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

مجلهٔ نظام پزشکی
سال چهارم ، شماره ۱ ، صفحه ۲۵ ، ۱۳۵۳

دکتر شموئیل رهبر ـ دکتر پرویز بهادری ـ دکتر ماهرو میراحمدیان •

مقدمه

عوارض و بیماریهای همولیزدهنده درایران فراوانند ومهمترین علل این عارضه‌ها ، دگرگونیهای هموگلوبینی و یا کمبود فعالیت آنزیم G6PD می باشد (۴). کمبود فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD) که سبب کم خونی همولیتیك می گردد در منطقه شمال ، جنوب و غرب ایران فراوان دیده می‌شود بخصوص در فصل بهار که باقلای تازه بدست می آید . مصرف باقلای تازه وخام عده زیادی را مبتلا به فاویسم می کند و عارضه‌فاویسم اکثراً باکمبودآنزیم G6PDهمراه است(۵). ابتدا کمبود آنزیم G6PD و کمبود فعالیت گلوتاتیون احیا شده (GSH)را سبب کم‌خونی همولیتیك‌می‌دانستند ولی‌بعداً پی‌بوجود آنزیمهای دیگر غیرازآنزیم G6PD بردندکه در تجزیه وتبدیل گلوکز به انرژی دخالت داشتند و کمبود اینگونه آنزیمها نیز سبب نقصان تبدیل‌گلوکز به‌انرژی می گردد و بیماری همولیتیك رابوجودمی‌آورد. بنابراین درپیدایش‌سندرم همولیتیك‌آنزیمهای مختلف دخالت دارندکه دریك بیمارمعین ممکن‌است کمبود یك یا چندآنزیم درگلبولهای قرمزدخالت داشته‌باشند ومیتوان گفت که بیماری همولیتیك گروهی‌از بیماریها را تشکیل می‌دهدکه ازنظر نشانه‌های آزمایشگاهی و بالینی تقریباً همانند بوده ولی از نظر کمبود فعالیت آنزیمها درگلبولهای قرمز با همدیگر متفاوت‌اند (۲ و ۶).

عمل‌آنزیم G6PD درمتابولیسم موادقندی درگلبول سرخ:

آنزیم G6PD باعث تبدیل نیکوتین‌آمیدـآدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADP) به $NADPH^2$ می گردد واختلال عمل آنزیم گلوکز شش فسفات دهیدروژناز از احیا شدن NADP و تبدیل آن به $NADPH^2$ جلوگیری می‌کند و کمبود این آنزیم عمل تبدیل گلوتاتیون اکسیده (GSSG) را به گلوتاتیون احیا شده (GSH) مختل میسازد و سبب کاهش آن می گردد . بدین ترتیب متابولیسم یاخته‌ای مختل می‌شود و بنیاد ساختمان لیپوپروتئیدی غشاءگویچه‌ها درهم میریزد و سرانجام به لیزسلولی وآزاد شدن هموگلوبین می‌انجامد وهمولیز پدیدار می‌شود(۹ و ۳).

ارنست بوتلر (Ernest Beutler) درسال ۱۹۵۵ تفاوتی کلی‌بین گویچه‌های افراد سالم و حساس قائل شد وکمبود آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز را درایجاد همولیزمؤثردانست(۹). کمبود فعالیت آنزیم G6PD گلبول قرمز یك صفت وابسته بجنس نسبتاً معمول در نژاد اصلی مثل گروه چینی‌نژاد مدیترانه و سیاهان می‌باشد. باروش تغییررنگ Dye decolorization و آزمایش احیای متهموگلوبین (Methemoglobin Reduction Test) شدت‌این کمبودآنزیم درنژاد چینی ۳/۷۴٪ و ۳/۶٪ بترتیب در نوزادان‌پسروجوانان‌بود درصورتیکه‌شدت این‌کمبوددرجوانهای نژاد چینی‌که هنگام‌تولد مبتلا به‌یرقان شده بودند وتحت‌مراقبت طبیب دربیمارستانها بستری بودند، ۱۷/۵٪ بود. این‌مسأله مهم درنوزادان هنگ‌کنگ استوظاهراً مسئول‌مهم‌بزرگی دربیماری کرن ایکتروس در این بچه‌هاست. این بیماری دردوران زندگی ممکن است بطور خودبخود بروزکند یا دراثر خوردن بعضی از

* گروه بیولوژی کاربردی مرکز علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران.

