مهندس احسان درخشان نیا

# اصول سل‌کانترهای هماتولوژی(بخش۴)

**در سه شماره قبل اصول سل‌کانترهای هماتولوژی بررسی شد و درخصوص مواردی چون اساس کار سل‌کانترها، تکنولوژی به کار رفته در آنها، عوامل موثر در شمارش سل‌کانترها و ... سخن به میان آمد. این شماره اختصاص دارد به بررسی نسل‌های مختلف این دستگاه‌ها. تاکنون پنج نسل از سل‌کانترها طراحی و به بازار آمده‌اند که در ادامه به آنها می‌پردازیم.**

### نسل اول

نسل اول سل‌کانترها قادر بودند تا فقط اریتروسیت‌ها را شمارش کنند. در حال حاضر کولتر مدل BIz که آنالیزری تک کاناله محسوب شده و نیاز به کالیبراسیون ندارد از طرف کمیته بین‌المللی استانداردسازی هماتولوژی به عنوان روش مرجع جهت شمارش‌های تک‌سلولی معرفی شده است (شکل ۱).

شکل۱. دستگاه کولتر مدل ZBI

اساس این نوع سل‌کانترها درواقع امپدانس یا مقاومت الکتریکی بوده و سلول‌های خونی (بدون افتراق نوع آنها) که در مقایسه با محلول ایزوتون از نظر هدایت الکتریکی ضعیف‌تر هستند، به هنگام گذر از اپرچور چمبر شمارش، مقاومت الکتریکی آن را افزایش داده و یک پالس الکتریکی متناسب با تعداد سلول ایجاد می‌کنند.

### نسل دوم

این نوع سل‌کانترها علاوه بر RBC قادر بودند تا WBC را نیز شمارش کنند و در حقیقت دستگاه‌های دو پارامتری بودند که از آن جمله می‌توان به کولتر A شرکت کولتر (شکل۲) و MCC (میکرو سل‌کانتر) شرکت TOA اشاره کرد.

شکل۲. دستگاه کولتر مدل A

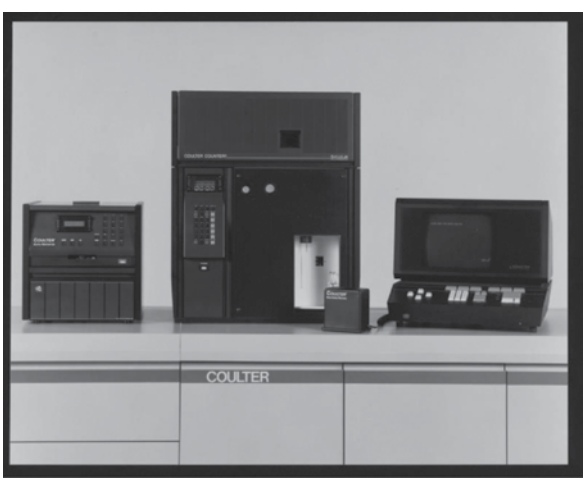
### نسل سوم

این نوع از سل‌کانترها قادر بودند هفت پارامتر از اندکس‌های تست CBC یعنی WBC، RBC، Hgb، Hct، MCV، MCH، MCHC را اندازه‌گیری کنند ولی قادر به گزارش تعداد پلاکت نبودند. از این دسته می‌توان به کولتر S (شکل۳) و سیسمکس CC۷۵۰ اشاره کرد.

شکل۳.دستگاه کولتر مدل S

### نسل چهارم

این نوع سل‌کانترها قادر بودند تا هر ۸ پارامتر اصلی CBC و از جمله تعداد پلاکت را اندازه‌گیری کنند. از این دسته می‌توان به Tec-Homolog VIII ساخت ۱۹۷۰، کولتر S-Plus و s-plus II ساخت ۱۹۸۰ اشاره کرد که s-plus II علاوه بر پارامترهای ۸گانه، قادر بود RDW و MPV را نیز اندازه‌گیری کند (شکل٤).




