[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم النشر: SA 01220457 A
[43] تاريخ النشر: 1426/11/01هـ
الموافــــق: 2005/12/03م

[12] طلب براءة اختراع

[51] التصنيف الدولي :
Int. CL.: G01N 033/050

[30] بيانات الأسبقية :
US 09/080,016 1998/05/15

[72] اسم المخترع : توشيهيرو ميزوكامي، مونيتاكا اشياما، تاكاشئ ساكاتا

[71] مقدم الطلب : سيسمكس كوربوريشن
العنوان : 1-5-1 ، واكينوهاما - كايجاندوري ، شو - كو ، كوبي - شي الرمز البريدي : 651-0073 هيوجو، اليابان
الجنسية : يابانية

[74] الوكيل :
مكتب الدكتور العوفي للاستشارات القانونية د. صالح بن عبدالله العوفي ش

[21] رقم الطلب : 01220457

[22] تاريخ الايداع : 1422/07/28هـ
الموافق : 2001/10/15م

[54] اسم الاختراع :كاشف وطريقة تصنيف الكريات البيضاء وعدها .

Reagent and method for classification and counting of leukocytes.

[57] الملخص: كاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها يحتوي على صبغة واحدة على الأقل وله الصيغة التركيبية التاليةحيث تدل R1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل ، وتمثل كل من R2 و R2 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة وتمثل R4 ذرة هيدروجين، مجموعة أسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين ، ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n على صفر ، ١ أو ٢ ، وتدل X على أنيون ، وترتبط بالتحديد ب RNA لزيادة شدة الفلورية ، وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها والتي تستخدم الكاشف ، وبذلك يتم تصنيف الخلايا غير الطبيعية مثل الكريات البيضاء غير الناضجة والكريات البيضاء غير الطبيعية وعدها بسهولة وبدقة متناهية ، وفي نفس الوقت يمكن القيام بعملية تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وعدها وكذلك عد الكريات البيضاء .

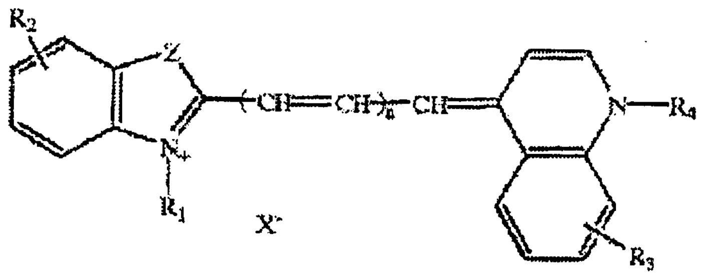
هذا الطلب يتم نشره كما ورد من مقدم الطلب ولم يتم منح براءة اختراع عنه حتى تاريخه
ولا تتحمل المدينة أي مسؤولية بشأن محتوياته

بسم الله الرحمن الرحيم

كاشف وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها

الملخص

كاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها يحتوي على صبغة واحدة على الأقل وله الصيغة التركيبية التالية



حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل ، وتمثل كل من R_2 و R_2 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة وتمثل R_4 ذرة هيدروجين، مجموعة آسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين ، ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n على صفر ، ١ أو ٢ ، وتدل X^- على أنيون ، وترتبط بالتحديد بـــ RNA لزيادة شدة الفلورية ، وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها والتي تستخدم الكاشف ، وبذلك يتم تصنيف الخلايا غير الطبيعية مثل الكريات البيضاء غير الناضجة والكريات البيضاء غير الطبيعية وعدها بسهولة وبدقة متناهية ، وفي نفس الوقت يمكن القيام بعملية تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وعدها وكذلك عد الكريات البيضاء .

كاشف وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها

الوصف الكامل

خليفة الإختراع :

يتعلق هذا الإختراع بكاشف وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها بواسطة عد الكريات الإنسيابي .

في مجال الفحص المختبري ، يستطيع تصنيف الكريات البيضاء وعدها اعطاء معلومات مفيدة للغاية هو لتشخيص مرض ، فعلى سبيل المثال ، يشمل الدم المحيطي الطبيعي عادةً خمسة أنواع طبيعية من الكريات البيضاء ، أي كريات ليمفية ، كريات وحيدة النواة ، كريات بيضاء صبوغة بالأصباغ المتعادلة ، كريات بيضاء حمضة وكريات بيضاء تألف الصبغات الأساسية ، بنسب ثابتة . في حالة وجود مرض ، يمكن أن تتفاوت نسب هذه الكريات البيضاء . ومقياس نسب الأنواع المختلفة من الكريات البيضاء بواسطة تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وعدها ، مفيدٌ للحصول على معلومات عن المرض .

ووفقاً لنوع المرض ، فان الكريات البيضاء اوالحمراء غير الناضجة ، والتي عادةً توجد في مخ العظام وليس في الدم المحيطي ، مثلاً الكريات المُحببة غير الناضجة مثل الأرومات النخايعة أو طليعات الخلايا النقيية أو الخلايا النخاعية أو الخلايا النخاعية المتغيرة ، وأرومات الكريات الحمراء ، يمكن أن تظهر في الدم المحيطي بالإضافة إلى هذه الكريات البيضاء الطبيعية. والكريات البيضاء غير الطبيعية ، مثل الأرومات الليفماوية ، الكريات اللمفية غير النمطية أو الكريات اللمفية غير الطبيعية ، يمكن أيضاً أن تظهر ، ويُعتبر كشف هذه الخلايا وتصنيفها وعدها ذات أهمية قصوى لتشخيص الأمراض .

ولتصنيف الكريات البيضاء ، يوجد هناك أسلوب معتاد لتحضير مسحة دم وصبغها بدرجة مناسبة ومراقبة العينة المصبوغة مجهرياً لأجل التصنيف والعد . في السنوات الأخيرة ، تم تقديم عُدادات للكريات البيضاء تفاضلية وآلية بالكامل قائمة على أساس مقياس كريات انسيابي. وتسمح هذه الأجهزة بالتصنيف الدقيق بدرجة مرتفعة للكريات البيضاء الطبيعية ولكنها

لم تمكن من تصنيف الخلايا غير الطبيعية السابقة وعدها ، مثل الكريات البيضاء غير الناضجة ، في نفس الوقت مع تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وعدها .

فعلى سبيل المثال ، قُدم كاشف وطريقة واللذان يكشفا ظهور الكريات البيضاء غير الطبيعية بدقة وبدرجة مرتفعة بواسطة عامل قياس DC/RF (طلب براءة الإختراع اليابانية غير المفحوص رقم ٢٧٣,٤١٦-٢) - تقيس طريقة هذا الطلب الكريات البيضاء الناضجة كهربائياً باستخدام طبيعتها والتي تحت ظروف معينة تكون أقل قابلية للتلف من الكريات البيضاء الطبيعية. ولقد أُقترح أيضاً أنه يمكن القيام بقياسها علىأساس معلومات الضوء المستطير منها ، غير أن هذه الطريقة تهدف فقط إلى كشف الكريات البيضاء غير الناضجة ولها أداء ممتاز في عملية كشفها ، ولكن لا تستطيع تصنيف الكريات البيضاء وعدها في وقت واحد مع قياس الكريات البيضاء غير الناضجة . وينبغي اجراء طريقة بديلة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها .

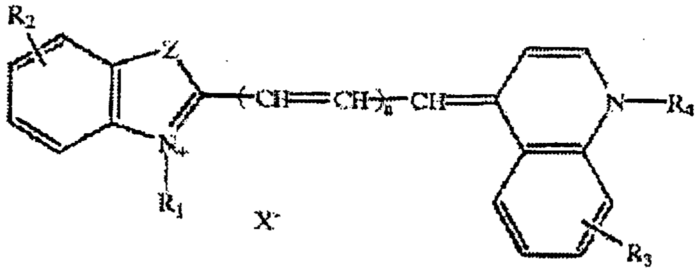
وتستخدم طريقة مختلفة تم تقديمها ، عامل قياس الفلورية لتصنيف الكريات البيضاء غير الناضجة وعدها في نفس الوقت مع تصنيف الكريات البيضاء إلى أربعة تجمعات مختلفة (طلب براءة الإختراع اليابانية غير المفحوص رقم ٢٠٧,٩٤٢-٦) . وبهذه الطريقة ، يمكن تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية في أربعة تجمعات فقط في نفس الوقت ، وتحتاج الخلايا البيضاء التي تألف الصبغات الأساسية ، إلى أن تُقاس بصورة منفصلة بأسلوب مختلف . وأيضاً تحتاج مجموعة من اشارات الفلورية إلى أن تُقاس ، ويتطلب ذلك جهازاً معقداً ومرتفع القيمة .

وأيضاً لقد تم تقديم طريقة لتصنيف كريات بيضاء غير ناضجة متنوعة وعدها ، في نفس الوقت حيث تم تصنيف الكريات البيضاء في خمسة تجمعات (طلب براءة الإختراع اليابانية غير المفحوص رقم ٣٤,٢٥١-٥) . وتتطلب هذه الطريقة جهاز كشف معقد لتصنيف الكريات البيضاء في خمسة تجمعات . وأيضاً يلزم توافر نوعين من معلومات الفلورية وبالتالي جهازاً كبيراً مرتفع القيمة .

وصف عام للإختراع :

أحد أهداف هذا الإختراع هو تقديم كاشف وطريقة قادرين على تصنيف الخلايا غير الطبيعية وعدها ، مثل الكريات البيضاء غير الناضجة والكريات البيضاء غير الطبيعية ، بسهولة وبدقة مرتفعة ، وفي نفس الوقت القيام بعملية قياس الكريات البيضاء الطبيعية وعدها وكذلك عد الكريات البيضاء .

لقد وجد مخترع هذا الطلب أنه يمكن تصنيف الكريات البيضاء في ٥ تجمعات على الأقل بسهولة باستخدام صبغة معينة ، أي أن هذا الإختراع يحتوي على صبغة واحدة على الأقل والتي لها الصيغة التركيبية التالية :

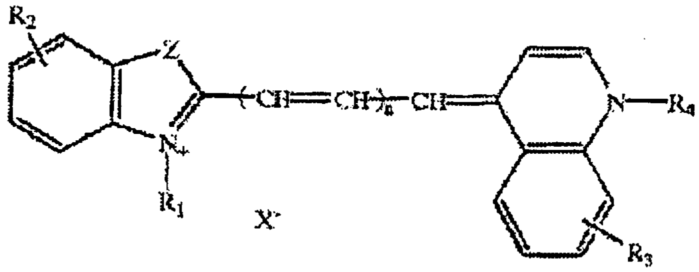


حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل ، وتمثل كل من R_2 و R_2 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة وتمثل R_4 ذرة هيدروجين، مجموعة آسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين ، ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n على صفر ، ١ أو ٢ ، وتدل X^- على أنيون ، وترتبط بالتحديد بـــ RNA لزيادة شدة الفلورية .

وطريقة لتصنيف الكريات البيضاء وفق هذا الإختراع تشمل الخطوات :

١) خلط عينة دم مع عامل حال للدم والذي يحل الكريات الحمراء بعينة الدم إلى مثل هذه الدرجة التي لا تعوق عملية القياس ، وبذلك جعل الخلايا الطبيعية وغير الطبيعية في حالة مناسبة للإصطباغ ؛

٢) خلط عينة محضرة بالخطوة ١) مع صبغة بالصيغة التركيبية التالية .



حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل وتمثل كل من R_2 و R_3 ذرة هيدروجين، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة ، وتمثل R_4 ذرة هيدروجين ، مجموعة آسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كريت ، ذرة اكسجين أو ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n على صفر ، ١ أو ٢ وتمثل X^- أنيون ، وترتبط بالتحديد

بـــ RNA الخلوي لزيادة شدة الفلورية ، وبالتالي الصباغة بالفلورية للخلايا ذات النواة في عينة الدم ؛

٣) قياس عينة اختبار محضرة بالخطوة ٢) بمقياس كريات انسيابي لقياس ضوء مستطير واحد على الأقل وفلورية واحدة على الأقل ؛ و

٤) تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية إلى خمسة تجمعات على الأقل وعدها ، باستخدام الإختلافات في الضوء المستطيرة والفلورية المقاسة بالخطوة ٣) .

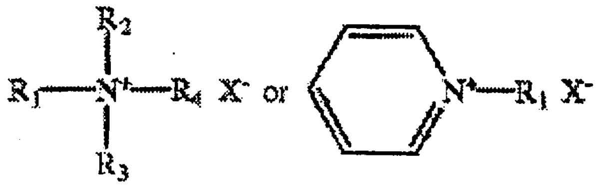
تشير عينة الدم بالإختراع إلى عينة سائلة من الجسم تحتوي على كريات بيضاء ، مثل الدم المحيطي أو سائل مخ العظام أو البول أو عينة دم مجمعة بواسطة بتر أو فصل .

تشير الخلايا غير الطبيعية إلى خلايا غير ناضجة توجد عادةً في مخ العظام وليس في الدم المحيطي ، مثلاً كريات بيضاء غير ناضجة شاملة الكريات المُحببة مثل الأرومات النخاعية أو طليعات الخلايا النفيية أو الخلايا النخاعية أو الخلايا النخاعية المتغيرة ، وكريات بيضاء غير طبيعية مثل الخلايا الليمفية غير النمطية أو الأرمات الليمفية أو كريات بيضاء مصبوغة بالصبغات المتعادلة غير طبيعية ، وارومات كريات حمراء (خلايا دم حمراء ذات نواة NRBC) أو الخلايا التي لا توجد عادةً في الدم المحيطي .

وهناك خطوة خلط عينة دم مع عامل حال للدم والذي يحل الكريات الحمراء في عينة الدم إلى مثل هذه الدرجة التي لا تعوق عملية القياس وبذلك جعل الخلايا الطبيعية وغير الطبيعية في حالة مناسبة للإصطباغ ، حيث تشير أحد خطوات هذا الإختراع إلى خلط عينة دم بعامل حال للدم مناسب . وتهدف هذه الخطوة فقط إلى تكوين ثقوب بغشاء خلية الكرية البيضاء المراد قياسها، وتكون الثقوب ذات حجم كافٍ لمرور جزيئيات الصبغة على الأقل خلالها . والعامل الحال للدم المُستخدم لهذا الغرض هو محلول مائي بالرقم الهيدروجيني من ٤,٥ إلى ١١,٠ ويُفضل من ٥,٠ إلى ١١٠,٠ ، والذي يحتوي على خافض توتر سطحي كاتيوني واحد على الأقل ، وخافض توتر سطحي غير أيوني واحد على الأقل ومنظم للحفاظ على رقم هيدروجيني ثابت .

وكخافض توتر سطحي ، يُفضل خافض توتر سطحي من نوع ملح أمونيوم رباعي أو خافض توتر سطحي من نوع ملح بيريدينيوم . وأمثلة خافض التوتر السطحي من نوع ملح

أمونيوم رباعي أو خافض التوتر السطحي من نوع ملح بيريدينيوم هي خافضات التوتر السطحي التي بها من ٩ إلى ٣٠ ذرة كربون تعبر عنها الصيغة :



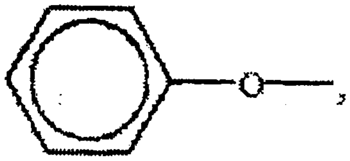
حيث تمثل R_1 الكيل أو مجموعة الكينيل لها من ٦ إلى ٨ ذرة كربون وتمثل كل من R_2 و R_3 الكيل أو مجموعة الكينيل بها من ١ إلى ٤ ذرات كربون وتمثل R_4 الكيل أو مجموعة الكينيل بها من ١ إلى ٤ ذرات كربون أو مجموعة بنزيل وتدل X على ذرة هالوجين .

وحيث أن R_1 تمثل الكيل أو مجموعة الكينيل بها من ٦ إلى ١٨ ذرة كربون ، فإنه يمكن تمثيل هيكسيل ، أُكتيل ، ديسيل ، ودوديسيل أو ثالثي ديسيل . وتُفضل مجموعة الكيل ذات سلسلة مستقيمة مثل أكتيل ، ديسيل أو دوديسيل على وجه الخصوص . وأمثلة R_2 و R_3 التي تدل على مجموعة الكيل أو الكينيل بها من ١ إلى ٤ ذرات كربون هي ميثيل ، إيثيل ، بروبيل وبيوتيل . وتُفضل على وجه الخصوص مجموعة الكيل بها من ١ إلى ٣ ذرات كربون مثل ميثيل ، إيثيل أو بروبيل . وحيث R_4 تمثل الكيل أو مجموعة الكينيل بها من ١ إلى ٤ ذرات كربون ، فان الميثيل أو الايثيل أو البروبيل أو البيوتيل يمكن أن ترد على سبيل المثال . وتُفضل بالتحديد مجموعة الكيل بها من ١ إلى ٣ ذرات كربون مثل ميثيل ، إيثيل أو بروبيل .

وكخافض توتر سطحي غير أيوني ، يُفضل خافض التوتر السطحي غير الأيوني بسلسلة بولي أُكسي الإيثيلين بالصيغة التالية :

$$R_1\text{-}R_2\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}H$$

حيث تدل R_1 على مجموعة الكيل ،الكينيل أو الكانيل بها من ٨ إلى ٢٥ ذرة كربـــــون و R_2 تمثل -O- ،



أو -COO ، وتدل n على عدد صحيح من ١٠ إلى ٥٠ .

لا يوجد هناك قيد على تركيب العامل الحال للدم ، ولكن يُفضل استخدام العوامل الحالة للدم المبينة بطلبي براءتي الإختراع اليابانيتين غير المفحوصين رقمي ٢٠٧,٩٤٢-٦ و ١٨١,١٧٧-٧ على سبيل المثال .

وفوق ذلك ، يُفضل أن يتضمن العامل الحال للدم ، حمض عضوي واحد على الأقل به حلقة عطرية واحدة على الأقل في جزيئي أو ملح منه بغرض ضبط توزيع شدة الضوء المستطيرة للكريات البيضاء لتكون مناسبة أكثر للتصنيف . فمثلا ، يُفضل استخدام حامض بنزيوك ، حامض فثاليك ، حامض هيبوريك ، حامض ساليسايليك ، حامض أمينو بنزين السلفونيك الفوسفوري أو حمض بنزين السلفونيك أو ملح من أي من هذه الأحماض ، كحامض عضوي أو ملحه . وادخال حامض عضوي يزيد من شدة الضوء المستطير للكريات البيضاء الحمضة وفعلياً يحسن انفصال الكريات البيضاء الحمضية عن الكريات البيضاء الصبوغة بالأصباغ المتعادلة ، فعلى سبيل المثال ، يُستخدم الضوء المستطيرة الجانبي فقط جوهرياً لتمكين تصنيف الكريات البيضاء في ٤ تجمعات .

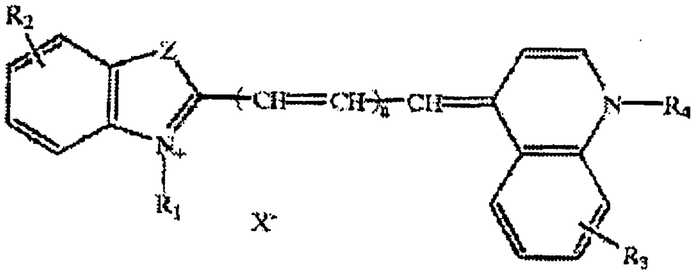
و الرقم الهيدروجيني للعامل الحال للدم هو من ٤,٥ إلى ١١,٠ و يُفضل من ٥,٠ إلى ١٠,٠ ، وللحفاظ على رقم هيدروجيني ثابت يتم ادخال منظم مثل السترات ، HEPES أو الفوسفات في العامل الحال للدم وعندما يعمل الحامض السابق كمنظم ، فان المنظم المذكور لا يعتبر مكوناً لازماً بالكامل . وفي حالة إذا كان الرقم الهيدروجيني منخفضاً للغاية ، فإن الكريات البيضاء الحمضة والخلايا البيضاء التي تألف الصبغات الأساسية ، تُفصل بصورة ضعيفة ويصبح من الصعب تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية في ٥ تجمعات ، غير أنه يمكن تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية في ٣ فئات (خلايا ليمفية ، كريات وحيدة النواة ، كريات محببة) وتصنيف الكريات البيضاء الناضجة و الكريات البيضاء غير الطبيعية وعدها .

لا يُفضل الرقم الهيدروجيني المرتفع للغاية ، لأنه سوف يجعل الكريات البيضاء تتلف .

وبالنسبة للصبغة التي ترتبط بالتحديد بالحمض الريبي النووي RNA الخلوي لتزيد في شدة الفلورية ، فإنه يمكن استخدام صبغة لها شدة فلورية منخفضة في بيئة خالية من RNA وتزيد في شدة الفرورية بالإرتباط بـــ RNA .

ومعظم الخلايا غير الطبيعية مثل الكريات البيضاء غير الناضجة أو الكريات البيضاء غير الطبيعية تكون غنية بالحمض الريبي النووي RNA مقارنة بالكريات البيضاء الطبيعية . والكريات البيضاء غير الناضجة ، مثلاً هي خلايا في طريقها للنضوج ومن ثم تقوم بنشاطات انتاجية عديدة مرتبطة بنضوج الخلية (مثلاً ، الإصطناع البروتيني) حتى يكون بها وفرة من RNA .

وللإستخدام في كاشف وطريقة هذا الإختراع لتصنيف الكريات البيضاء وعدها ، تُفضل أي من الصيغات التالية :



حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل ، وتمثل كل من R_2 و R_3 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة ، وتمثل R_4 ذرة هيدروجين ، مجموعة أسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين أو ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n علىصفر ، ١ أو ٢ وتمثل X^- أنيون .

للصبغات السابقة خاصية زيادة شدة الفلورية بصـــورة ملحوظة بواسطة الإرتباط بـــ RNA .

وعلى غير المتوقع ، فان استعمال هذه الصبغات يمكن من تصنيف الخلايا البيضاء التي تألف الصبغات الأساسية ، في وقت واحد .

وكما هو مبين أعلاه تزيد هذه الصبغات شدة الفلورية (بالتحديد) عند الإرتباط بـــ RNA ولكنها غالباً تزيد شدة الفلورية حتى عند الإرتباط بـــ RNA .

ويمكن كذلك استخدام الصبغات الخاصة بـــــ DNA في هذا الإختراع . غير أن إشارات الفلورية من DNA تُركب فوق اشارات الفلورية من RNA وتسبب ميولاً نحو تقليل الفروق في شدة الفلورية بين الكريات البيضاء الطبيعية و الكريات البيضاء الناضجة أو الكريات

البيضاء غير الناضجة . ومن ثم لتحقيق هدف هذا الإختراع ، تُفضل الصبغات بألفة منخفضة (ألفة الضد) لـــ DNA ، بصورة أكثر .

ولتقليل تأثير ارتباطها بـــ DNA وتعزيز ألفة الضد الخاصة بها بـــ RNA ، قمنا باصطناع تلك الصبغات الخاصة بالصبغات السابقة حيث أن واحد من R_1 و R_4 على الأقل يدل على مجموعة الكيل ذات سلسلة طويلة (عدد ذرات كربون من ٦ إلى ١٨) . واستخدمنا هذه الصبغات لتصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وغير الطبيعية وعدها .

