

## بررسی پنجم مورد ایمنووالکتروفورز در سرم مبتلایان به بیماریهای خونی که برای اولین بار در دانشکده پزشکی انجام شده است

امروزه ایمنووالکتروفورز یک وسیله تحقیقی و تشخیصی بسیار دقیق در شناختن نوع پروتئین های سرم و تغییرات این پروتئین ها در بیماریهای مختلف گردیده است. اصول ایمنووالکتروفورز و مناطق مختلف ایمنووالکتروفورزی پروتئین های سرم انسانی را در مقاله قبلی [شماره ۶ دوره بیست و دوم (I)] مجله دانشکده پزشکی انتشار داده ام اینک نتایج حاصله از بکار بردن ایمنووالکتروفورز در چند مورد بیمار مبتلا به تغییرات پروتئین های سرمی (دیس پروتئین امی) که در این بخش مورد مطالعه قرار گرفته شرح داده میشود.

روش کار و مواد لازم: در اینجا ایمنووالکتروفورز بروش میکرومتد که بر روی لام میکروسکوپی انجام میگردد بکار رفته است این طریقه بسیار دقیق است و برای سهولت در انجام آن تغییراتی به روش های موجود قبلی بوسیله اینجانب در آن داده شده است و برای محیط الکتروفورز از ژل تصفیه شده آگار به نسبت یک درصد و تامپون و روناال استفاده میشود.

تهیه ژل آگار: برای تهیه آگار تصفیه شده و خالص یک ژل ۰/۳٪ از Difco Bacto Agar تهیه میشود و این ژل را مدت سه روز با آب مقطر خنثی دیالیز میکنیم تا کاملاً سفید و شفاف گردد بعد از ژل تصفیه شده تعیین عیار بعمل آمده و پس از مخلوط کردن با تامپون و روناال ژل تامپون ۱٪ تهیه میشود که برای ایمنووالکتروفورز از این ژل استفاده میگردد.

تامپون : تامپون و روناال PH—8/6

۰/۱۰ M

روناال آسید ۳/۲ گرم

روناال سدیک ۲۰ گرم

آب مقطر مقدار لازم تا ۱ لیتر

برای تهیه ژل این تامپون را یک بار رقیق میکنیم ولی در مخازن الکترودها تامپون با همین غلظت بکار میرود و در حقیقت یک سیستم تامپونی متناوب بکار رفته است (2)

برای جلوگیری از رشد میکروبیها و قارچها مرتیولیت را به نسبت  $\frac{1}{10000}$  به ژل اضافه کرده و آنرا در شیشه های کوچک تقسیم مینمایند و میتوان آنرا در یخچال ۴ درجه بمدت ۶ ماه نگهداری کرد و در موقع لزوم از آن ژل ها بکاربرد .

تهیه لام پوشیده از آگار : قبلا لامهای میکروسکپی  $۶ \times ۷۶$  میلیمتر را کاملاً تمیز و چربی آنرا در مخلوط بیکرومات دوپتاس ۲٪ در آسیدسولفوریک از بین برده و لامها را خوب شسته و خشک میکنیم و روی سطح افقی قرار داده و روی هر لام ۳ ml از ژل تامپونه ۱٪ مایع ریخته میگذاریم به بندد و لامهارا ۴ ساعت در یخچال ۴ درجه نگهداری میکنیم و بعد بکار میبریم در این مدت تغییراتی در ژل ایجاد میشود که نیروی الکتروآندوسمز را حداقل میرساند (نیروی الکتروآندوسمز یا جریان حرکت آب داخل ژل بطرف کاتد در موقع الکتروفورز نیروئی است که از حرکت الکتروفورزی مولکول پروتئین ها جلوگیری میکند و گاهی بقدری شدید است که جهت الکتروفورزی پروتئین ها را عوض میکند).

الکتروفورز : حفره های آنتی ژن را قبل از الکتروفورز بوسیله یک قالب الگو که از جنس پلکسی گلاس میباشد در ژل ایجاد میکنیم .