شکل٤. دستگاه کولتر مدلs-plus II

### نسل پنجم

این نوع از سل‌کانترها علاوه بر شمارش سلولی قادر به شمارش افتراقی لکوسیت‌ها نیز هستند که ادامه این نسل تاکنون نیز در حال طراحی و ساخت است. به این نسل، دستگاه‌هایDLC نیز گفته می‌شود که مخفف Differential Leukocyte Count است. از جمله این دستگاه‌ها می‌توان به سل‌کانترهای جدید Sysmex، Culter، Technicon، Abott و ... اشاره کرد. در این دستگاه‌ها اغلب از ترکیب چند روش امپدانسی، کاپاسیتانس و پراکنش نوری و همچنین تکنیک‌های فلورسنس و رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی (آنزیمی و یا غیرآنزیمی) به همراه سیستم فلوسل استفاده می‌شود.

شمارش افتراقی لکوسیت‌ها به شیوه‌ی اتوماتیک باید موارد زیر را دربرگیرد:

- توزیع فراوانی سلول‌های مورد برررسی باید با توزیع آنها در خون همسان باشد.
- تمام لکوسیت‌هایی که معمولا در بیماری‌های خونی یافت می‌شود، باید دقیقاً شناسایی و به طریقی هشداردهی شود.
- دستگاه باید مقرون به صرفه باشد.
- به منظور کاهش خطای آماری، روند شمارش می‌بایست به گونه‌ای باشد که در هر بار شمارش دستگاهی، تعداد زیادی از سلول‌ها شمارش شود.

تا اوایل سال ۱۹۷۰ تنها روش پذیرفته شده جهت شمارش افتراقی لکوسیت‌ها، آزمون میکروسکوپی گسترده خون رنگ آمیزی شده توسط رنگ‌های رومانوفسکی(Rommanowsky Stain) بود تا اینکه رقابت بین شرکت‌های سازنده سل‌کانتر به پدید آمدن سل‌کانترهای اتوماتیکِ چند پارامتری هماتولوژی که در عین حال قادر به شمارش افتراقی زیرگروه‌های لکوسیتی نیز بودند، منجر شد.

تلاش برای اتوماسیون سل‌کانترها نیز با ورود تکنولوژی آنالیز و پردازش تصویر، اختراع سیستم تمرکز هیدرودینامیک فلوسل، لیزرهای چند رنگی و ربات‌های مکانیک الکترونیکی در سال ۱۹٦۰ آغاز شد و بدین ترتیب راه برای ساخت سل‌کانترهای نسل ششم فراهم شد.

### نسل ششم

نسل ششم سل‌کانترها درحقیقت دستگاه‌های فلوسایتومتری است که فرم پیشرفته دستگاه‌های سل‌کانتر اوپتیکال محسوب شده و قادرند سلول‌های مختلف را بر اساس اینکه هر سلولی CD مارکرهای خاصی را در سیتوپلاسم، هسته، یا سطح غشاء خود بیان می‌کنند، مورد شناسایی قرار دهند. برای این منظور از آنتی‌بادی‌های

مونوکلونال تجاری ضد هرکدام از مارکرهای سلولی که توسط ملکول‌های فلورسنت نشان‌دار شده‌اند، استفاده می‌شود. برای شناسایی این سلول‌ها نیز از نور لیزر و تکنیک مشابه ایمونوفلورسنت استفاده می‌شود.