ونتيجة لذلك ، لقد وجد أنه برغم أن أسلوب العمل غير واضح ، فان الصبغات السابقة لا تستطيع المرور خلال الغشاء النووي للخلايا بسبب وجود مجموعة الكيل ذات سلسلة طويلة في تركيبها الجزيئي ، أو أن ارتباطها بجزيئات DNA يُثبط بسبب الإعاقة التجسمية الخاصة بها . ومن ثم وجد أن هذه الصبغات تستلزم زيادة فلورية صغيرة بسبب DNA وتعطي ميزة أن الفلورية المنسوبة أساساً إلى RNA يمكن قياسها . وبالتالي يمكن تحسين فصل الخلايا غير الطبيعية ، مثل الكريات البيضاء غير الناضجة أو الكريات البيضاء غير الطبيعية ، عن الكريات البيضاء الطبيعية بدرجة ملحوظة .

وكلما كان طول السلسلة أكبر (عدد ذرات الكربون) لمجموعة الألكيل ذات السلسلة الطويلة ، كلما كانت الزيادة في شدة الفلورية بسبب أخماد DNA ، وكلما أصبحت الألفة المضادة لـــ RNA أعلى . ومن ناحية أخرى ، تميل السلسلة الطويلة إلى جعل الجزيئ كاره للماء أكثر . ومن ثم تصبح الصبغات قابلة للذوبان في الماء بصورة ضعيفة ويكون من الصعب معالجتها على الرغم من استخدامها . وبالنظر إلى هذه الحقائق ، فان الصبغات التي فيها تدل R_1 أو R_4 على مجموعة الكيل بها ٦ ، ٨ أو ١٠ ذرات كربون ، تكون مفضلة .

تشير مجموعة الألكيل المنخفضة أو مجموعة الكوكسي المنخفضة لـــ R_1 و R_2 إلى مجموعة الكيل أو الكوكسي ذات سلسلة طويلة بها من ١ إلى ٨ ذرات كربون . والأمثلة المفضلة هي ميثيل ، ميثوكسي ، إيثيل وايثوكسي .

الانيونات المفضلة مثل X^- تشمل ايونات هالوجين مثل F^- ، Cl^- ، Br^- ، I^- ، $CF_3SO_3^-$ و BF_4^- .

الأمثلة المفضلة لـــ Z هي ذرة كبريت ، ذرة اكسجين ، اوذرة كربون مُستبدلة بواسطة مجموعة الكيل منخفضة مثل ميثيل ، إيثيل أو ايزوبروبيل .

يختلف تركيز الصيغة وفقاً لنوع الصبغة المُستخدمة . وعموماً يكون تركيزها من ٠,٠٠١ إلى ١,٠٠٠ جزء في المليون و يُفضل من ٠,٠١ إلى ١٠٠ جزء في المليون وأكثر تفضيلاً من ٠,١ إلى ١٠ جزء في المليون . وهذا التركيز هو تركيز في الكاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها ، وعند تحضير محلول الإصطباغ والعامل الحال للدم بصورة مستقلة ، فان التركيز يشير إلى التركيز في خليط محلول الإصطباغ والعامل الحال للدم .

يمكن تحضيرالكاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها ، في هذا الإختراع ، بواسطة إذابة الصبغة السابقة في مذيب عضوي قابل للذوبان في الماء مثل جليكول الايثيلين ، الميثانول أو DMSO وتخزين المحلول كمحلول اصطباغ واضافته ، عند الإستخدام ، إلى عينة مُحضرة بخلط عينة مع العامل الحال للدم . وعلى نحو بديل ، يمكن ادخال الصبغة في العامل الحال للدم لتصنيع كاشف بمكون واحد .

ويتم قياس عينة الإختبار المُحضرة هكذا بمقياس الكريات الإنسيابي لتحديد ضوء مستطير واحد على الأقل وفلورية واحدة على الأقل .

يشير الضوء المستطير في هذا الإختراع إلى الضوء المستطير الذي يمكن قياسه بمقياس كريات انسيابي متوفر تجارياً . يشمل هذا الضوء المستطير ، مثلاً ضوء مستطير جانبي ، ضوء مستطير بزاوية صغيرة أمامي (زاوية استقبال الضوء : تقريباً من صفر إلى ٥'درجات) ، وضوء مستطير بزاوية مرتفعة أمامي (زاوية استقبال الضوء : تقريباً من ٥ إلى ٢٠ درجات) . ويتم انتقاء ضوء مستطير له زاوية الإستطارة هذه فيما يتعلق باعطاء معلومات عن أحجام الكريات البيضاء وتركيبها الداخلي ، كضوء مستطير لهذا الإختراع . ويُعتبر الضوء المستطير الجانبي هو الأفضل .

واستخدام نوع واحد أو أكثر للضوء المستطير ، يمكن أن يزيد دقة التصنيف .

واستخدام ضوء مستطير بزاوية صغيرة ، بالتحديد ، يعطي معلومات عن أحجام الخلايا. فمثلا ، يُمكن استعماله هذا الإختراع من كشف الخلايا غير الطبيعية المتغيرة فقط في الحجم ولا يستلزم زيادة في مضمون RNA كما في لوكيما الخلايا الأشعرية .

واستخدام ضوء مستطير بزاوية مرتفعة أمامي ، من ناحية أخرى ، يعطي المعلومات المتوسطة بين تلك التي يتم الحصول عليها باستخدام ضوء مستطير بزاوية منخفضة أمامي والمعلومات التي يتم الحصول عليها باستخدام ضوء مستطير جانبي . وبايجاز ، يتم الحصول على المعلومات بما في ذلك معلومات عن حجم الخلية وتركيبها الداخلي .

وتبتعث الفلورية من الصبغة المرتبطة بمكونات الخلية مثل RNA و DNA . ووفقاً لنوع الصبغة يتم انتقاء الطول الموجي المفضل للضوء المطلوب استقباله .

ولا يكون مصدر الضوء لمقياس الكريات الإنسيابي محدوداً ولكنه يمكن أن يكون مصدر ضوء بطول موجي مناسب لإستثارة الصبغة . فمثلا يتم استخدام ليزر ارجون ، ليزر He-Ne ، ليزر شبه موصل احمر ، أو لمبة قوسية زئبقية . وبالتحديد يُفضل الليزر شبه الموصل لأنه مرتفع القيمة وصغير الحجم للغاية مقارنة بالليزر الغازي . ومن ثم يستطيع تخفيض تكاليف المعدات بصورة ملحوظة وكذلك تخفيض حجم المعدات .

لخطوة " تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية في ٥ تجمعات على الأقل وعدها ، باستخدام الفرق في الضوء المستطير والفلورية المقاسة " المحتويات التالية : (١) عند رسم المخطط الإحصائي (رسم بياني لتوزيع ثنائي الأبعاد) مع ضوء مستطير جانبي فوق المحور X والفلورية الحمراء فوق المحور y ، مثلاً ، تكون خلايا الدم البيضاء مقسمة في تجمعات الخلايا المتعلقة . (٢) يتم تحليل تجمعات الخلايا هذه ببرنامج كمبيوتر تحليلي مناسب لحساب أعداد الكريات البيضاء بتجمعات الخلايا ونسب تجمعات الخلايا المتعلقة . فمثلا ، يتم توفير نافذة تحيط بكل تجمع خلوي ، ويتم عد الخلايا في كل نافذة ، وبذلك يمكن حساب عدد الخلايا في تجمع للكريات البيضاء ونسب تجمعات الكريات البيضاء المتعلقة .

وعند عدم استخدام كاشف وطريقة هذا الإختراع ، فلا يمكن تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية إلى ٥ تجمعات على الأقل وعدها بواسطة نوع التجمع فقط ، ولكن أيضاً لا يمكن القيام بعملية تصنيف الخلايا غير الطبيعية وعدها في وقت واحد مع تصنيف الخلايا الطبيعية وعدها . والخلايا غير الطبيعية المناسبة للتصنيف والعد باستخدام كاشف وطريقة هذا الإختراع هي خلايا بمحتوى RNA زائد عن الخلايا الطبيعية . فعلى سبيل المثال ، هي (الخلايا غير الطبيعية) عضو أو أكثر منتقى من المجموعة المتكونة من كريات محببة ، ارومات نخاعية ، ارومات كريات حمراء وخلايا ليمفية غير نمطية غير ناضجة .

شكل ٥ : رسم بياني يوضح الارتباط بين النسبة المئويـــة لخلايا ليمفية مقاســـة بطريقة تقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) وتلك المقاسة بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ٦ : رسم بياني يوضح الإرتباط بين النسبة المئوية للكريات البيضاء وحيدة النواة المقاسة بالطريقة التقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) وتلك المقاسة بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ٧ : رسم بياني يوضح الإرتباط بين النسبة المئوية للكريات البيضاء الصبوغة بالأصباغ المتعادلة المقاسة بالطريقة التقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) وتلك المقاسة بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ٨ : رسم بياني يوضح الإرتباط بين النسبة المئوية للكرية بيضاء حمضة مُقاسة بالطريقة التقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبيعية المحدودة) وتلك المُقاسة بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ٩ : رسم بياني يوضح الإرتباط بين النسبة المئوية للخلايا البيضاء التي تالف الأصباغ الأساسية المقاسة بالطريقة التقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبيعية المحدودة) وتلك المُقاسة بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ١٠ : رسم بياني يوضح الإرتباط بين تعداد خلايا الدم البيضاء المحدد بالطريقة التقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبيعية المحدودة) وذلك المجدد بالطريقة للتصنيف والعد بمثال ٣ ؛

شكل ١١ : مُخطط احصائي لفلورية حمراء بضوء مستطير جانبي لعينة مُقاسة باستخدام كاشف مثال ٣ ، وتوضع العينة ظهور كريات محببة (خلايا نخاعية متغيرة ، خلايا نخاعية) غير ناضجة .

شكل ١٢ : مخطط احصائي لفلورية حمراء بضوء مستطيرة جانبي لعينة مُقاسة باستخدام كاشف مثال ٣ ، والعينة توضح ظهور ارومات نخاعية ؛

شكل ١٣ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة مقاسة باستخدام كاشف مثال ٣، والعينة توضح ظهور ارومات كريات حمراء ؛

شكل ١٤ : مخطط احصائي لفلورية حمراء لضوء مستطير جانبي لعينة مقاسة باستخدام كاشف مثال ٣ ، والعينة توضح ظهور خلايا ليمفية غير نمطية وكريات محببة غير ناضجة ؛

شكل ١٥ : مخطط احصائي لفلورية حمراء بضوء مستطير جانبي لعينة طبيعية مُقاسة باستخدام ثيازول بلو كصبغة بمثال ٥ ؛

شكل ١٦ : مخطط احصائي لفلورية حمراء بضوء مستطير جانبي لعينة مُقاسة باستخدام ثيازول بلو كصبغة بمثال ٥ ، والعينة توضح ظهور وكريات محببة غير ناضجة ؛

شكل ١٧ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة طبيعية مقاسة باستخدام مكون صبغة (أ) كصبغة بمثال ٥ ؛

شكل ١٨ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة مُقاسة باستخدام مركب صبغة (أ) كصبغة بمثال ٥ والعينة توضح ظهور وكريات محببة غير ناضجة ؛

شكل ١٩ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة طبيعية باستخدام مركب صبغة (ب) كصبغة في مثال ٥ ؛

شكل ٢٠ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة مقاسة باستخدام مركب صبغة (ب) كصبغة في مثال ٥ ، والعينة توضح ظهور كريات محببة غير ناضجة ؛

شكل ٢١ : مخطط احصائي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة دم من شخص طبيعي مقاسة باستخدام حامض الستريك كحامض بمثال ٦ ؛ و

شكل ٢٢ : مخطط احصائي جانبي لفلورية بضوء مستطير جانبي لعينة دم من شخص طبيعي مقاسة باستخدام حامض الأفثاليك كحامض بمثال ٦ .

