکار انجام شده و سرعت عملکرد آن ٦٠ نمونه CBC در ساعت است. در این سیستم، هر یک از کانال‌ها حدود ١٠هزار سلول را شناسایی و دسته‌بندی می‌کنند و به همین دلیل دستگاه از تکرارپذیری بسیار خوبی برخوردار است. همولوگD با تمام مزایا و پیشرفت‌ها، دارای محدودیت‌هایی نیز بود که از جمله آنها می‌توان به مواردی از جمله هزینه بسیار بالای تمام شده برای هر تست، رنگ‌های گران‌قیمت، نیاز مداوم به بررسی‌های مورفولوژیکی گلبول‌های قرمز و نمونه‌های غیرطبیعی و نیز ثبت نتایج حاصله به روش دستی در برگه گزارش بیمار اشاره کرد. این دستگاه اکنون تولید نمی‌شود و جای خود را به سری‌های H و Advia داده است.

تلاش مداوم کمپانی تکنیکون برای ارتقای مزایای آنالیزر، در مرحله اول منجر به افزایش عملکرد دستگاه شد. مثلا سیستم همولوگ ٩٠-D که در سال ١٩٨٧ ساخته شد، دارای سرعتی معادل ٩٠ نمونه در ساعت بود. امکان بعدی این کمپانی تلفیق سل‌کانترهای همولوگ VIII با همولوگ D و ساخت یک آنالیزر چند پارامتری پیشرفته بود. سل‌کانتر همولوگ VIII می‌توانست ٨ پارامتر اصلی CBC را اندازه‌گیری و محاسبه کند. به دلیل تلفیق این دو سیستم، نخستین نمونه از آنالایزرهای چند پارامتری مدرن که در آنها شمارش سلول‌ها به همراه شمارش افتراقی و اتوماتیک لکوسیت‌ها انجام می‌گرفت، پا به عرصه وجود نهاد. نخستین نمونه از این سیستم‌ها تکنیکون H٦٠٠٠ بود که در سال ١٩٨١ ساخته شد. در این دستگاه از دو

رنگ‌آمیزی پراکسیداز و استرابلو جهت شمارش افتراقی پنج قسمتی لکوسیت‌ها استفاده می‌شد. در سال ۱۹۸۵ سیستم تکنیکون H1 ساخته شد که رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی آن تنها محدود به پراکسیداز بود. در این دستگاه شمارش افتراقی لکوسیت‌ها بر پایه اطلاعات حاصل از کانال پراکسیداز و کانال بازوفیل–لوبولاریتی انجام می‌گیرد. به تدریج مدل‌های H2، H3، Adiva 120 و Adiva 2120 نیز توسط تکنیکون ساخته شدند. در سه آنالایزر اخیر، یعنی tec H3، Adiva 120 و Adiva 2120 شمارش رتیکولوسیت ها و تعیین پارامترهای رتیکولوسیتی نیز امکان پذیر شده است.

همزمان و همگام با پیشرفت‌های که در دستگاه‌های اپتیکال صورت می‌گرفت، روش امپدانسی نیز از غافله عقب نمانده و به تدریج پیشرفته‌تر شد. در این تکامل نقش معرف‌های لیزکننده کاملاً مهم و چشم‌گیر بوده است. نخستین معرف لیزکننده‌ای که جهت شمارش افتراقی لکوسیت‌ها توسط روش‌های امپدانسی به کار گرفته شد، ساپونین بود. این محلول یک افتراق دو قسمتی از لکوسیت‌ها (لنفوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها) را فراهم می‌ساخت. با تغییراتی که در محلول‌های لیزکننده انجام گرفت رفته‌رفته شمارش افتراقی سه قسمتی و پنج قسمتی لکوسیت‌ها نیز امکان‌پذیر شد. در آنالیزرهای ساخت شرکت کولتر، دستگاه کولتر S-PlusIV نخستین آنالایزری بود که شمارش افتراقی سه قسمتی لکوسیت‌ها را انجام می‌داد. درواقع لیزکننده‌هایی که دارای ویژگی‌های خاصی هستند (مثل محلول فلوکسین که برای شمارش اختصاصی ائوزینوفیل به‌کار می‌رود)، شمارش افتراقی ٤ تا ٥ قسمتی لکوسیت‌ها را نیز با این روش فراهم می‌سازد. به عنوان مثال در آنالایزرهای سیسمکس سری NE و سری SE با استفاده از یک معرفی قلیایی خاص شمارش افتراقی ائوزینوفیل‌ها و با استفاده از یک معرف اسیدی خاص شمارش افتراقی بازوفیل‌ها حاصل می‌شود.

برخی از منابع

۱– کتاب هماتولوژی سلولی و ملکولی تالیف دکتر نادر وظیفه‌شیران

۲– کتاب اصول فیزیکی دستگاه‌های آزمایشگاهی تالیف دکتر داریوش شهبازی گهرویی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

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

٤– 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.

۵– عرفان دژآگاه، «بازشناسی خودکار گلبول‌های سفید خون با استفاده از تصاویر میکروسکوپی»، پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی برق–الکترونیک، دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی.

6- Bhardwaj, J., Ashraf, H. and McQuarrie, A. Dry Silicon Etching for MEMS. Symposium on Microstructures and Microfabricated Systems. May 4-9, Montreal, Canada.

7-Barbara J.Bain. Blood Cells: a Practical Guide. 4th ed.

8-Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus MD PhD- Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition -Saunders (2011)

از هم اکنون به کانال تلگرامی و اینستاگرام
ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی بپیوندید

@Tashkhis_Magazine

Tashkhis_Magazine