### اساس کار سل‌کانترهای 6Part و 7Part

این نوع سل‌کانترها بر مبنای توانایی آنها برای افتراق اختصاصی ائوزینوفیل و بازوفیل طراحی و ساخته شده‌اند که درصورت شناسایی یکی از آنها، اصطلاح 6Part و درصورت شناسایی اختصاصی هردو، اصطلاح ۷part به کار می‌رود. در سل‌کانترهای اوپتیکال هماتولوژی یکی از روش‌های افتراق زیرگروه‌های مختلف لکوسیتی، استفاده از معرف‌های با pHهای مختلف است. مثلا در کانال پراکسیداز همولوگD، با استفاده از رنگ پراکسیداز با pH اسیدی ائوزینوفیل‌ها شدیدتر از نوتروفیل‌ها رنگ می‌گیرد و به دلیل جذب نوری بیشتر و پراکنش کمتر، از نوتروفیل‌ها متمایز شده و در سمت راست‌تر ولی پایین‌تر سیتوگرام قرار می‌گیرد. در برخی سیستم‌ها مانند $H_1$ جهت کاهش زمان لازم برای انجام واکنش‌های سیتوشیمیایی، دمای واکنش را بالاتر برده و مثلا به ۷۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسانند. در سیسمکس SE-9000 هم که براساس امپدانس الکتریکی عمل می‌کند در کانال آشکارساز ائوزینوفیلی یک معرف قلیایی ویژه مانند محلول فلوکسین به کار گرفته می‌شود که می‌تواند اریتروسیت‌ها را به طور کامل و لکوسیت‌ها را به استثنای ائوزینوفیل‌ها، لیز و مچاله کند سپس با استفاده از جریان مستقیم (DC) در این کانال، شمارش سلولی و نمودار توزیع حجم سلولی (هیستوگرام سلولی) ائوزینوفیل‌ها به دست می‌آید. بدین ترتیب شمارش اختصاصی ائوزینوفیل‌ها به شکل دقیقی فراهم می‌شود.

کانال آشکارساز بازوفیل در دستگاه‌های تکنیکون H۱ نیز بر همین اساس عمل می‌نماید ولی معرف لیزکننده آنها اسیدی است که در pH اسیدی تمامی اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌ها به جز بازوفیل دچار لیز شده و درنتیجه امکان شمارش اختصاصی و مجزای بازوفیل فراهم می‌شود. برای لیز کامل لکوسیت‌ها زمانی ۳دقیقه‌ای لازم است که دستگاه در زمان دو دقیقه و قبل از لیزکامل لکوسیت‌ها که در این زمان فقط هسته‌های لوبوله و غیر لوبوله لکوسیت‌ها باقی می‌ماند، یک ارزیابی از شمارش سلول‌های تک‌هسته‌ای و چندهسته‌ای انجام می‌دهد. در این کانال لکوسیت‌ها بر اساس لوبولاریتی و تعداد لوب‌های هسته‌ی خود به دو دسته‌ی MNCها در چپ و PMNها در سمت راست تقسیم می‌شود که به نسبت سلول‌های PMN:MNC اندکس LI گفته می‌شود.

### شمارش افتراقی توسعه یافته لکوسیت‌ها

یک مرحله دیگر در روند تکامل تدریجی سل‌کانترهای هماتولوژی جایگزین شدن سیستم‌های هشدار دهنده اعلام حضور سلول‌های غیرطبیعی و شمارش واقعی آنها است که تحت عنوان شمارش افتراقی توسعه یافته (EDC) خوانده می‌شود. EDC انواع سلول‌های خونی غیر از پنج زیرگروه طبیعی گلبول‌های سفید را شامل می‌شود. در حقیقت شمارش افتراقی EDC، خواستار شمارش سلول‌های غیرطبیعی نظیر گرانولوسیت‌های نارس (IMI)، لنفوسیت‌های آتیپیک (واریانت)، سلول‌های بلاست، سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز و گلبول‌های قرمز هسته‌دار است که به‌عنوان یک جزء تکمیلی و جایگزین سیستم‌های هشدار دهنده به دستگاه‌های پیشرفته اضافه می‌شود.

