

آزمایش سریع برای بررسی فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز در گلبولهای سرخ (روش فلورسنت)

مجله نظام پزشکی

سال چهارم، شماره ۱، صفحه ۲۵، ۱۳۵۳

دکتر شموئیل رهبر - دکتر پرویز بهادری - دکتر ماهر و میراحمدیان *

مقدمه

عوارض و بیماری‌های همولیز دهنده در ایران فراوانند و مهمترین علل این عارضه‌ها، دگرگونی‌های هموگلوبینی و یا کمبود فعالیت آنزیم G6PD می‌باشد (۴). کمبود فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD) که سبب کم‌خونی همولیتیک می‌گردد در منطقه شمال، جنوب و غرب ایران فراوان دیده می‌شود. بخصوص در فصل بهار که باقلاهای تازه بدست می‌آید، مصرف باقلاهای تازه و خام عده زیادی را مبتلا به فاویسم می‌کند و عارضه‌فاویسم اکثراً با کمبود آنزیم G6PD همراه است (۵). ابتدا کمبود آنزیم G6PD و کمبود فعالیت گلوکاتایون احیا شده (GSH) را سبب کم‌خونی همولیتیک می‌دانستند ولی به‌دلیل پی‌وجود آنزیم‌های دیگر غیر از آنزیم G6PD بودند که در تجزیه و تبدیل گلوکز به انرژی دخالت داشتند و کمبود اینگونه آنزیم‌ها نیز سبب نقصان تبدیل گلوکز به انرژی می‌گردد و بیماری همولیتیک را بوجود می‌آورد. بنابراین در پیدایش سندرم همولیتیک آنزیم‌های مختلف دخالت دارند که در یک بیمار معین ممکن است کمبود یک یا چند آنزیم در گلبول‌های قرمز دخالت داشته باشند و میتوان گفت که بیماری همولیتیک گروهی از بیماری‌ها را تشکیل می‌دهد که انتظار نشانه‌های آزمایشگاهی و بالینی تقریباً همانند بوده ولی از نظر کمبود فعالیت آنزیم‌ها در گلبول‌های قرمز با همدیگر متفاوت‌اند (۶ و ۲).

عمل آنزیم G6PD در متابولیسم مواد قندی در گلبول سرخ:

آنزیم G6PD باعث تبدیل نیکوتین آمید-آدنین دی نوکلئوتید

فسفات (NADP) به NADPH^2 می‌گردد و اختلال عمل آنزیم گلوکز شش فسفات دهیدروژناز از احیا شدن NADP و تبدیل آن به NADPH^2 جلوگیری می‌کند و کمبود این آنزیم عمل تبدیل گلوکاتایون اکسیده (GSSG) را به گلوکاتایون احیا شده (GSH) مختل می‌سازد و سبب کاهش آن می‌گردد. بدین ترتیب متابولیسم یاخته‌ای مختل می‌شود و بنیاد ساختمان لیپوپروتئیدی غشاء گویچه‌ها درهم میریزد و سرانجام به لیز سلولی و آزاد شدن هموگلوبین می‌انجامد و همولیز پدیدار می‌شود (۹ و ۳).

ارنست بوتلر (Ernest Beutler) در سال ۱۹۵۵ تفاوتی کلی بین گویچه‌های افراد سالم و حساس قائل شد و کمبود آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز را در ایجاد همولیز مؤثر دانست (۹). کمبود فعالیت آنزیم G6PD گلبول قرمز یک صفت وابسته به جنس نسبتاً معمول در نژاد اصلی مثل گروه چینی نژاد مسدیت‌ترانه و سیاهان می‌باشد. باروش تغییر رنگ Dye decolorization و آزمایش احیای متهموگلوبین (Methemoglobin Reduction Test) شدت این کمبود آنزیم در نژاد چینی ۳/۷۴٪ و ۳/۶٪ به ترتیب در نوزادان پسر و جوانان بود در صورتیکه شدت این کمبود در جوان‌های نژاد چینی که هنگام تولد مبتلا به برقان شده بودند و تحت مراقبت طبیب در بیمارستان‌ها بستری بودند، ۱۷/۵٪ بود. این مسأله مهم در نوزادان هنگ کنگ است و ظاهراً مسئول سهم‌بزرگی در بیماری کرن ایکتروس در این بچه‌هاست. این بیماری در دوران زندگی ممکن است بطور خودبخود بروز کند یا در اثر خوردن بعضی از

* گروه بیولوژی کاربردی مرکز علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران.

شخص دچار کمبود فعالیت آنزیم G6PD است.

