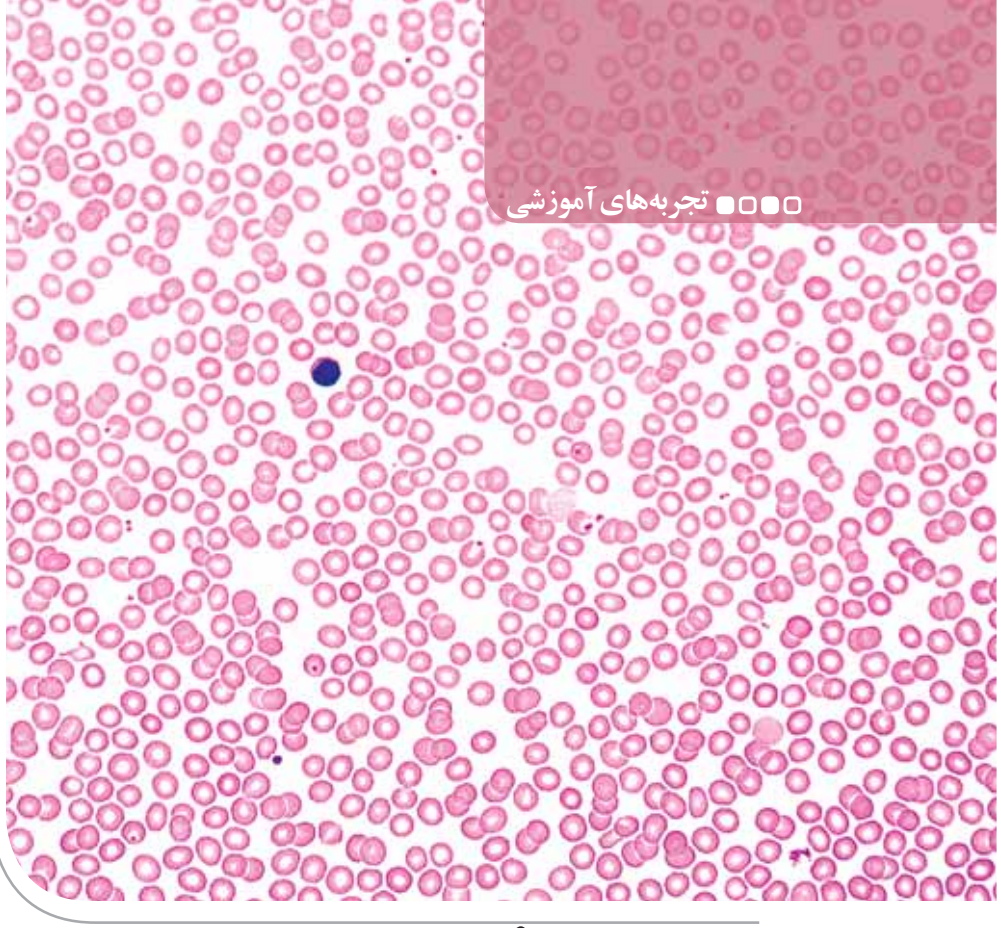


تهیهٔ گسترش خونی

ابراهیم قرنجیک
معلم زیست‌شناسی منطقهٔ گمیشان، استان گلستان

گروه هدف: دانش‌آموزان دورهٔ دبیرستان و معلمان زیست‌شناسی و علوم تجربی

مقدمه

تهیهٔ گسترش خونی، رنگ‌آمیزی آن و بررسی گسترش خونی، بخش مهمی از ارزیابی خون‌شناسی را تشکیل می‌دهد. قابل اعتماد بودن اطلاعات به‌دست آمده از بررسیِ گسترشِ خونی بستگی زیاد به تهیه و رنگ‌آمیزی خوب گسترش‌ها دارد. هنگام مطالعه میکروسکوپی، ایجاد یک گسترش خوب و استاندارد اولین گام در تشخیص سلول‌های خونی طبیعی از غیرطبیعی است و گسترش نادرست باعث اشتباه در تشخیص و عدم دسترسی به نتیجه مطلوب خواهد بود. لذا در این مطلب به ویژگی‌های گسترش خونی مناسب و استاندارد اشاره می‌کنیم.