<u>الوصف التفصيلي :</u>

سيتم وصف هذا الإختراع بالتفصيل بواسطة الأمثلة التالية ، ولكن يمكن إجراء العديد من التغييرات والتحويرات به . وبالتالي فان نطاق هذا الإختراع لا يقتصر على هذه الأمثلة .

بالرسومات المرفقة يكون للإختصارات المعاني التالية :

Lymph : خلايا ليمفية

Mono : كريات بيضاء وحيدة النواة

Neat : كريات بيضاء صبوغة بالأصباغ المتعادلة

IG : كريات محببةغير ناضجة

NRBC : خلايا دم حمراء ذات نواة أو أرومات كريات حمراء

A-Lymph : كريات بيضاء غير نمطية

Eo : كريات بيضاء حمضة

Baso : خلايا بيضا تألف الصبغات الأساسية

WBC : خلايا دم بيضاء

Blast : أرومات نخاعية

مثال ١ : اصطناع مركب صبغة (أ) :

تم انتاج مركب صبغة (أ) (R_1 = ميثيل ، R_2 ، H=R_3 ، h=R_4 – اكتيل ، 1=n ، S=Z ، X=$CF_3CO_3^-$) بالطريقة التالية : تم تسخين مكافئ ٣- ميثيل -٢- ميثيل بنزو ثيازوليوم ميثانول الكبريت وثلاثة مكافئات من N ، N- ثنائي فينيل الفورماميدين في حامض اسيتيك ، مع التقليب ، لمدة ساعة ونصف فوق حمام زيت بدرجة حرارة ٩٠°م . وصُب خليط التفاعل في هيكسان وأيضاً عُلقت مادة زيتية حمراء وهكسان وغُسلت به لإزالة حامض الأسيتيك. وأعيد تبلر المنتج الخام من اسيتات – هيكسان الايثيل (النتاج : ٤٨%) . أضيف إلى البلورات مكافئ واحد من ١- اكتيل ليبيدينيوم ثلاثي الفلورات والبيريدين ، وسُخن الخليط ، مع التقليب ، لمدة ٣ ساعات فوق حمام زيت بدرجة حرارة ٩٠°م . ورُكز خليط التفاعل ونُقي المنتج الخام الأزرق الباقي مع كلوروفورم الميثانول بواسطة الفصل الكروماتوجرافي الوميْضي (النتاج : ٦٢%) .

في هذه الطريقة ، تم الحصول على مركب الصيغة (أ) (R_1= ميثيل ، R_2 ، H=R_3 ، - h=R_4 اكتيل ، 1=n ، S=Z ، X=$CF_3SO_3^-$) على هيئة مسحوق أزرق غامق معقد .

TLC (جل سيليكا ، ١٠% كلوريد ميثيلين الميثانول) RF= ٠,٥

^1H- الرنيني المغناطيسي النووي ($CDCl_3$) دلتا جزء في المليون (TMS) : ٠,٨٨ (ثلاثية ، ٣ H) ١,٨ (عريضة ، ١٠H) ١,٦٤ (فردية ، ٢ H) ١,٨٢ (عريضة ، ٢ H) ٣,٦٠ (فردية ، ٣H) ٤,٢٣ (ثلاثية ، ٢H) ٦,٣٥ (ثنائية ، ١ H) ٦,٨٢-٧,٢٦ (متعددة ، ٢ H) ٧,٣٩-٧,٩٠ (متعددة ، ٦ H) ٨,١٠-٨,٢٦ (ثنائية مزدوجة ، ٢ H) IR (سم $^{-1}$) : ١٦٢٥ ، ١٥٦٠،

١٥٤٠، ١٥٢٠، ١٤٨٠، ١٤٦٠، –١٤١، ١٤٠٠، –١٣١، –١٢٦، –١٢١، –١١٥، ١١٣٠، ٧٤٠، ٦٤٠

الطيف الكتلي (FAB موجب) إم / زد = ٤٢٩

TLC ٩٥,٧% (١٠% كلوريد ميثيلين الميثانــول) أقصـــى طيف امتصاص ٦٢٩ نانومتر (ميثانول) .

مثال ٢ : اصطناع مركب صبغة (ب) :

أنتج مركب صيغة (ب) (R_1= هيكسيل) ، R_2 ، R_3= H ، R_4= ميثيل ، n = 1 ، Z=S ، X=$CF_3SO_3^-$) بالطريقة التالية :

سُخن مكافئ واحد من ٣ – هيكسيل –٢– ميثيل بنزوثيازوليوم ثلاثي الفلورات واربعة مكافئات من N ، N- ثنائي فينيل الفورماميدين في حامض اسيتيك ، مع التقليب ، لمدة ١٠ ساعات فوق حمام زيت في درجة حرارة ٩٠°م . وركز خليط التفاعل ، ونقى المنتج الخام الباقي باسيتات إيثيل الهكسان بواسطة الفصل الكروماتوجرافي الوميضي (النتاج = ٢٧%) . واضيف إلى المنتج ١,٣ مكافئ من ١– ميثيل ليبيدينيوم اليوديد والبيريدين وسخن الخليط ، مع التقليب ، لمدة ٣ ساعات فوق حمام زيت في درجة حرارة ٩٠°م . وركز خليط التفاعل ونقى المنتج الخام الأزرق الباقي لكلوروفورم الميثانول بواسطة الفصل الكروماتوجرافي الوميضي (النتاج = ٧٥%) .

في هذه الطريقة ، تم الحصول على مركب الصيغة (ب) (R_1= هيكسيل) ، R_2 ، R_3= H ، R_4= ميثيل ، n=1 ، Z=S ، X=$CF_3SO_3^-$) على هيئة مسحوق أزرق غامق معقد .

TCL (جل سيليكا ، ١٠% كلوريد ميثيلين الميثانول) RF= ٠,٥

^{1}H- الرنيني المغناطيسي النووي ($CDCl_3$) دلتا جزء في المليون (TMS) : ٠,٩٠ (ثلاثية ، ٣ H) ١,١٧–١,٨١ (متعددة ، ١٢H) ٤,١٢ (فردية ، ٣ H) ٦,٥٠ (متعددة ، ١ H) ٦,٩٦– ٨,٢٦ (متعددة ، ١٠H) IR (سم $^{-1}$) : ١٦٢٠ ، ١٥٦٠، ١٥٣٠، ١٥١٠، ١٤٨٠، ١٤٦٠، – ١٤١، –١٣٨ ، –١٣١، –١٥٢، ––١٢١، –١١٥، ١١٠٠، –٧٥، –٦٤

الطيف الكتلي (FAB موجب) إم / زد = ٤٠١ TLC ٩٣,٠% (١٠% كلوريد ميثيلين الميثانول) اقصى طيف امتصاص ٦٢٩ نامومتر (ميثانول) .

مثال ٣ : صياغة كاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها :

حضر كاشف بالتركيب التالي :

١٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً	HEPES
٢٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً	ثنائي الصوديوم حامض الافثاليك
BC30TX (بولي أكسي الايثيلين) (٣٠) ايثير السيتيل ١٥٠٠ جزء في المليون (شركة نيكو للكيماويات)	
٥٥٠ جزء في الميون منتج متوفر تجارياً	ثلاثي ميثيل امونيوم اللوريل كلوريد
٠,٥ جزء في المليون	مركب صيغة (أ)
	ضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧,٠ مع HaOH

أضيف إلى ١,٠ مل من الكاشف السابق ، ٣٠ ميكرولتر من دم معالج بمضاد للتجلط من شخص طبيعي ، وتم تفاعل الخليط لمدة ٤٠ ثانية في درجة حرارة ٣٥°م ، ثم قيس تفاعل الخليط للضوء المستطير الجانبي والضوء المستطير بزاوية منخفضة أمامي والفلورية مع مقياس كريات انسيابي كان مصدر الضوء المستخدم ليزر شبه موصل أحمر يعمل عند ٦٣٣ نانومتر . والفلورية المقاسة كانت فلورية بطول موجي يبلغ ٦٦٠ نانومتر أو أكثر (فلورية حمراء) .

شكل ١ هو مخطط احصائي مع ضوء مستطير جانبي مأخوذ على المحور X وفلورية حمراء مأخوذة على المحور y .

شكل ٢ هو مخطط احصائي مع ضوء مستطير بزاوية صغيرة امامي مأخوذ على المحور X وفلورية حمراء مأخوذة على المحور Y .

تم تصنيف الكريات البيضاء في ٥ تجمعات أي ، كريات بيضاء وحيدة النواة ، خلايا ليمفية ، كريات بيضاء صبوغة بالصبغات المتعادلة ، كريات بيضاء حمضة وكريات بيضاء تألف الصبغات الأساسية .

وللعلم ، يوضح شكل ٣ مُخطط احصائي مع ضوء مستطير جانبي مأخوذ على المحور X وضوء مستطير بزاوية صغيرة أمامي مأخوذ على المحور y . في حين أن شكل ٤ يوضح مخطط توزيع التواتر لدرجات شدة الضوء المستطير الجانبي . وتم تصنيف الكريات البيضاء في ٤ تجمعات ، أي ، خلايا ليمفية ، كريات بيضاء وحيدة النواة ، كريات بيضاء صبوغة بالصبغات المتعادلة وكريات بيضاء حمضة .

تم تقديم نافذة لكل تجمع وتم حساب عدد الخلايا في كل نافذة ونسب الخلايا في النوافذ المتعلقة .

الأشكال من ٥ إلى ٩ هي رسوم بيانية توضح الإرتباط بين النسبة المئوية للكريات البيضاء المقاسة بطريقة تقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) وتلك المقاسة بطريقة هذا الإختراع (شكل ١) .

وشكل ١٠ هو رسم بياني يوضح الإرتباط بين تعداد خلايا الدم البيضاء المحدد بطريقة تقليدية (SE-9000 ، شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) وذلك المحدد بطريقة هذا الإختراع (شكل ١) .

ولوحظ ارتباط عال بين أي بارامترات مقاسة بالطريقة التقليدية وتلك المقاسة بطريقة هذا الإختراع .

أُجريت القياسات بالطريقة التقليدية باستخدام الكواشف التالية بطريقة آلية بالكامل بواسطة SE-9000 :

تعداد خلايا الدم البيضاء : المقاس بعد اضافة دم إلى خليط ١:١ من Cellpack-3D (II)™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) و stromatolyzer EO(II) ™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) .

الكريات الليمفية والكريات البيضاء وحيدة النواة = مقاسة بعد انحلال الدم مع Cellpack-3D (II)™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة)، ثم اضافة stromatolyzer EO (II) ™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) .

الكريات البيضاء الحمضة : مقاسة باستخدام stromatolyzer 3D (II) ™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) .

الكريات البيضـــــــاء التـــــــي تألـــــــف الأصبـــــاغ الأساسية مقاسة باستخدام stromatolyzer BA(II) ™ (شركة توا للأجهزة الالكترونية الطبية المحدودة) .

كريات بيضاء صبوغة بالصباغت المتعادلة : محسوبة من المعادلة (تعداد خلايا الدم البيضاء – {(تعداد الكريات الليمفية) + (تعداد الكريات البيضاء وحيدة النواة) + تعداد الكريات البيضاء الحمضة) + (تعداد الكريات البيضاء التي تالف الاصباغ الأساسية) }

مثال ٤ : تصنيف عينات وعدها حيث ظهرت كريات محببة غير ناضجة أو كريات بيضاء غير طبيعية

باستخدام كاشف وطريقة مثال ٣ ، قيست العينات التالية :

عينة ظهرت فيها كريات محببة (خلايا نخاعية متغيرة ، خلايا نخاعية) (شكل ١١) .

٤,٥% للطريقة التقليدية (الفحص الظاهر) ، ٤,٠% لطريقة الإختراع .