نتایج و بحث:

روی ۱۰۸۰ نمونه خونی که بطور روزمره به بخش ایمونوشیمی فرستاده میشود تعدادی از نمونه های خونی که از بیمارستان ها جمع آوری نمودیم آزمایش بروش فوق انجام دادیم. از این عده ۱۱۶ تن زن و بقیه مرد بودند. بطور کلی ۶۴ تن از این عده دچار کمبود فعالیت آنزیم G6PD بودند که از ۱۱۶ تن زن فقط ۸ نفرشان مبتلا بودند و از ۹۶۴ تن مرد ۵۶ تن مبتلا به کمبود فعالیت آنزیم G6PD بودند جهت بررسی صحت و تأیید روش فلورسنت نقطه ای باروشهای دیگری نظیر:

- ۱ - Brilliant cresyl Blue (BCB) (DADE Kit)
- ۲ - Methemoglobin Reduction Test (MRT)
- ۳ - G6PD Assay of Hemolysate
- ۴ - Spectrophotometric Assay (Boehringer Kit)

مقایسه گردید تا مشخص شود که روش فلورسنت نقطه ای کاملاً با روشهای دیگر برابری می کند. این روش، مطمئن، بسیار کم خرج و آسانتر و سریع تر از آزمایش دیگر می باشد.

در تمام روشهای بکار برده شده گاهی مثبت یا منفی کاذب وجود داشت ولی روش فلورسنت تقریباً ۱۰۰٪ نتایج صحیح داد و در مقایسه باروشهای بکار برده شده این روش خیلی صحیح تر و دقیق تر می باشد، حتی مواردی وجود داشت که در زیر چراغ اشعه ماورای بنفش فلورسانس ضعیفتری دیده میشد و کاملاً مشخص بود که خون مربوط دارای فعالیت آنزیمی کمتر از حالت طبیعی می باشد. این موارد را با اسپکتروفتومتر نیز اندازه گیری نمودیم و معلوم شد که فعالیت آنزیمی از حد طبیعی کمتر است در صورتیکه در بقیه موارد که کمبود فعالیت داشتیم در اندازه گیری با اسپکتروفتومتر در طول موج ماورای بنفش ۳۶۶ mμ، فعالیت آنزیمی کاملاً صفر بود. بنابراین حتی با این روش میتوان پی برد که بیمار تا چه حد کمبود فعالیت آنزیمی دارد. برخلاف روش MRT و BCB و غیره که حداقل ۳ ساعت وقت لازم است در این روش فقط ۱۰ دقیقه وقت لازم است که واکنش آنزیمی کامل شود و جواب آزمایش مشخص گردد ضمناً مقدار خونی که در این روش بکار برده می شود بسیار کم است و با ۰/۵ cc خون کامل اجرای آزمایش امکان پذیر است و میتوان در مدت نیم ساعت حتی بیش از ۴۰ آزمایش را با هم انجام داد. از مزایای دیگر این روش این است که نقاط فلورسان تا مدت سه روز بعد از آزمایش نیز فلورسان باقی میماند و میتوان آزمایشهای انجام شده در نقاط دوردست را برای تعیین فلورسانس به آزمایشگاه مرکزی فرستاد.

داروها نظیر پیرماکین- پاماکین و... عارضه همولیتیک یا کم خونی مزمن همولیتیک بوجود آید (۷). بنابراین تشخیص و تعیین کمبود فعالیت G6PD گلبول قرمز از جهت تشخیص و درمان بعدی بیماری بسیار مهم است. اندازه گیری کمی فعالیت آنزیمی مستلزم وقت و هزینه زیادی است بخصوص در بیمارستانهای شلوغ و بویژه در فصل بهار که بیماری فاویسم شایع است. از اینرو مطالعه ما تعیین کمبود فعالیت G6PD بروش فلورسنت نقطه ای مانند یک آزمایش اسکرین می باشد.

اصول آزمایش:

آزمایش فلورسنت نقطه ای بستگی به پیدایش نیکوتین آمید-آدنین دی نوکلئوتید فسفات احیا شده (NADPH²) دارد که ماده فلورسان قوی می باشد. وقتی که فعالیت آنزیمی طبیعی باشد NADPH² تشکیل می شود و بصورت نقطه های فلورسان در زیر چراغ ماورای بنفش شدت نورانی می شود یعنی NADP در همولیزیت تهیه شده از خون اشخاص سالم که فعالیت G6PD طبیعی دارند به NADPH² احیا شده تبدیل می گردد. در صورتیکه نقطه ها در زیر چراغ ماورای بنفش فلورسان نشوند دلیل بر کمبود فعالیت آنزیم G6PD می باشد این روش بوسیله بوتلر Beutler برای نخستین بار بکار رفته است. (۱)

مواد و روش آزمایش:

مواد زیر در آزمایش بروش فلورسنت نقطه ای بکار میرود.