این قالب که ابعاد آن باندازه لام میکروسکپی است یک ناودان طولی در وسط دارد بعرض دو میلیمتر و طول ۶ سانتیمتر و سوراخهائی بقطره ۱/۱ میلیمتر بفاصله ۵ میلیمتر از کناره های ناودان در خط وسط در آن ایجاد شده است و بوسیله این قالب میتوان محل سوراخهای آنتی ژن و ناودان آنتی کور را در روی ژل بطور دقیقی برید. در سوراخهای طرفی معمولاً در سوراخ بالاسرم شخص سالمی را بعنوان شاهد میریزیم و در سوراخ پائین سرم بیمار را قرار میدهیم مقدار سرمی که بکار میرود ۱۰ ml / . میباشد .

دستگاه الکتروفورز : دستگاه الکتروفورز شکل شماره ۱ که در آن میتوان ۴ لام را با هم الکتروفورز کرد این دستگاه شبیه به دستگاه الکتروفورزی Wieme میباشد (3) ولی تغییراتی بوسیله اینجانب در آن داده شده است که کار کردن با آن سهل تر و ارزان تر تمام میشود .

در روش Wieme در قسمت داخلی مخازن الکترودها مقدار زیادی ژلوز تصفیه شده و تامپونه بعنوان پل ارتباطی بکار میرود و لامهای آگار روی پل های ژلوزی قرار گرفته و با الکترودها ارتباط پیدا میکند .

اینجانب پل های ژلوزی را تبدیل به اسفنجی از جنس پلی وینیل کرده ام که به تامپون آغشته میشود و باعث ارتباط لام با الکترودها میشود بدین ترتیب با ولتاژی در حدود ۷۰ ولت (۷ میلی آمپر برای هر لام) الکتروفورز در ۷ دقیقه انجام میگردد . نمونه الکتروفورز ساده را باین

طریقه در شکل شماره ۲ می بینیم که مناطق آلبومین آلفا یک گلوبولین و آلفا دو گلوبولین و بتا و گاما گلوبولین ها در آن بخوبی دیده میشود. این لام با آمیدوشوارتز رنگ شده است. پس از الکتروفورز با قرار دادن قالب نامبرده بالا در روی سطح ژل ناودان وسطی را بریده و ژل داخل آنرا خارج کرده و آنتی کور (آنتی سرم ضد انسانی) به اندازه ۳/۳. در آن میریزیم آنتی سرم ضد انسانی در انستیتو پاستور پاریس و کارخانه Behring werck آلمان تهیه شده است. برای ژل دیفوزیون و ایجاد باندهای پرسی پیتاسیون لامها را بمدت ۴ ساعت در اتاقک مرطوب در سطح کاملاً افقی قرار داده و پس از این مدت برای خارج کردن پروتئین هائی که ایجاد پرسی پیتاسیون نکرده اند لامها را در محلول سرم فیزیولوژیک تامپونه فسفات 7/5-PH بمدت ۴ ساعت شستشو میدهم. در این مرحله که باندهای پرسی پیتاسیون کامل شده است و بصورت خطوط سفیدی در ژل شفاف نمایان اند ممکن است از آنها عکس گرفته و یا اینکه پس از خشک کردن لام و رنگ آمیزی با آزو کارسین (g) و رنگ بری حاشیه آن عکسهای بزرگ شده گرفت و مورد مطالعه قرار داد و هنگام خشک کردن آگار معمولاً برای اینکه کتاره های بریده شده ناودان ترک نخورد و تغییری در شکل خطوط پرسی پیتاسیون ایجاد نشود این ناودان را با ژلوز ۱٪ پرمیکنیم و با گذاردن کاغذ صافی در سطح ژل آنرا در اتو ۳۷ درجه خشک میکنیم و ژلوز بصورت فیلم نازکی در روی لام درمیآید که با رنگ آمیزی خطوط پرسی-پیتاسیون بخوبی در آن دیده میشود.