عينة ظهرت فيها ارومات نخاعية (شكل ١٢)

٨١,٥% للطريقة التقليدية ، ٨٥,١% لطريقة الإختراع

عينة ظهرت بها ارومات كريات حمراء (شكل ١٣)

٢٥% للطريقة التقليدية ، ٢١,٥ لطريقة الإختراع

عينة ظهرت فيها كريات ليمفية غير نمطية وكريات محببة غير ناضجة (شكل ١٤) .

كريات ليمفية غير نمطية : ٢,٠% للطريقة التقليدية ، ١,٨٩% لطريقة الإختراع

كريات محببة غير ناضجة : ٢,٠% للطريقة التقليدية ، ٢,١٧% لطريقة الإختراع

تم تمييز أي كريات محببة غير ناضجة وكريات بيضاء غير طبيعية ، بوضوح عن الكريات البيضاء الطبيعية وتصنيفها وعدها . طبقاً للطريقة التقليدية تم اصطباغ مسحة مرتين بواسطة اصطباغ May-Grunwald-Giemsa ، وتم تصنيف الكريات البيضاء وعدها مجهرياً (التكبير = X ١,٠٠٠) بـــ ٢٠٠ .

مثال : صياغة كاشف :

١٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً	HEPES
٢٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً	ثنائي الصوديوم افثالات

BC30TX (بولي أكسي الايثيلين) ١٥٠٠ جزء في المليون (شركة نيكو للكيماويات) (٣٠) ايثير السيتيل)

ثلاثي ميثيل امونيوم اللوريل ٥٥٠ جزء في الميون منتج متوفر تجارياً كلوريد

صبغة

ضُبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧,٠ مع HaOH

عند استخدام الصبغة التالية :

($I=n$ ، $I^- = X^-$ ، $S = Z$ ، $H = R_3$ ، R_2 إيثيل $= R_4$ ، $= R_1$) DQTC1

٠,١ جزء في المليون لامبداء فيزيك .

٠,٥ جزء في المليون	مركب صبغة (أ)
٠,٣ جزء في المليون	مركب صبغة (ب)

أضيف إلى ١,٠ مل من الكاشف السابق ، ٣٠ ميكرولتر من دم معالج بمضاد للتجلط وتم تفاعل الخليط لمدة ٤٠ ثانية في درجة حرارة ٣٠°م ، ثم قيس خليط التفاعل للضوء المستطير الجانبي والفلورية بمقياس كريات انسيابي . وكانت عينات الإختبار طبيعية وظهرت التي فيها كريات محببة غير ناضجة . وكان مصدر الضوء المستخدم ليزر شبه موصل أحمر والذي يشتغل عند ٦٣٣ نانومتر . والفلورية المقاسة هي فلورية بطول موجي يبلغ ٦٦٠ نانومتر أو أكثر . وكان مصدر الضوء والطول الموجي للفلورية هو نفسه كما في مثال ٣ .

شكلي ١٥ و ١٦ هما مخططان احصائيان تم الحصول عليهما باستخدام ثيازول بلو .
وشكلي ١٧ و ١٨ هما مخططان احصائيان تم الحصول عليهما باستخدام مركب الصيغة (أ) .
شكلي ١٩و ٢٠ هما مخططان احصائيان تم الحصول عليهما باستخدام مركب الصيغة (ب) .

عندما يدل كل من R_1 و R_4 على مجموعة الكيل منخفضة ، يكون من الصعب التمييز بين الكريات البيضاء الصبوغة بالصباغت المتعادلة الطبيعية والكريات المحببة غير الناضجة . وعند ادخال مجموعة الكيل بسلسلة طويلة ، بالإختلاف ، أصبح من الممكن التمييز بين الكريات البيضاء الصبوغة بالصباغات المتعادلة والكريات المحببة غير الناضجة بوضوح .

مثال ٦ : صياغة كاشف

HEPES	١٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً
BC30TX (بولي أكسي الايثيلين) ١٥٠٠ جزء في المليون (شركة نيكو للكيماويات) (٣٠) ايثير السيتيل)	
ثلاثي ميثيل امونيوم اللوريل ٥٥٠ جزء في الميون منتج متوفر تجارياً كلوريد	
مركب صبغة (أ)	٠,٥ جزء في المليون
حامض	٢٠ مل مولاري منتج متوفر تجارياً
ضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧,٠ مع HaOH	

بالنسبة للحامض ، يُستخدم حامض الستريك أو حامض الأفثاليك . أُضيف إلى ١,٠ مل من الكاشف السابق إلى ٣٠ ميكرولتر من دم معالج بمضاد للتجلط من شخص طبيعي ، وتم تفاعل الخليط لمدة ٤٠ دقيقة بمضاد للتجلط من شخص طبيعي ، وتم تفاعل الخليط لمدة ٤٠ دقيقة في درجة حرارة ٣٥°م . وقيس خليط التفاعل للضوء المستطير الجانبي والفلورية بمقياس كريات انسيابي . وكان مصدر الضوء المستخدم لیزر شبه موصل أحمر والذي يعمل عند ٦٣٣ نانومتر . والفلورية المقاسة كانت فلورية بطول موجي يبلغ ٦٦٠ نانومتر أو أكثر (فلورية حمراء) .

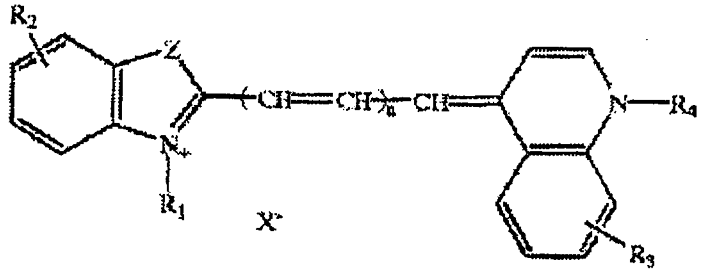
شكل ٢١ هو مُخطط احصائي تم الحصول عليه باستخدام حامض الستريك كحامض ، وشكل ٢٢ هو مخطط احصائي تم الحصول عليه باستخدام حامض الافثاليك كحامض .

وعند استخدام حامض الافثاليك (حامض عضوي به حلقة عطرية في التركيب الجزيئي) كحامض ، تم تحسين فصل الكريات البيضاء الصبوغة بصبغات متعادلة عن الكريات البيضاء الحمضة ، مقارنة باستخدام حامض الستريك .

طبقاً لكاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها بهذا الإختراع ، يتم خلط عينة دم وعامل حال للدم ويُخلطا مع صبغة هذا الإختراع لصبغ الخلايا ذات النواة بعينة الدم . وبعد ذلك تم قياس ضوء مستطير واحد على الأقل وفلورية واحدة على الأقل بمقياس الكريات الإنسيابي . وبوضوح بعمل ذلك ، يمكن تصنيف الخلايا غير الطبيعية مثل الكريات البيضاء غير الناضجة والكريات البيضاء غير الطبيعية ، وعدها بسهولة وبدقة متناهية ، وفي نفس الوقت يمكن إجراء عملية تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية وعدها وكذلك عد الكريات البيضاء .

عناصر الحماية

١.كاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها ، يحتوي على صبغة واحدة على الأقل وله الصيغة التركيبية التالية

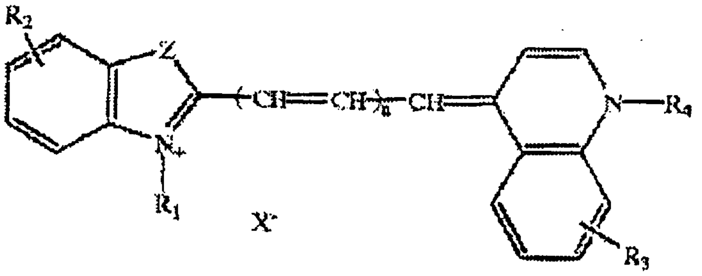


حيث R_1 تدل على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل ، تمثل كل من R_2 و R_3 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة ، وتمثل R_4 ذرة هيدروجين ، مجموعة اسيل أو مجموعة الكيل ، ويدل واحد من R_1 و R_4 على الأقل على مجموعة الكيل بها من ٨ إلى ١٨ ذرة كربون ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين أو ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n علىصفر ، ١ أو ٢ وتمثل X أنيون، وترتبط بالتحديد بـــ RNA لتزيد في شدة الفلورية .

٢.طريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها تشمل الخطوات :

١) خلط عينة دم مع عامل حال للدم والذي يحل الكريات الحمراء بعينة الدم إلى مثل هذه الدرجة التي لا تعوق عملية القياس ، وبذلك جعل الخلايا الطبيعية وغير الطبيعية في حالة مناسبة للإصطباغ ؛

٢) خلط عينة محضرة بالخطوة ١) مع صبغة بالصيغة التركيبية التالية .



حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل وتمثل كل من R_2 و R_3 ذرة هيدروجين، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة ، وتمثل R_4 ذرة هيدروجين ، مجموعة آسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كريت ، ذرة اكسجين أو ذرة كربون بها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n على صفر ، ١ أو ٢ وتمثل X^- أنيون ، وترتبط بالتحديد بـــ RNA الخلوي لزيادة شدة الفلورية ، وبالتالي الصباغة بالفلورية للخلايا ذات النواة في عينة الدم ؛

٣) قياس عينة اختبار محضرة بالخطوة ٢) بمقياس كريات انسيابي لقياس ضوء مستطير واحد على الأقل وفلورية واحدة على الأقل ؛ و

٤) تصنيف الكريات البيضاء الطبيعية إلى خمسة تجمعات على الأقل وعدها ، باستخدام الإختلافات في الضوء المستطيرة والفلورية المقاسة بالخطوة ٣) .

١. طريقة لتصنيف الكريات بيضاء وعدها كما في عنصر الحماية ٢ ، حيث أن العامل الحال للدم يحتوي على خافض توتر سطحي غير ايوني واحد على الأقل وخافض توتر سطحي كاتيوني واحد على الأقل وله رقم هيدروجيني من ٤,٥ إلى ١١,٠ .

٢. طريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها كما في عنصر الحماية ٣ ، حيث يحتوي العامل للدم أيضاً على حامض عضوي به حلقة عطرية واحدة على الأقل أو ملحه .

٣. طريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها كما في عنصرالحماية ٢ ، حيث أن الضوء المستطير هو عضو واحد مُنتقى من المجموعة المتكونة من ضوء مستطير بزاوية صغيرة أمامي ، ضوء مستطير بزاوية مرتفعة أمامي وضوء مستطير جانبي .

٤. طريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها كما في عنصر الحماية ٢ والتي تستطيع القيام بتصنيف خلايا الدم غير الطبيعية وعدها في نفس الوقت .

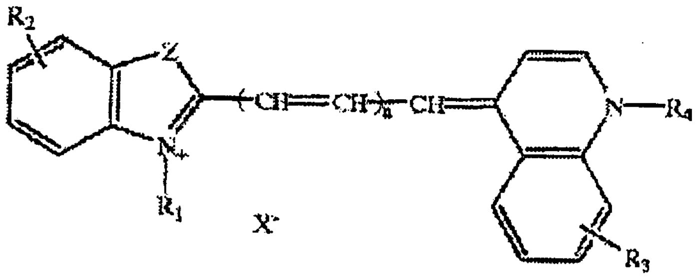
٥. طريقة لتصنيف الكريات البيضاء كما في أي من عناصر الحماية من ٢ إلى ٦ ، حيث أن الخلايا غير الطبيعية هي خلايا بمضمون RNA زائد عن الخلايا الطبيعية .

٦. طريقة لتصنيف الكريات البيضاء وعدها كما في عنصر الحماية ٧ ، حيث أن الخلايا غير الطبيعية هي عضو أو أكثر منتقى من المجموعة المتكونة من كريات محببة ، ارومات نخاعية ، ارومات كريات حمراء وكريات ليمفية غير نمطية غير ناضجة .