انتظار می‌رود هنگامی که سیستم EDC به طور کامل در سل‌کانترهای هماتولوژی اجرا شود، میزان بررسی دستی یا میکروسکوپی نمونه‌های خونی به میزان زیادی کاهش پیدا کند و تنها به نمونه‌های کاملاً غیرطبیعی مثل نمونه‌های مربوط به بدخیمی‌های خونی محدود شود.

یکی از مشکلات پیش‌بینی شده برای EDC تصدیق انجام آن است، سلول‌هایی که در EDC جای می‌گیرد اغلب در تعداد بسیار اندک در خون ظاهر می‌شود، در عین حال همین تعداد اندک (مثلاً یک سلول در هر ۱۰۰ لکوسیت و یا حتی کمتر) می‌تواند در تصمیم‌گیری‌ها و تشخیص بیماری‌ها سرنوشت‌ساز باشد. در چنین حالتی استفاده از روش‌های مرجع دستی (مثلاً ارزیابی ۴۰۰ گلبول سفید) جهت تصدیق عملکرد سل‌کانترها به علت عدم دقت آن در چنین سطحی، بی فایده بوده و بایستی روش‌های مرجع جایگزین مثل فلوسیتومتری برپایه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به کار گرفته شود.

#### ◄ شمارش اریتروسیت‌های هسته‌دار (NRBCs)

به دلیل اثر تداخلی اریتروسیت‌های هسته‌دار در

شمارش افتراقی لکوسیت‌ها و نیز اهمیت بالینی اندازه‌گیری این سلول‌ها، به تدریج تلاش در جهت اتوماسیون این سلول‌ها آغاز شد. نخستین بار در سال ۱۹۹۹ شرکت سیسمکس در سل‌کانتر XE—۲۱۰۰ خود به این هدف جامه عمل پوشاند. این دستگاه دارای کانال NRBC است که با استفاده از یک معرف لیزکننده مخصوص و یک پرتو نیمه هادی لیزر، می‌تواند شمارش واقعی این سلول‌ها را فراهم سازد. شرکت کولتر نیز در سل‌کانترهای جدید خود مانند LH۷۵۰ و LH۸۰۰ و شرکت تکنیکون نیز در سل کانترهای سری Advia خود مانند Advia-۲۱۲۰ شمارش اتوماتیک اریتروسیت‌های هسته‌دار را مهیا ساخته است.

**◄ گرانولوسیت‌های نارس و سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز**

می‌توان آنالیزر تکنیکون H۱ را نخستین آنالیزری دانست که با استفاده از دو کانال ۱) پراکسیدار و ۲) بازوفیل – لوبولاریتی موفق به سنجش کیفی گرانولیست‌های نارس شد. اما تلاش برای سجش کمی و شمارش واقعی این سلول‌ها اولین بار توسط شرکت سیسمکس آغاز شد. سل‌کانترهای Sys-mex-SE۹۰۰۰ با به کارگیری تلفیقی از روش‌های امپدانس الکتریکی (DC) و کاپاسیتانس الکتریکی (RF) به همراه معرف‌های لیز کننده مخصوص کانال IMI (کانال اندازه‌گیری گرانولوسیت‌های نارس) توانایی اندازه‌گیری این سلول‌ها را در اختیار گرفتند. پژوهش‌ها نشان داد که می‌توان اطلاعات حاصل از کانال IMI را جهت شمارش سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز موجود در گردش خون محیطی نیز به کار گرفت. شمارش این سلول‌ها جهت نشان دادن زمان لکوفرزیس در افرادی که تحت رژیم‌های درمانی موبیلیزاسیون استم سل قرار دارد، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، چراکه فقط اکتفا به تعداد WBC فرد اهدا کننده ممکن است باعث اطلاعات غلط لکوفرزیس پیش از موعد و عدم کفایت استم‌سل‌های مورد نیاز جهت پیوند شود.