نتایج و بحث: در شرایط الکتروفورزی فوق آلبومین و آلفا یک و آلفا دو گلوبولین به طرف آنود حرکت میکنند و بتا گلوبولین و گاما گلوبولین به طرف کاتد میرود در این روش اغلب بتا یک از بتا دو گلوبولین بخوبی جدا میشود. بنابراین باندهای پرسی پیتاسیون در طرف کاتد مربوط است به بتا گلوبولین ها و گاما گلوبولین ها و باندهای آلبومین و آلفا یک و آلفا دو گلوبولین ها در طرف آنود دیده میشود (مأخذ شماره ۱).

همینطور که ذکر شد از لحاظ مقایسه کانتی تاتیف در قسمت بالای هر لام ایمونوالکتروفوروز-گرام شاهد طبیعی وجود دارد که با مقایسه آن میتوان به تغییرات پروتئین های سرم بیماری برد. در مورد بیمار اول (شکل شماره ۳) چنانچه دیده میشود باند گاما A با مقایسه با شاهد بسیار نازک و کم حجم و کوتاه تر است و همین خود دلیل بر کمبود گاما گلوبولین A در سرم بیمار است. این بیمار مبتلا به آگاما گلوبولینمی اکتسابی است که بیماری نادری است. و این اولین موردی است که در این بخش مورد بررسی قرار گرفته است در مورد آگاما گلوبولینمی مطلق باند گاما اصلاً دیده نمیشود. در الکتروفورز کاغذی این بیمار باند گاما بسیار ضعیف دیده میشود. و نسبت آن هفت درصد از

مجموع پروتئین‌های سرم است. در مورد بیماران مبتلا به میلوم مولتی پل نوع گاما پلاسموسیتوم باند  $\beta_{2M}$  بسیار ضخیم شده (بامقایسه شاهد) شکل شماره ۴ در این بیماران گاهی باند  $\beta_{2M}$  و  $\beta_{2X}$  نیز واضح تر از معمول دیده میشود.

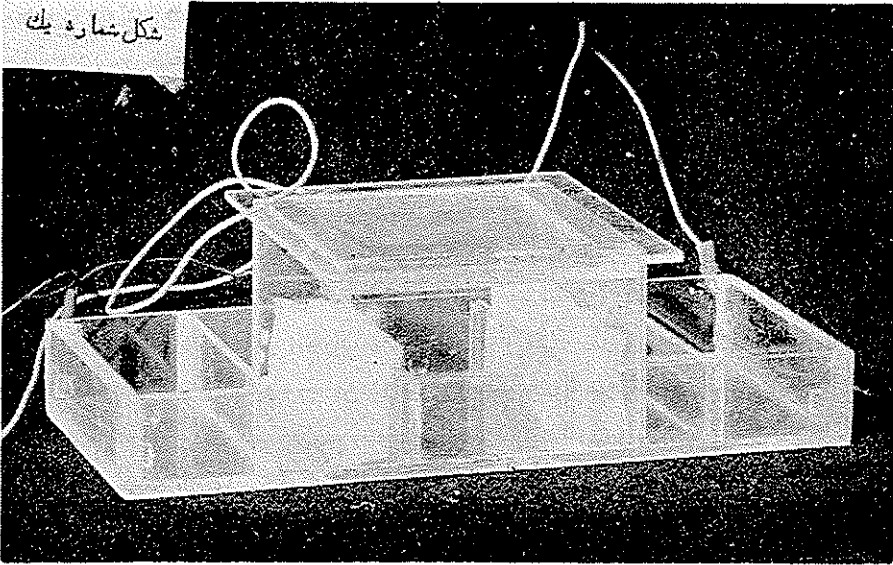
مقدار گاما گلوبولین در این بیماران در حدود ۳۸٪ از پروتئین تام بود.