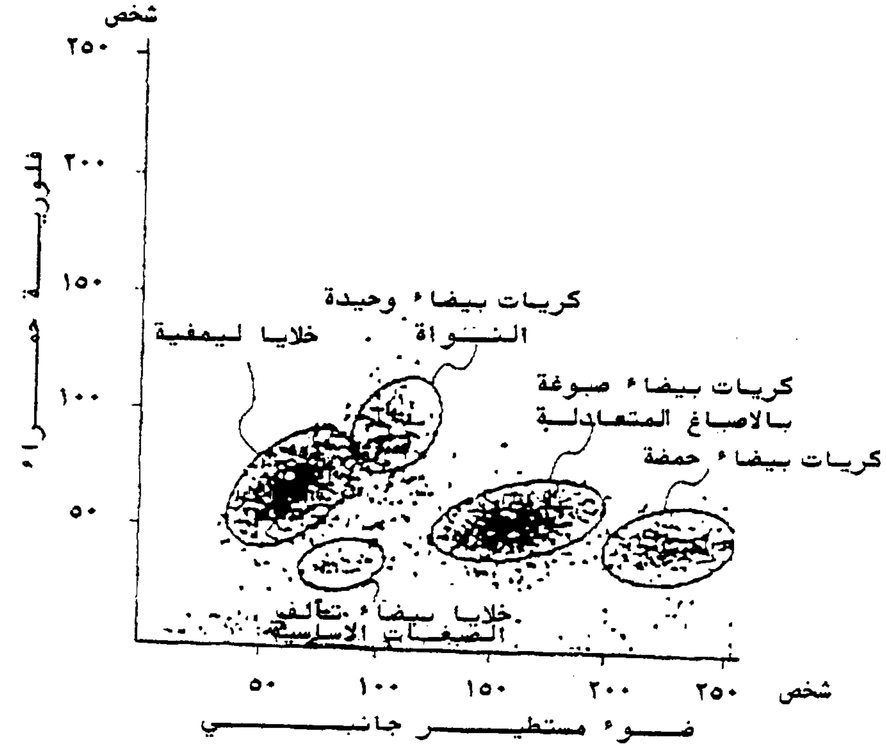
٧. عدة كاشف لتصنيف الكريات البيضاء وعدها تشمل :

١) عامل حال للدم يحل الكريات الحمراء في عينة دم إلى مثل هذه الدرجة التي لا تعوق عملية القياس ، وبذلك يجعل الخلايا الطبيعية أو غير الطبيعية في حالة مناسبة للإصطباع ، و

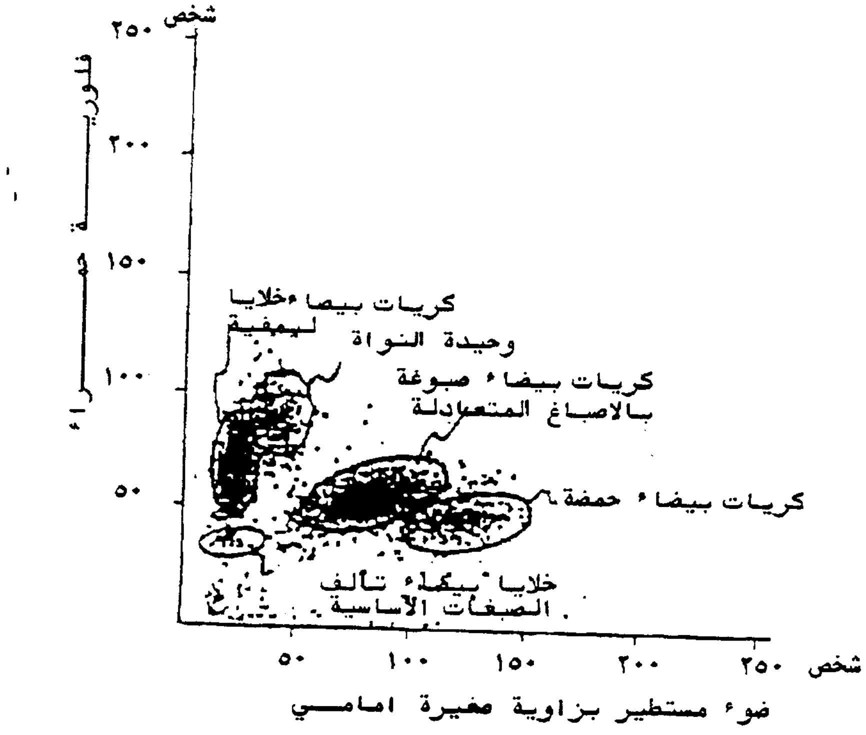
٢) محلول اصطباغ يحتوي على صبغة واحدة على الأقل بالصيغة التركيبية التالية ،



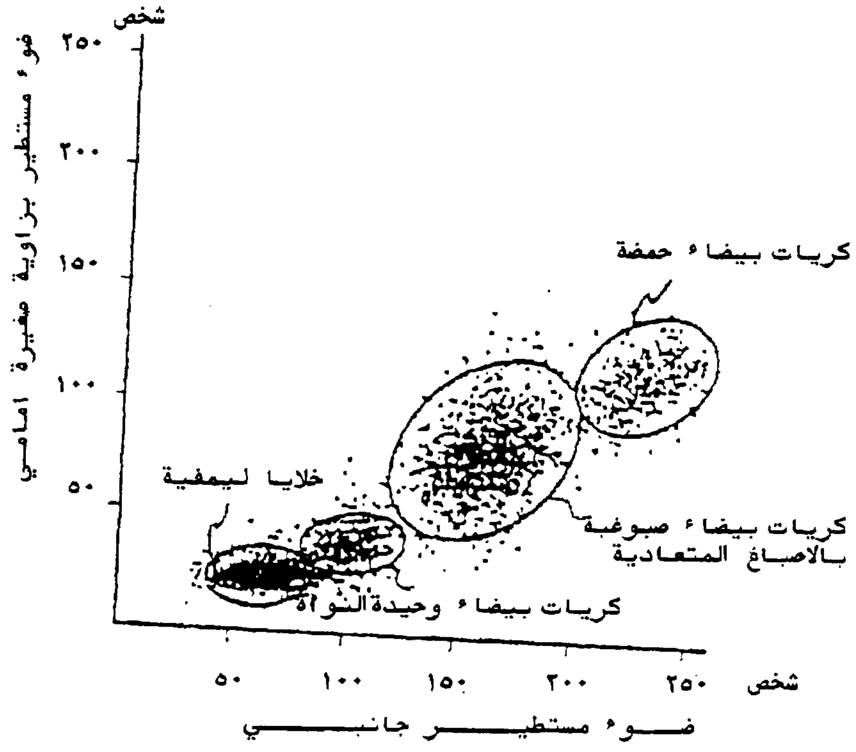
حيث تدل R_1 على ذرة هيدروجين أو مجموعة الكيل وتمثل كل من R_2 و R_3 ذرة هيدروجين ، مجموعة الكيل منخفضة أو مجموعة الكوكسي منخفضة ، وتمثل R_4 ذرة هيدروجين ، مجموعة آسيل أو مجموعة الكيل ، وتمثل Z ذرة كبريت ، ذرة اكسجين أو ذرة كربون لها مجموعة الكيل منخفضة ، وتدل n علىصفر ، ١ أو ٢ ، وتمثل X^- انيون ، وبالتحديد ترتبط بـــ RNA لتزيد في شدة الفلورية .



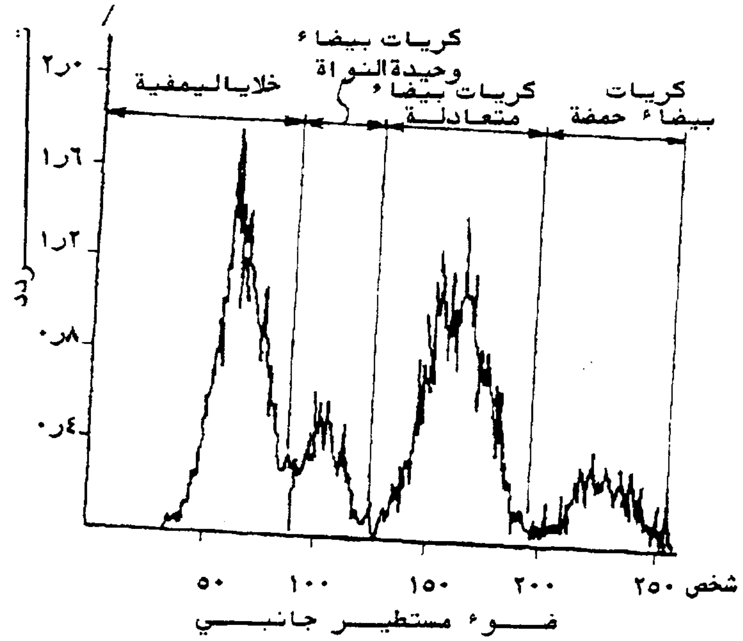
شكـــل (١)



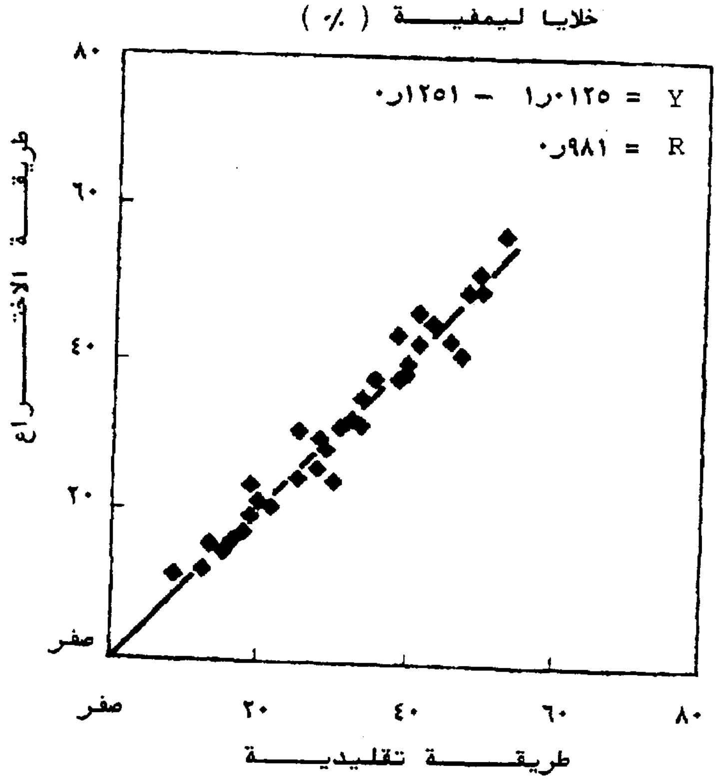
شكـــل (٢)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
ضوء مستطير بزاوية صغيرة امامي
كريات بيضاء حمضة
خلايا ليمفية
كريات بيضاء صبوغة بالاصباغ المتعادية
كريات بيضاء وحيدة النواة
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠
شخص
ضوء مستطير جانبي

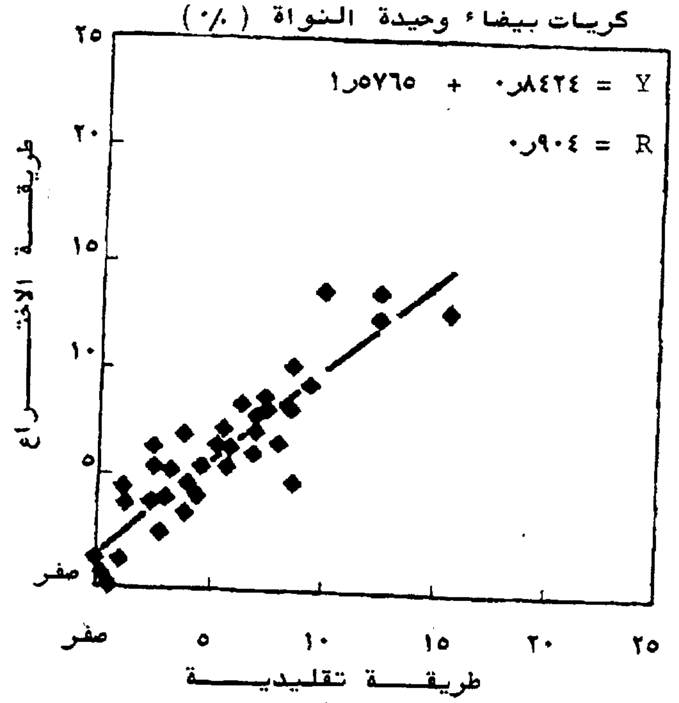
شكل (٣)