## روش‌های هیبرید

همانطور که اشاره شد، نسل پنجم سل‌کانترها بر اساس سه روش اصلی امپدانس، کاپاسیتانس، و پراکنش نوری کار می‌کند. سل‌کانترهای سیسمکس معمولی مانند Sysmex-k21 از ترکیب دو روش امپدانس و کاپاسیتانس استفاده می‌کنند ولی اغلب سل‌کانترهای پیشرفته امروزی مثل Sysmex-XT2100i، Avida-120 و ... هر سه روش امپدانس، کاپاسیتانس و پراکنش نوری را یک‌جا و در ادغام با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌دهند که به آن روش هیبرید VCS گفته می‌شود. VCS مخفف واژه‌های Volumetric impedance, Conductivity, light Sca-tering به معنای هر سه روش مذکور است.

روش‌های نوری و امپدانسی علی‌رغم مزایای متعدد، هر یک دارای محدودیت‌هایی است که کارایی آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به منظور رفع محدودیت‌های هر روش و دستیابی به تکنولوژی‌های برتر در شمارش سلولی، شرکت‌های سازنده‌ی سل‌کانترهای هماتولوژی به تدریج به سمت به کارگیری روش‌های تلفیقی (ترکیبی از روش‌های نوری و امپدانسی) روی آوردند. به کارگیری ترکیبی از روش‌های مختلف باعث افزایش کارایی سل‌کانترها و نیز صحت پاسخ‌های حاصل از آنها شده است.

**◄ روش هیبرید RF/DC**

این روش که در واقع هر دو روش امپدانس (DC) و کاپاسیتانس الکتریکی (RF) را یک‌جا به خدمت گرفته است، در برخی سل‌کانترهای سیسمکس استفاده می‌شود. در این روش سیگنال‌های حاصل از امپدانس الکتریکی تنها متناسب با حجم سلول است، درحالیکه سیگنال‌های کاپاسیتانس الکتریکی نه تنها به حجم سلول، بلکه به محتوای داخلی سلول‌ها مثل هسته و گرانول‌ها نیز بستگی دارد. از آنجا که سلول‌های خونی مانند عایق‌های بیولوژیک عمل می‌کنند، جریان مستقیم الکتریکی قادر به عبور از آنها نبوده و بدین ترتیب این سلول‌ها باعث تغییر مقاومت DC می‌شود که میزان این تغییر با حجم سلول متناسب است. فرکانس رادیویی قابلیت عبور از غشا و سیتوپلاسم سلولی را دارا بوده ولی نمی‌تواند از هسته عبور کند. بدین ترتیب تغییراتی که در کاپاسیتانس الکتریکی یا RF ایجاد می‌شود، متناسب با هسته، گرانول‌های سلولی و به طور کلی محتویات داخل سلولی است. چنانچه بتوان یک لکوسیت را در محلولی که اریتروسیت‌ها را لیز می‌کنند به صورت دست‌نخورده و کامل نگه داشت، با اندازه‌گیری همزمان مقاومت و ظرفیت الکتریکی، می‌توان حجم محتویات آن را ارزیابی کرد. بدین ترتیب حتی اگر دو نوع سلول حجم یکسانی

داشته باشند، چنانچه محتوی داخل آنها متفاوت باشد، این دو سلول قابل افتراق از همدیگر خواهند بود. بنابراین با ترکیب تکنولوژی‌های مختلف، توانایی شمارش و تمایز لکوسیت‌ها به شکل مطلوب‌تری افزایش می‌یابد. نخستین قدم جهت تحقق این هدف، تغییر در فرمول معرف‌های لیزکننده است. این معرف‌ها باید به گونه‌ای طراحی شود که تنها اریتروسیت‌ها و نه لکوسیت‌ها را لیز نمایند. لکوسیت‌ها اگرچه اندازه‌های متفاوتی دارد ولی همگی متشکل از هسته، سیتوپلاسم و در اغلب موارد گرانول‌های سیتوپلاسمی است که طبیعت این اجزاء باتوجه به نوع سلول فرق می‌کند و می‌توان از آنها جهت تمایز انواع لکوسیت‌ها استفاده کرد.