- گلوکز شش فسفات ۰/۰۱ مولار ۰/۱۰ ml
- NADP ۰/۰۰۷۵ مولار ۰/۱۰ ml
- ساپونین ۰/۲۰ ml ۰/۰۱
- تامبون تریس با Ph = 7/8 و ۰/۷۵ مولار ۰/۳۰ ml
- اکسید گلوکوتایون ۰/۰۰۸ مولار ۰/۱۰ ml
- آب مقطر ۰/۲۰ ml

مجموعه ترکیب بالا در حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد بمدت ۳ ماه قابل استفاده است مواد فوق را در موقع آزمایش به نسبت بالا مخلوط نموده و بکار میبرند (۸).

از نمونه خون مورد آزمایش که روی ماده ضد انعقاد (سپترات دوسود) تهیه کردیم، ۰/۵ cc را با ۱۰ برابر از مخلوط فوق ۰/۵ cc در داخل لوله آزمایش ترکیب نموده و بوسیله لوله های موئین نقطه هایی در روی نوار کاغذ واتمن نمرة (۱) هر ۵ دقیقه یکبار تا نیم ساعت می گذاریم بدین ترتیب ۷ نقطه با فواصل ۵ دقیقه ای در روی کاغذ واتمن وجود دارد و فعالیت G6PD در زمانهای مختلف آنکو با سبون که ممکن است متفاوت باشد مشخص میشود، سپس نوار کاغذی را در یک اطاق تاریک در زیر چراغ ماورای بنفش با طول موج بلند مشاهده می کنیم. اگر نقطه هادرخشان (فلورسانس) بشوند که فعالیت آنزیم طبیعی است و اگر درخشان (فلورسانس) نشوند نمونه خون

خلاصه

مطالعه روی تعدادی نمونه خون از جهت بررسی فعالیت آنزیم G6PD بر روش فلورسنت نقطه‌ای و مقایسه با روشهای دیگر نشان داد که اولاً روش فلورسنت روشی است صحیح‌تر و دقیق‌تر از روشهای دیگر و نتایجی را که بدست میدهد ۱۰۰٪ صحیح می‌باشد. ثانیاً هیچگونه جواب مثبت یا منفی نادرست در این روش وجود ندارد، در صورتیکه در روشهای دیگر بکار برده شده نظیر BCB و MRT و غیره جوابهای مثبت یا منفی نادرست داشتیم. در آزمایشهایی که ما انجام دادیم در حدود پنج درصد کمبود فعالیت آنزیم G6PD داشتیم از این عده ۴٪ آنها فعالیت آنزیمشان ۱۰۰٪ صفر بود و ۱٪ نیز کمتر از حد طبیعی بود. در خاتمه یادآور می‌شویم که روش فلورسنت

روشی است که حتی در نقاط دور دست کشور جهت اسکرین کردن بسیار مناسب می‌باشد چون در اغلب نقاط دور افتاده مملکت آزمایشگاه مجهز وجود ندارد و جهت نگهداری مواد اولیه برای روشهای دیگر Cold-Room مورد لزوم است و جهت اندازه گیری آنزیم احتیاج به دستگاه اسپکتروفتومتر و وسایل دیگر می‌باشد در صورتیکه با این روش فلورسنت فقط احتیاج یک چراغ کوچک پرتوهای ماورای بنفش می‌باشد ضمناً اگر چراغ فلورسنت هم در اختیار نباشد چون فلورسنت NADPH^2 بمدت سه روز نیز پایداری می‌ماند میتوان نقطه گذاری روی کاغذ و اتمن را در محل (Field) انجام داد و سپس کاغذ را به آزمایشگاه مرکزی فرستاد و آزمایش نمود.

REFERENCES :

- 1- Beutler, E. A series of new Screening procedures for P. K. Deficiency, G6PD and etc. Blood. Vol 28, No 4 P. 553 Octo 1966.
- 2- Frank, A. New England J. Med, P. 269. 763, 1963.
- 3- Lohr, G. W. Klin Wchsehr. 36, 1008. 1958.
- 4- Rahbar, S Hemoglobiopathies in Iran xlv International congress of Hematology, Sao Paulo. Brasil 1972.
- 5- Smith, G. H. Blood disease of infancy and childhood, P. 294. 300. 1966.
- 6- Tanaka, K. P. Blood. 19. 267. 1962.
- 7- Yeung, C. Y. Lai H. C. Fluorescent spot test for screening Erythrocyte G6PD Dehydrogenase Deficiency in newborn babies. The Journal of pediatrics P. 93. June 1970.
- 8- Yunis. J. Jorge. Biochemical methods in red cell genetics. Academic press. 1969

۹- دکتر رضا نفیسی - کمبود آنزیم G6PD - مجله طب عمومی - شماره دوم - سال سوم - ۱۳۴۳

در شماره ۶ سال سوم ۱۳۵۳، مجله نظام پزشکی، شکل شماره ۸ - مقاله آقای دکتر حسن حمز تحت عنوان «بررسی پنجماله جراحی ترمیمی مفصل خاصره‌ای - رانی» معکوس چاپ شده، از این اشتباه پوزش می‌طلبد.