كريات بيضاء وحيدة النواة
خلايا ليمفية
كريات بيضاء متعادلة
كريات بيضاء حمضة
٢ر٠
١ر٦
١ر٢
٠ر٨
٠ر٤
ردد
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠
شخص
ضوء مستطير جانبي

شكل (٤)

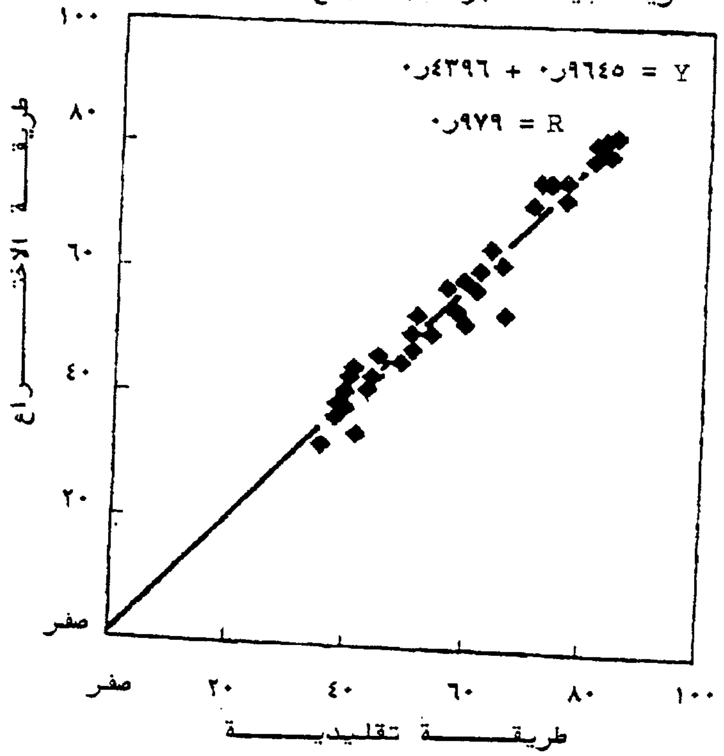


شكـــل (٥)



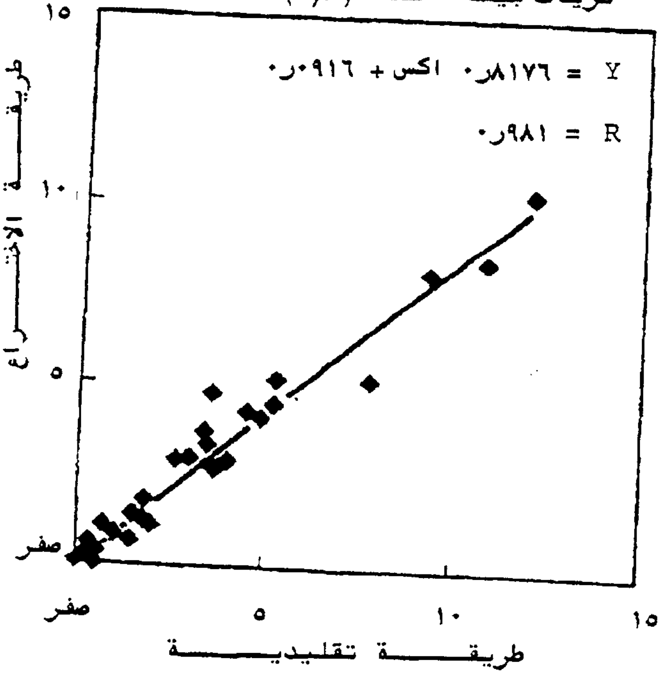
شكـــل (٦)

كريات بيضاء صبوغة بالاصباغ المتعادلة (٪)

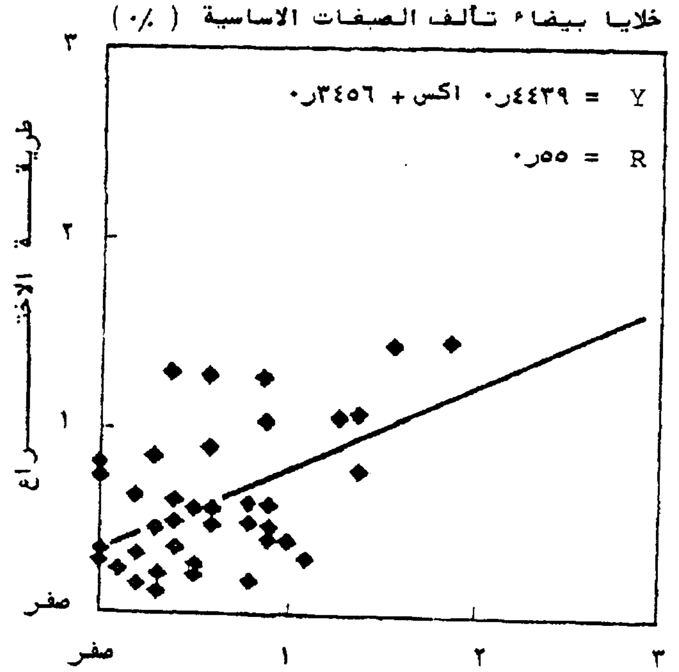


شكــــــل (٧)

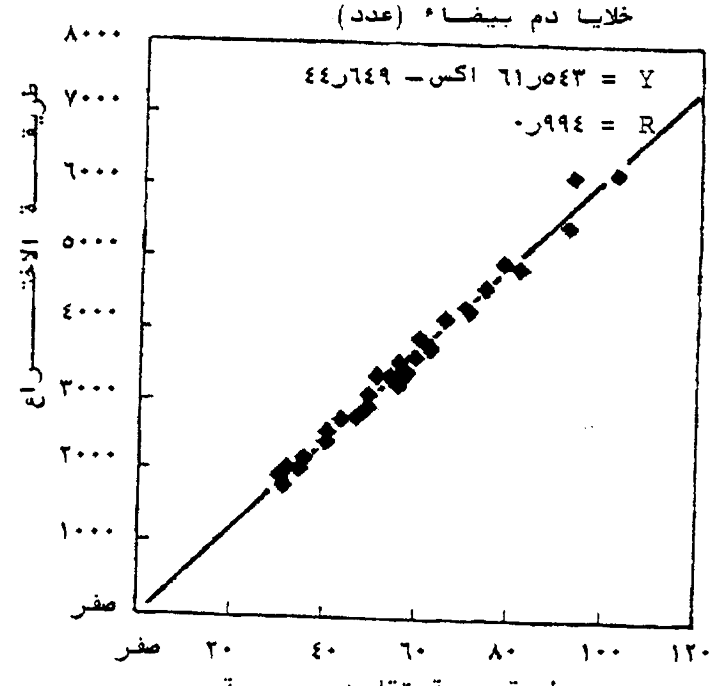
كريات بيضاء حمضة (٪)



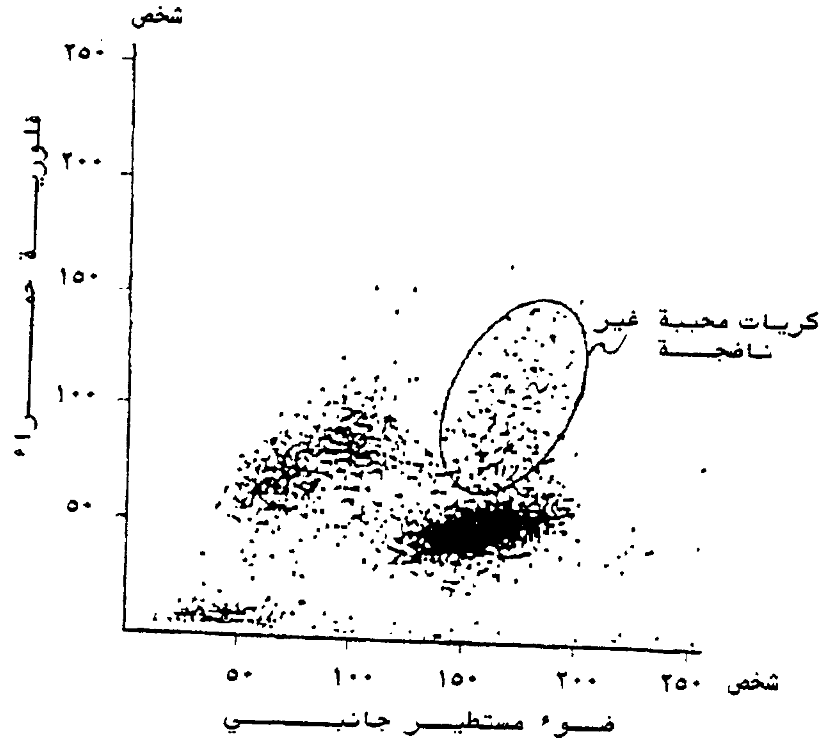
شكــــــل (٨)


خلايا بيضاء تألف الصفات الاساسية (٪)
Y = ٤٤٣٩ر٠ اكس + ٣٤٥٦ر٠
R = ٥٥ر٠
طريقة الاختراع
طريقة تقليدية
صفر
١
٢
٣

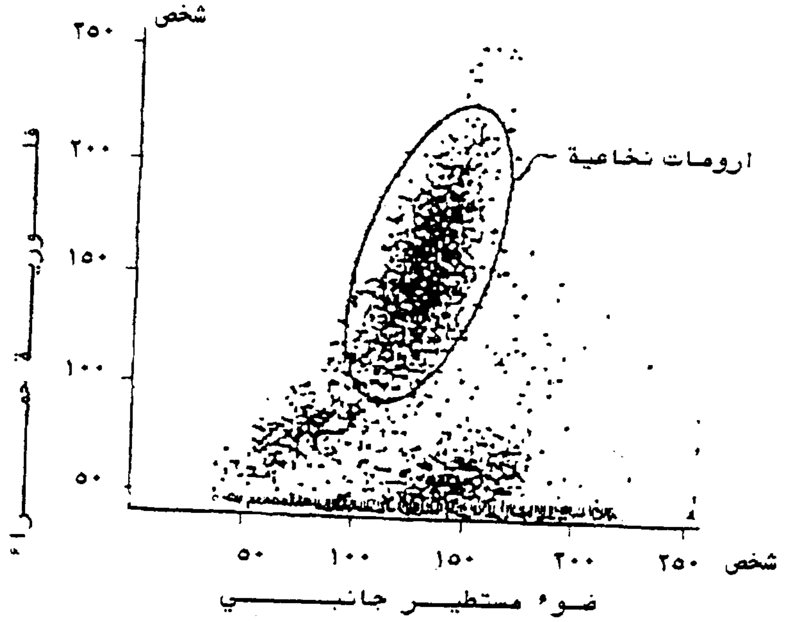
شكل (٩)


خلايا دم بيضاء (عدد)
Y = ٥٤٣ر٦١ اكس - ٦٤٩ر٤٤
R = ٩٩٤ر٠
طريقة الاختراع
طريقة تقليدية
صفر
١٠٠٠
٢٠٠٠
٣٠٠٠
٤٠٠٠
٥٠٠٠
٦٠٠٠
٧٠٠٠
٨٠٠٠
٢٠
٤٠
٦٠
٨٠
١٠٠
١٢٠