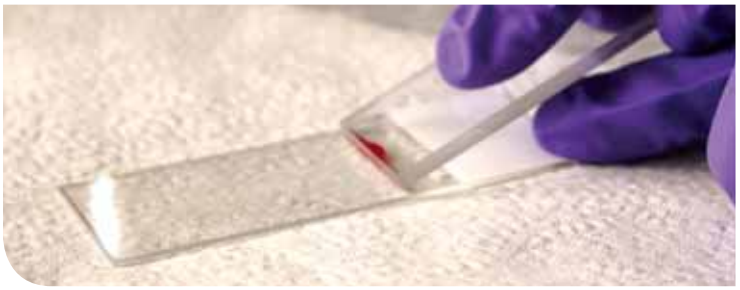
۱. توزیع سلول‌ها روی سطح تیغه یکنواخت و رنگ گلبول‌های قرمز صورتی باشد،
۲. روی سطح تیغه، رسوب رنگ حداقل و رنگ تیغه یکنواخت باشد،
۳. گسترش خونی دو سوم تیغه را اشغال کند،
٤. گسترش خونی باید از ابتدا و انتهای تیغه فاصله مناسب داشته باشد،
۵. گسترش خونی دارای سه ناحیهٔ ضخیم، متوسط و نازک باشد،
٦. در دو طرف تیغه هر دو حاشیهٔ گسترش خونی به‌طور مناسب رعایت شود.

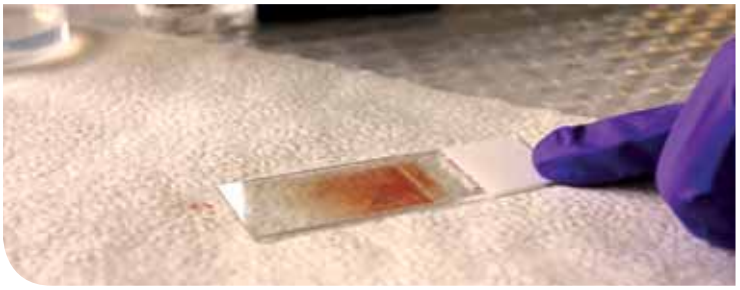
تهیهٔ گسترش خونیِ خوب نیازمند تمرین و ممارست است. به هر حال برای تهیهٔ گسترش خونی نازک زاویهٔ بین دو تیغه را کمتر کنید و برای تهیهٔ گسترش ضخیم‌تر زاویه بین دو تیغه را افزایش دهید.

باید توجه داشت در مواردی نظیر کم‌خونی‌ها برای تهیهٔ گسترش مناسب سعی کنیم قطرهٔ خون بزرگ‌تری را انتخاب کنیم و هنگام ایجاد گسترش زاویهٔ بین دو تیغه را افزایش دهیم.

وسایل کار:

دو عدد تیغه یک‌بار مصرف تمیز، پنبه،





الکل، لانست، متانول، رنگ گیمسا.

روش کار:

ابتدا نوک انگشت را با پنبهٔ آغشته به الکل ضدعفونی می‌کنیم. بعد با یک ضربهٔ لانست نوک انگشت را سوراخ می‌کنیم تا خون خارج شود.

روش گسترش دادن:

نمونه خون را با مادهٔ ضد انعقاد EDTA به آرامی و به خوبی مخلوط می‌کنیم و سپس از نمونه به کمک لولهٔ مویینه مقداری خون می‌گیریم و یک قطره از خون را در یک سانتیمتری انتهای تیغه قرار می‌دهیم. لبهٔ تیغه دیگر را با زاویهٔ ۳۰-۴۵ درجه روی قطرهٔ خون قرار می‌دهیم. لحظه‌ای بعد خون در سرتاسر لبه تیغه دوم (فصل مشترک دو تیغه) انتشار می‌یابد. اکنون تیغه را با یک فشار ملایم و با سرعت یکنواخت در سطح تیغه اول به سمت جلو حرکت می‌دهیم و یا در سمت دیگر به عقب می‌کشیم. در پایان صبر می‌کنیم تا گسترش خونی در هوای آزمایشگاه خوب خشک شود سپس روی سطح تیغه خونی قطره قطره الکل متانول می‌ریزیم. به طوری که الکل تمام سطح تیغه خونی را فرا گیرد. صبر می‌کنیم تا الکل روی سطح تیغه خشک شود. (این عمل را ثابت کردن تیغه خونی با الکل گویند).

رنگ‌آمیزی:

اول روی واقعی تیغه خونی را مشخص می‌کنیم و برچسب می‌زنیم (همان طرف تیغه که گسترش خونی دارد و با الکل ثابت کرده بودیم)

رنگ گیمسا را در یک ظرف به نسبت یک به ده رقیق می‌کنیم (۱CC رنگ + ۹CC آب) و سپس از رنگ رقیق شده روی تیغه می‌ریزیم. بعد از گذشت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه رنگ روی تیغه را دور می‌ریزیم. برای این کار تیغه را زیر شیر آب با جریان ملایم می‌گیریم تا رنگ‌های اضافی خوب شسته شود. حالا سلول‌های خونی روی تیغه رنگ گرفته‌اند. می‌گذاریم تیغه خشک شود. سپس روی تیغه یک قطره روغن ایمرسیون می‌چکانیم بعد زیر میکروسکوپ با عدسی شیئی ×۱۰۰ تیغه را مورد مطالعه قرار می‌دهیم. در تمام مراحل باید مواظب باشیم که تیغه را پشت و رو نگذاشته باشیم. در پایان تیغه به رنگ آبی متمایل به بنفش تبدیل می‌شود.