داروها نظیر پریماکین- پاماکین و... عارضه همولیتیک یا کم خونی مزمن همولیتیک بوجود آید(۷). بنابراین تشخیص و تعیین کمبود فعالیت G6PD گلبول قرمز ازجهت تشخیص ودرمان بعدی بیماری بسیارمهم 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. ازاینرو مطالعه ما تعیین کمبود فعالیت G6PD بروش فلورسنت نقطه‌ای مانند یك آزمایش اسکرین می‌باشد.

اصول آزمایش:

آزمایش فلورسنت نقطه‌ای بستگی به پیدایش نیکوتین آمید- آدنین دی‌نوکلئوتیدفسفات احیاشده($NADPH^2$)دارد که ماده فلورسان قوی می‌باشد . وقتیکه فعالیت آنزیمی طبیعی باشد $NADPH^2$ تشکیل‌می‌شود وبصورت نقطه‌های‌فلورسان درزیرچراغ باپرتوهای ماورای‌بنفش بشدت نورانی می‌شود یعنی NADP درهمولیزیت تهیه شده از خون اشخاص سالم که فعالیت G6PD طبیعی دارند به $NADPH^2$ احیاشده تبدیل می گردد. درصورتیکه نقطه‌ها در زیرچراغ باپرتوهای ماورای‌بنفش‌فلورسانس نشوند دلیل بر کمبود فعالیت آنزیم G6PD می‌باشد این‌روش بوسیله بوتلر Beutler برای نخستین‌بار بکار رفته است.(۱)

مواد و روش آزمایش:

مواد زیر در آزمایش بروش فلورسنت نقطه‌ای بکار میرود.

گلوکز شش فسفات	۰/۰۱ مولار	۰/۱۰ ml
NADP	۰/۰۰۷۵ مولار	۰/۱۰ ml
ساپونین	۰/۰۱	۰/۲۰ ml
تامپون‌تریس clH با Ph = 7/8 و	۰/۷۵ مولار	۰/۳۰ ml
اکسید گلوتاتیون	۰/۰۰۸ مولار	۰/۱۰ ml
آب مقطر		۰/۲۰ ml

مجموعهٔ ترکیب بالا درحرارت ۲۰-درجه سانتیگراد بمدت۳ماه قابل‌استفاده‌است مواد فوق را درموقع آزمایش به‌نسبت بالامخلوط نموده وبکار میبرند (۸).

ازنمونه‌خون مورد آزمایش که‌روی ماده ضدانعقاد(سیتراتدوسود) تهیه کردیم، ۰/۰۵cc را با۱۰ برابر از مخلوط فوق ۰/۵cc در داخل لوله‌آزمایش ترکیب نموده و بوسیله لوله‌های موئین نقطه‌هایی در روی نوارکاغذ واتمن نمره (۱) هر ۵ دقیقه یکبار تانیمساعت می گذاریم‌بدین‌ترتیب۷ نقطه بافواصل۵دقیقه‌ای‌درروی کاغذواتمن‌وجوددارد‌وفعالیتG6PDدرزمانهای‌مختلف‌انکوباسیون که ممکن است متفاوت باشد مشخص میشود، سپس‌نوارکاغذی را در یك‌اطاقك تاریك درزیر چراغ ماورای‌بنفش با طول موج‌بلند مشاهده می کنیم. اگر نقطه‌هادرخشان(فلورسانس) بشوند که فعالیت آنزیم طبیعی‌است واگر درخشان(فلورسانس) نشوند نمونه خون شخص دچار کمبود فعالیت آنزیم G6PD است.

نتایج و بحث:

روی۱۰۸۰ نمونه‌خونی که‌بطورروزمره‌به‌بخش‌ایمونوشیمی‌فرستاده میشود وتعدادی از نمونه‌های‌خونی که از بیمارستانها جمع‌آوری نمودیم آزمایش بروش‌فوقا‌انجام دادیم. ازاین‌عده ۱۱۶تن‌زن وبقیه مردبودند. بطورکلی۶۴ تن ازاین عده دچارکمبود فعالیت‌آنزیم G6PD بودندکه از ۱۱۶ تن زن فقط ۸ نفرشان مبتلابودند واز ۹۶۴ تن مرد ۵۶ تن مبتلا به کمبود فعالیت آنزیمG6PD بودند جهت‌بررسی‌صحت‌وتأییدروش‌فلورسنت‌نقطه‌ای‌باروشهای‌دیگری‌نظیر :

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 نقطه‌ای کاملا با روشهای دیگر برابری می کند. این‌روش، مطمئن، بسیارکم‌خرج وآسانتروسریع‌تر ازآزمایش دیگر می‌باشد.