در سل‌کانترهای سیسمکس سری SE، از این روش (RF/DC) جهت شمارش افتراقی سه قسمتی لنفوسیت‌ها، منوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها استفاده می‌شود. پس از اینکه شمارش سه جزئی لکوسیت‌ها حاصل شد، با استفاده از معرف‌های لیزکننده خاصی که هرکدام pH ویژه‌ی خود را دارند شمارش افتراقی بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها نیز (البته به روش امپدانس جریان مستقیم) امکان‌پذیر می‌شود که قابلیت دستگاه را تا دیف پنج پارت افزایش می‌دهد.

پیشرفته‌ترین سل‌کانتر کنونی سیسمکس یعنی XE-۲۱۰۰ (شکل ۵)، روش RF/DC را جهت تشخیص گرانولوسیت‌های نارس (IG) و سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز (HPC) در کانال IMI خود نیز به کار گرفته است. لازم به ذکر است تمامی سل‌کانترهایی که شمارش افتراقی سه پارت و پنج پارت لکوسیت‌ها را فراهم می‌آورند، به یک‌سری الگوریتم‌های هشدار دهنده مجهز هستند که باعث می‌شود تا کاربر از اختلالات احتمالی مورفولوژیکی و یا غیرمورفولوژیکی نمونه‌ها آگاه شود و نمونه‌هایی که نیاز به بررسی مورفولوژیکی و یا اقدامات مناسب بیشتری دارند را مشخص نماید.

### روش VCS یا ترکیب سه‌گانه امپدانس/کاپاسیتانس و اسکاتر نوری

تکنولوژی VCS ترکیبی از اندازه‌گیری‌های حجم سنتی مبتنی بر امپدانس (V)، کاپاسیتانس سلولی (C) و پراکنش نوری (S) است که همگی بطور همزمان برای هر سلول انجام می‌گیرند. به دنبال تخریب گلبول‌های قرمز و پایداری گلبول‌های سفید توسط معرف ثابت کننده (که لکوسیت‌ها را در حالتی نزدیک به حالت طبیعی خودشان نگه می‌دارد)، یک جریان سلولی متمرکز شده به روش هیدرودینامیک، به طور مستقیم از ناحیه حساس اپرچور عبور می‌کند. یک جریان مستقیم الکتریکی با فرکانس پایین (DC)، حجم سلول را اندازه‌گیری می‌کند درحالیکه پروب الکترومغناطیس با ایجاد فرکانس بالایی از امواج الکترومغناطیس، رسانایی و کاپاسیتانس سلول که شاخصی از محتویات داخلی سلول است را ارزیابی می‌کند. سیگنال‌های رسانایی سلولی، یک سنجش منحصر به فرد از سلول به نام Opacity یا کدورت را فراهم می‌کنند که مخصوصاً در افتراق میان سلول‌های هم اندازه مثل لنفوسیت‌های کوچک و بازوفیل‌ها کمک کننده هستند. هر سلول توسط لیزر منوکروماتیک که اطلاعات مربوط به ساختار، شکل، لوبولاریتی، گرانولیتی، اندازه و بازتابش نور را فراهم می‌سازد، نیز اسکن می‌شود. بدین ترتیب یک سیتوگرام دوبعدی از لکوسیت‌ها حاصل می‌شود که در آنها شمارش افتراقی پنج قسمتی لکوسیت‌ها امکان پذیر می‌شود.

گفتنی است که مبتکر تکنولوژی VCS شرکت کولتر بوده و در سل کانترهای پیشرفته این شرکت این تکنولوژی به کار رفته است. در برخی از سل‌کانترهای این شرکت از رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی نیز جهت شمارش افتراقی لکوسیت‌ها استفاده 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 ٤-٩, Montreal, Canada.

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

8-Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus MD PhD–Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, ۲۲nd Edition –Saunders (۲۰۱۱)