در نوع آلفا دو پلاسموسیتوم پروتئین‌های منطقه آلفا دو گلوبولین کم و بیش ازدیاد پیدا کرده‌اند. دو مورد بسیار جالب دیگر بیماران بودند که تشخیص معینی برای آنها داده نشده بود و یکی مبتلا به اسکلوئردمی و دیگری شکوک به ابتلای به میلوم مولتی پل بودند. در الکتروفورز کاغذی سرم این بیماران یک باند اضافی و بسیار نزدیک به باند گاما گلوبولین دیده میشود. ایمونوالکتروفورز این دو بیمار (شکل‌های شماره ۵ و ۶) نشان میدهد که در هر دو بیمار باند  $\beta_{2M}$  بسیار واضح و ضخیم تر از شاهد شده است زیرا باند  $\beta_{2M}$  در حال طبیعی خیلی نازک دیده میشود مقدار گاما گلوبولین یا تغییری نکرده و یا کمتر شده است. و بالنتیجه تشخیص این دو بیمار ما کرو گلوبولینی والد اشتروم میباشد. مولکول‌های  $\beta_{2M}$  را بوسیله اولتراسانتریفوژ جدا کرده‌اند و این مولکول‌ها مولکول سنگینی هستند از نوع  $19S$  بدین ترتیب دیده میشود که ایمونوالکتروفورز در تشخیص بیماریهای دیس پروتئین-امیک چه کمک با ارزشی میکند.

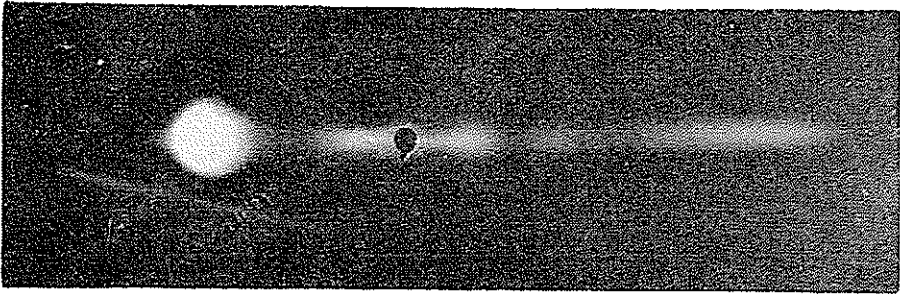
خلاصه: پس از شرح دادن روش مخصوص ایمونوالکتروفورز که اینک در این بخش معمول است نتایج بکاربردن ایمونوالکتروفورز در مورد بیماران که مبتلا به دیس پروتئین امی از قبیل آگاما گلوبولینی و بیماری کاهلروما کرو گلوبولینی و والد اشتروم بوده‌اند بررسی شده است.

### مأخذ:

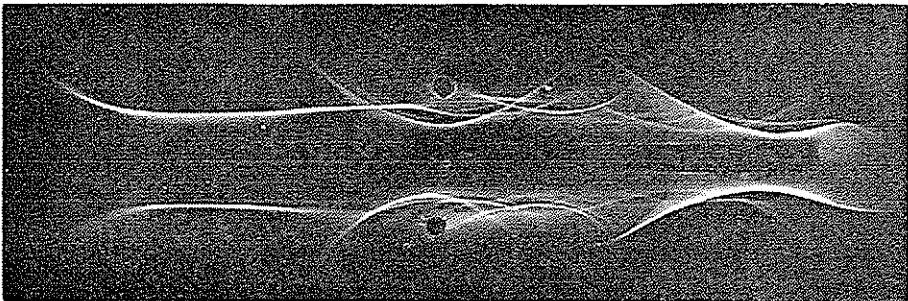
- ۱- دکتر رهبر ایمونوالکتروفورز شماره ۶ مجله دانشکده پزشکی اسفند ۳۴
- 2- Peetom : The Agas Précipitation and its application Oliver and Boyd 1963
- 3- Wieme : Clinica Chimica Acta 4-317 1959
- 4- Crowle : Immunodiffusion A. P. 1961