درتمام روشهای‌بکاربرده شده گاهی مثبت یامنفی‌کاذب وجودداشت ولی روش فلورسنت تقریباً ۱۰۰٪ نتایج صحیح داد و در مقایسه باروشهای بکاربرده شده این‌روش‌خیلی‌صحیح‌تر ودقیق‌ترمی‌باشد، حتی مواردی وجـود داشت‌که در زیر چراغ اشعه ماورای بنفش فلورسانس ضعیفتری دیده میشد وکاملا مشخص‌بود که خون‌مربوط دارای فعالیت آنزیمی کمتر ازحالت طبیعی می‌باشد. این موارد را با اسپکتروفتومتر نیز اندازه گیری نمودیم ومعلوم‌شد که‌فعالیت آنزیمی ازحد طبیعی کمتر است در صورتیکه در بقیه موارد که کمبود فعالیت داشتیم دراندازه گیری بااسپکتروفتومتردرطول‌موج ماورای بنفش ۳۶۶ mμ، فعالیت‌آنزیمی‌کاملاصفر بود. بنابراین حتی بااین روش میتوان پی‌بردکه بیمار تا چه حدکمبود فعالیت آنزیمی دارد . برخلاف روش MRT و BCB و غیره که حداقل ۳ ساعت وقت لازم است در این روش فقط۱۰ دقیقه وقت لازم‌است که واکنش آنزیمی کامل شود و جواب آزمایش مشخص گردد ضمناً مقدار خونی‌که در این روش بکاربرده می‌شود بسیارکم‌است و با۰/۰۵cc خون‌کامل اجرای‌آزمایش امکان‌پذیراست و میتوان در مدت نیمساعت حتی بیش از ۴۰ آزمایش را با هم انجام داد. از مزایای دیگر این روش این‌است‌که نقاط فلورسان تا مدت سه روز بعدازآزمایش نیز فلورسان باقی میماند و میتوان‌آزمایشهای انجام‌شده درنقاط دوردست را برای‌تعیین فلورسانس به‌آزمایشگاه مرکزی فرستاد.

خلاصه

مطالعه روی تعدادی نمونه خون ازجهت بررسی فعالیت آنزیم G6PD برروش فلورسنت نقطه‌ای و مقایسه با روشهای دیگر نشان دادکه اولاروش فلورسنت‌روشی است صحیح‌تر ودقیق‌تر ازروشهای دیگر و نتایجی راکه بدست میدهد ۱۰۰٪ صحیح می‌باشد. ثانیاً هیچگونه جواب مثبت یا منفی‌نادرست دراین روش وجود ندارد، درصورتیکه درروشهای دیگر بکار برده شد، نظیر MRT و BCB وغیره جوابهای مثبت یا منفی‌نادرست داشتیم. درآزمایشهائی که ما انجام دادیم درحدود پنج‌درصد کمبود فعالیت آنزیم G6PD داشتیم از این عده ۴٪ آنها فعالیت آنزیمشان ۱۰۰٪ صفر بود و ۱٪ نیز کمتر ازحد طبیعی بود. درخاتمه یادآورمی‌شویم که روش‌فلورسنت روشی است که‌حتی در نقاط دوردست کشورجهت اسکرین کردن بسیار مناسب می‌باشدچون‌دراغلب‌نقاط دورافتاده‌مملکت آزمایشگاه‌مجهز وجود ندارد و جهت نگهداری مواد اولیه برای روش‌های دیگر Cold_Room مورد لزوم است وجهت‌اندازه گیری‌آنزیم احتیاج به دستگاه اسپکتروفتومتر و وسایل دیگر می‌باشد درصورتیکه با این روش فلورسنت فقط احتیاج بیك چراغ کوچك پرتوهای ماورای‌بنفش می‌باشد ضمناً اگرچراغ فلورسنت‌هم دراختیارنباشد چون‌فلورسنت $NADPH^2$ بمدت سه‌روز نیز پایدارمی‌ماند میتوان نقطه گذاری روی‌کاغذ واتمن را درمحل(Field) انجام داد وسپس کاغذ را به‌آزمایشگاه مرکزی فرستاد وآزمایش 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 infancey 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

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

در شمارهٔ ۶ سال سوم ۱۳۵۳ ، مجله نظام پزشکی ، شکل شماره ۸ ـ مقاله آقای دکترحسن‌حمز تحت عنوان «بررسی‌پنجساله جراحی‌ترمیمی مفصل‌خاصره‌ای ـ رانی» معکوس چاپ شده ، ازاین اشتباه پوزش می‌طلبد.