نکاتی در مورد تیغه‌ها:

۱. باید از تیغه‌های تمیز و عاری از چربی استفاده کرد.

۲. لبهٔ تیغه (rode) باید صاف باشد و بعد از تهیهٔ هر گسترش در پایان هر کدام از مراحل آزمایش باید لبه تیغه (rode) را با یک پارچه مرطوب تمیز کنیم تا از هر گونه لکه خون پاک شود و به نمونه و آزمایش‌های بعدی خللی وارد نشود.

نکته: در هنگام رنگ‌آمیزی و تهیهٔ محیط کشت خطاهایی صورت می‌گیرد. بنابراین برای جبران آن به نکات زیر در مراحل مختلف توجه کنید.

علت‌های ایجاد خطا در تیغه‌های رنگ‌آمیزی شده برای شمارش افتراقی

الف) در موقع نمونه‌گیری:

۱. کشیدن سریع خون در سرنگ در هنگام خون‌گیری باعث تجزیهٔ گلبول‌های قرمز می‌شود.

۲. اگر اندازه سوزن سرنگ طویل‌تر و نازک‌تر باشد، باعث تجزیهٔ گلبول‌ها می‌شود.

۳. فشار زیاد در هنگام انتقال خون به لوله باعث تغییر شکل گلبول‌ها می‌شود. برای این کار سوزن را از سرنگ جدا و خون را به آرامی به جدار داخل لوله وارد می‌کنیم. و سپس مادهٔ ضدانعقاد را به آرامی با آن مخلوط می‌کنیم.

۴. اگر درون لوله‌ها به مقدار بسیار کمی مواد پاک‌کننده و شوینده از شست‌وشوی قبل وجود داشته باشد، یا لوله ضدعفونی و تمیز نباشد، خون همولیز خواهد شد، یعنی هموگلوبین از گلبول‌های قرمز خارج خواهد شد.

ب) ماده ضدانعقاد:

۱. مادهٔ EDTA ماده ضدانعقاد مناسب برای آزمایش (CBC) است و در استفاده از مقدار کم ماده ضدانعقاد سبب ایجاد ذرات لخته و خطا در آزمون می‌شود.

۲. استفاده از مقدار زیاد مادهٔ ضدانعقاد باعث چروکیدگی و تغییر در شکل گلبول‌های قرمز می‌شود.

نکته ۱: مقدار زیاد مادهٔ ضدانعقاد باعث کاهش حجم متوسط گلبول‌های قرمز می‌شود و در اصل کاهش (MCV) را در پی دارد.

نکته ۲: اگر خون با ماده ضدانعقاد EDTA (اتیلن دی امین ترا استیک اسید) مدت بیشتری در تماس باشد، تغییراتی در شکل گلبول‌ها ایجاد می‌شود.

پ) زمان:

۱. تاخیر در تثبیت کردن نمونه آزمایش باعث تغییر شکل و تغییر اندازه گلبول‌ها می‌شود.

ج) رنگ‌آمیزی

۱. باز ماندن در ظرف رنگ که باعث تغییر PH رنگ و خطا در آزمایش می‌شود.

۲. اگر رنگ صاف نشده باشد، رسوبات آن در طی رنگ‌آمیزی ایجاد مشکل می‌کند.

۳. تأخیر در رنگ‌آمیزی باعث خشک شدن رنگ روی تیغه در طی رنگ‌آمیزی می‌شود.

۴. استفاده از تیغه‌ای که در آزمایش‌های قبلی رنگ‌آمیزی به‌طور کامل و مناسب شسته نشده در نتیجه آزمایش مؤثر است.

د) فوت کردن:

قبل از فیکس کردن فوت کردن به نمونه برای خشک کردن یا استفاده از پنکه با دور بالا باعث تجمع هموگلوبین در وسط گلبول‌های قرمز و ایجاد نقطه تاریک روی تیغه می‌شود.

منابع

۱. طباطبایی، سید محمود و عبدالهی محمد رضا، ۱۳۸۸، اصول زیست‌شناسی، انتشارات نیک ملکی، تهران

۲. نشریه الکترونیکی زیست‌شناسی تبریز

۳. وبگاه زیست‌شناسان بدون مرز