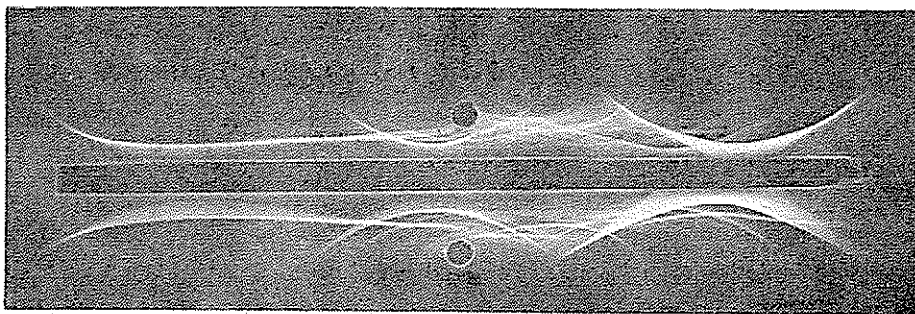
شکل ۱- دستگاه الکترو فورز



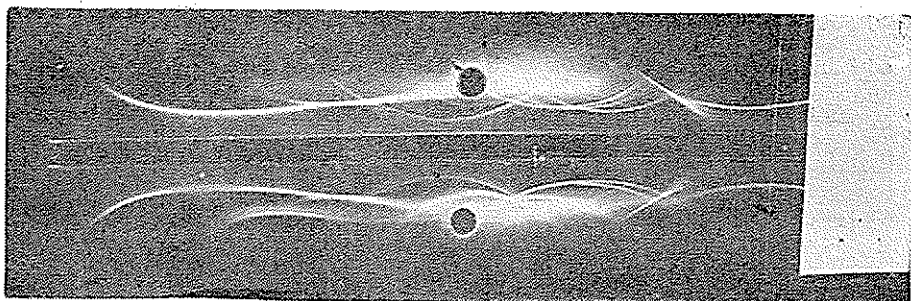
شکل ۲- الکترو فورز ساده پروتئین های سرم در آگار ژل از چپ بر راست :  
آلبومین آلفایک، آلفا دو و بتا و گاما گلوبولین



شکل ۳- باند گاما گلوبولین در پائین با مقایسه با شاهد طبیعی در بالا کوتاه تر و کم  
حجم تر است بیمار مبتلا به آگاما گلوبولینمی

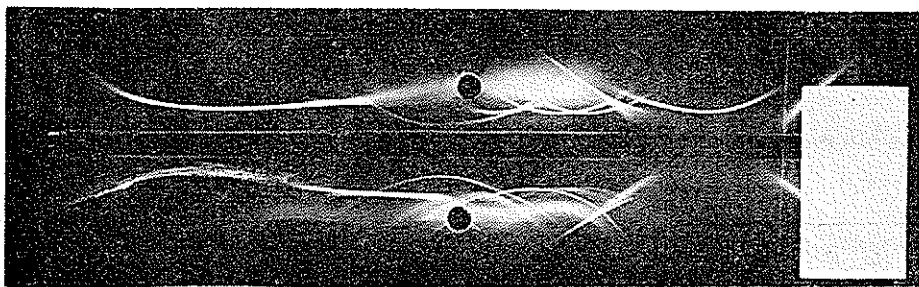


شکل ۲- منحنی دربالا طبیعی و درقسمت پائین مربوط به بیمار مبتلا به میلوم مولتی پل می باشد. باند گاما درپائین حجیم تر و ضخیم تر از شاهد طبیعی است



$\beta_{2M}$  ↗

شکل ۳- بیماری ما کرو گلوبولینمی والداشتروم باند  $\beta_{2M}$  نمایان و حجیم تر از طبیعی است



$\beta_{2M}$  ↗

شکل ۴- مربوط به بیمار مبتلا به ما کرو گلوبولینمی والداشتروم که باند  $\beta_{2M}$  واضح و حجیم شده است