

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 میر احمدیان *

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 باقلای تازه بدست می‌آید. مصرف باقلای 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 گلوکوتایون احیا شده (GSH) را سبب کم‌خونی همولیتیک می‌دانستند ولی به‌دلیل پی‌بوجود آنزیم‌های دیگر غیر از آنزیم G6PD بردند 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 از نظر نشانه‌های آزمایشگاهی و بالینی تقریباً همانند بوده ولی از نظر کمبود فعالیت آنزیم‌ها در گلبول‌های قرمز با همدیگر متفاوت اند (۲ و ۶).

عمل آنزیم G6PD در متابولیسم موادقتدی 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 گلوکوتایون اکسیده (GSSG) را به گلوکوتایون احیا شده (GSH) مختل می‌سازد و سبب کاهش آن می‌گردد. بدین ترتیب متابولیسم یاخته‌ای مختل می‌شود و بنیاد ساختمان لیوپروئیدی غشاء گویچه‌ها درهم میریزد و سرانجام به لیزسلولی و آزاد شدن هموگلوبین می‌انجامد و همولیز پدیدار می‌شود (۳ و ۹).

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 بجنس نسبتاً معمول در نژاد اصلی مثل گروه چینی نژاد مسدیترانه 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٪ بترتیب در نوزادان پسر و جوانان بود در صورتیکه شدت این کمبود در جوانی نژاد چینی که هنگام تولد مبتلا به یرقان شده بودند و تحت مراقبت طبیب در بیمارستانها بستری بودند، ۱۷/۵٪ بود. این مسأله مهم در نوزادان هنگ کنگ است و ظاهراً مسئول سهم بزرگی در بیماری کرن ایکتروس در این بچه‌هاست. این بیماری در دوران زندگی ممکن است بطور خودبخود بروز کند یا دوائر 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 ایمو نوشیمی فرستاده میشود و تعدادی از نمونه‌های خونی که از بیمارستان‌ها جمع آوری نمودیم آزمایش بروش فوق‌انجام 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 نقطه‌ای با روشهای 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 نقطه‌ای کاملاً با روشهای دیگر برابری می‌کند. این روش، مطمئن، بسیار کم‌خرج و آسانتر و سریع‌تر از آزمایش دیگر می‌باشد.

در تمام روشهای بکاربرده شده گاهی مثبت یا منفی کاذب وجود داشت ولی روش فلورسنت تقریباً ۱۰۰٪ نتایج صحیح داد و در مقایسه با روشهای بکاربرده شده این روش خیلی صحیح‌تر و دقیق‌تر می‌باشد، 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 می‌باشد. این موارد را با اسپکتروفتومتر نیز اندازه‌گیری نمودیم و معلوم شد که فعالیت آنزیمی از حد طبیعی کمتر است در صورتیکه در بقیه موارد که کمبود فعالیت داشتیم در اندازه‌گیری 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 بکاربرده می‌شود بسیار کم است و با ۰.۵cc خون کامل اجرای آزمایش امکان پذیر است و میتوان در مدت نیمساعت 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. اندازه‌گیری 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 نقطه‌ای مانند یک آزمایش اسکرین می‌باشد.

اصول آزمایش:

آزمایش فلورسنت نقطه‌ای بستگی به پیدایش نیکوتین آمید-آدنین دی‌نوکلئو تید فسفات احیا شده (NADPH²) دارد که ماده فلورسان قوی می‌باشد. وقتیکه فعالیت آنزیمی طبیعی باشد NADPH² تشکیل می‌شود و بصورت نقطه‌های فلورسان در زیر چراغ با پرتوهای ماورای بنفش شدت نورانی می‌شود یعنی NADP در همولیزیت تهیه شده از خون اشخاص سالم که فعالیت G6PD طبیعی دارند به NADPH² احیا شده تبدیل می‌گردد. در صورتیکه نقطه‌ها در زیر چراغ با پرتوهای ماورای بنفش فلورسان نشوند دلیل بر کمبود فعالیت آنزیم G6PD می‌باشد این روش بوسیله بوتلر Beutler برای نخستین بار 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 ۰/۲۰ ml ۰/۰۱
- تامپون تریس با Ph = 7/8 و ۰/۷۵ مولار ۰/۳۰ ml
- اکسید گلوکاتایون 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، ۰/۰۵cc را با ۱۰ برابر از مخلوط فوق ۰/۵cc در داخل لوله آزمایش ترکیب نموده و بوسیله لوله‌های موئین نقطه‌هایی در روی نوار کاغذ واتمن نمره (۱) هر ۵ دقیقه یکبار تا نیمساعت می‌گذاریم بدین ترتیب ۷ نقطه با فواصل ۵ دقیقه‌ای در روی کاغذ واتمن وجود دارد و فعالیت G6PD در زمانهای مختلف آنکو باسیون که ممکن است متفاوت باشد مشخص میشود، سپس نوار کاغذی را در یک اطفاک تاریک در زیر چراغ ماورای بنفش با طول موج بلند مشاهده می‌کنیم. اگر نقطه‌ها درخشان (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 اولاروش 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 MRT و BCB 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 پایدار می‌ماند میتوان نقطه گذاری روی کاغذ واتمن 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 بوزش می‌طلبد.