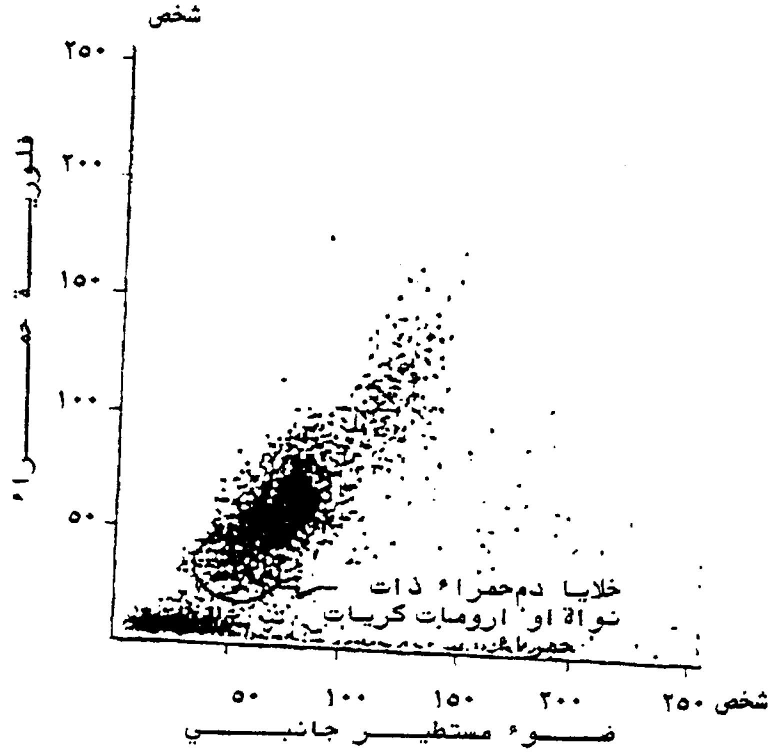
شكل (١٠)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات محببة غير ناضجة
٥٠ ١٠٠ ١٥٠ ٢٠٠ ٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

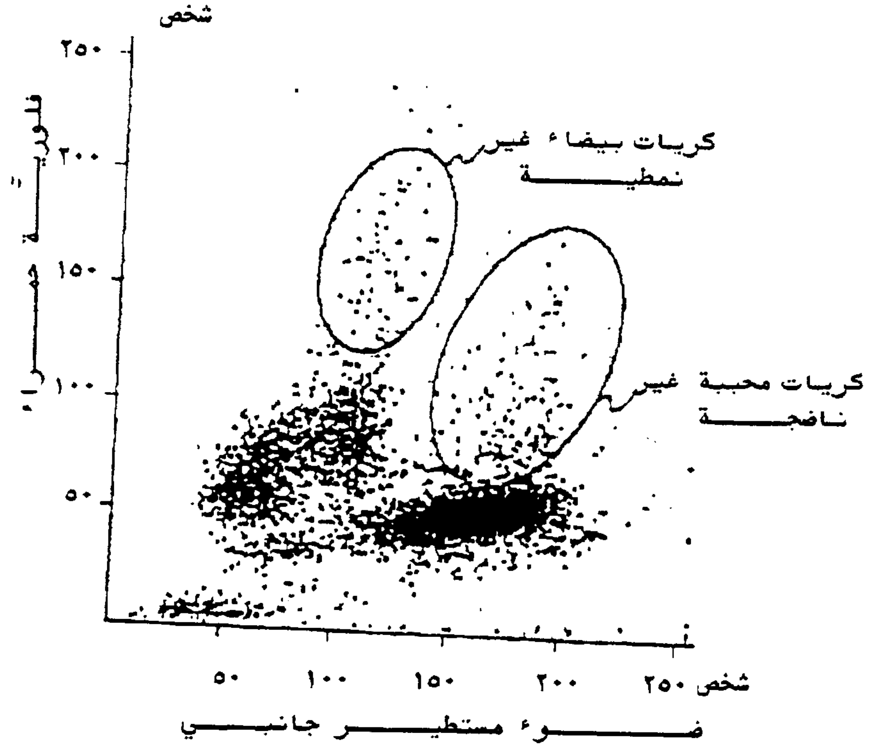
شكل (١١)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
ارومات نخاعية
٥٠ ١٠٠ ١٥٠ ٢٠٠ ٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

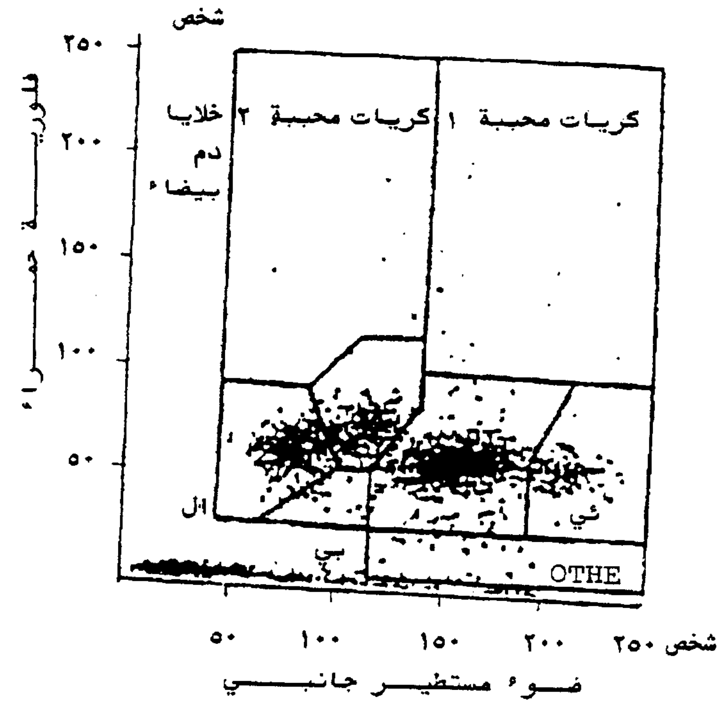
شكل (١٢)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
خلايا دم حمراء ذات
نواة او ارومات كريات
٥٠ ١٠٠ ١٥٠ ٢٠٠ ٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

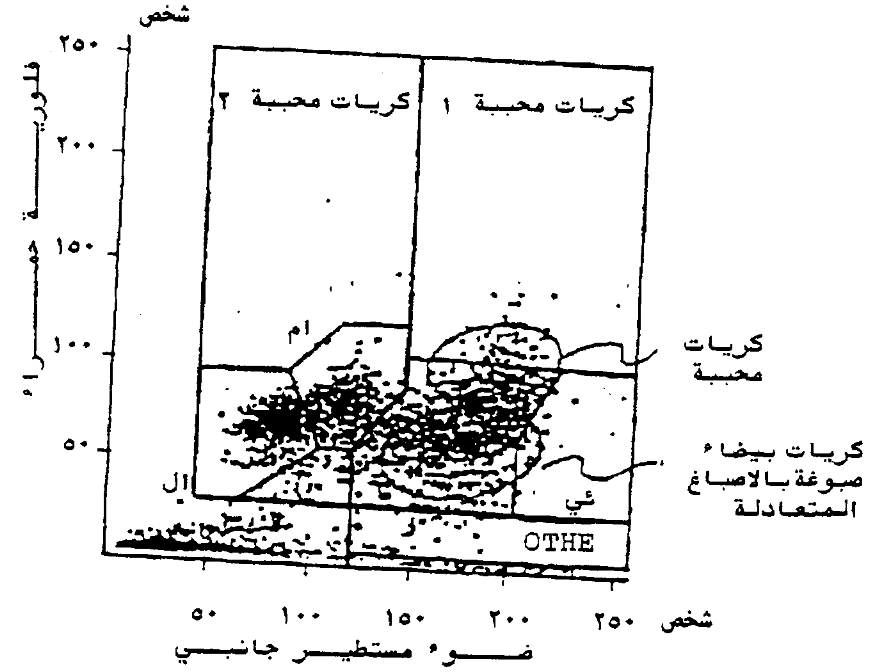
شكل (١٣)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات بيضاء غير
نمطية
كريات محببة غير
ناضجة
٥٠ ١٠٠ ١٥٠ ٢٠٠ ٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

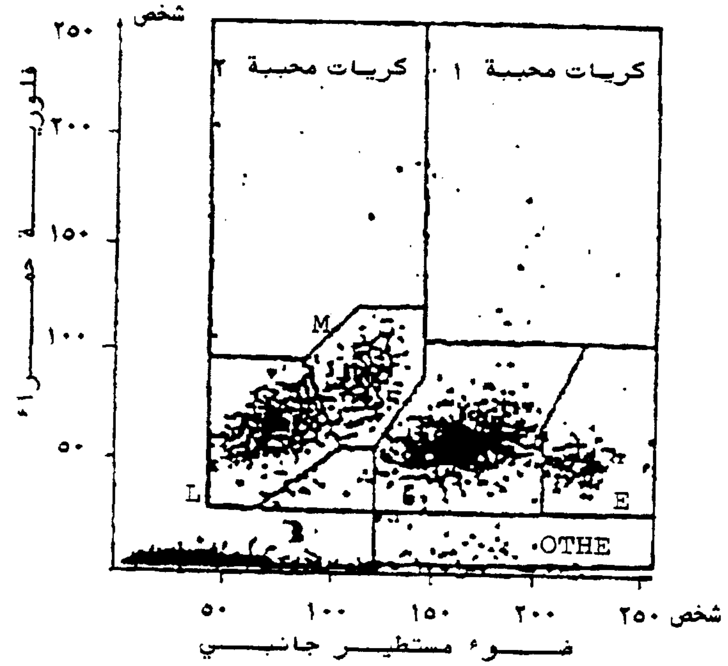
شكل (١٤)



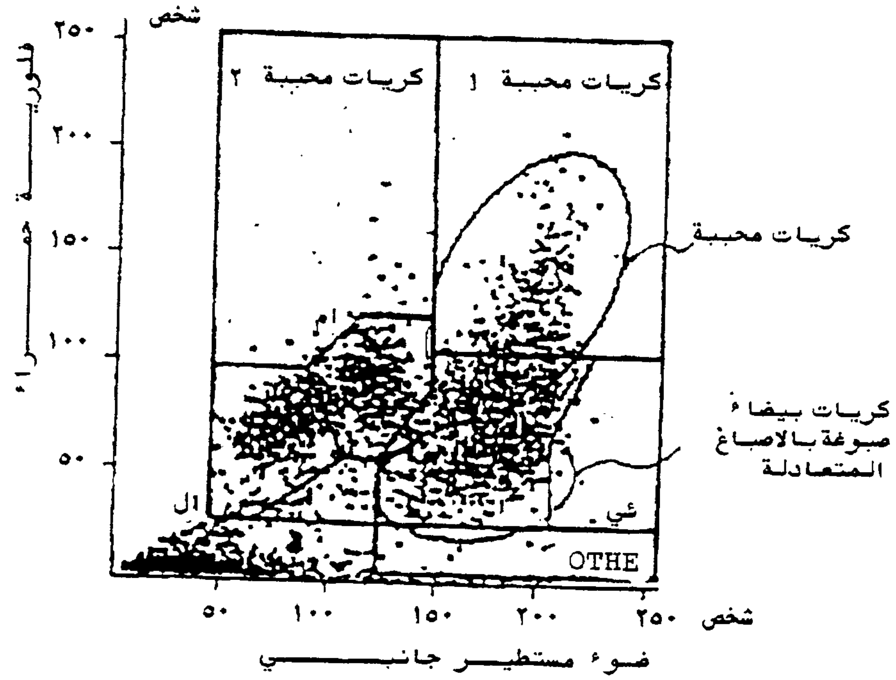
شكـــل (١٥)



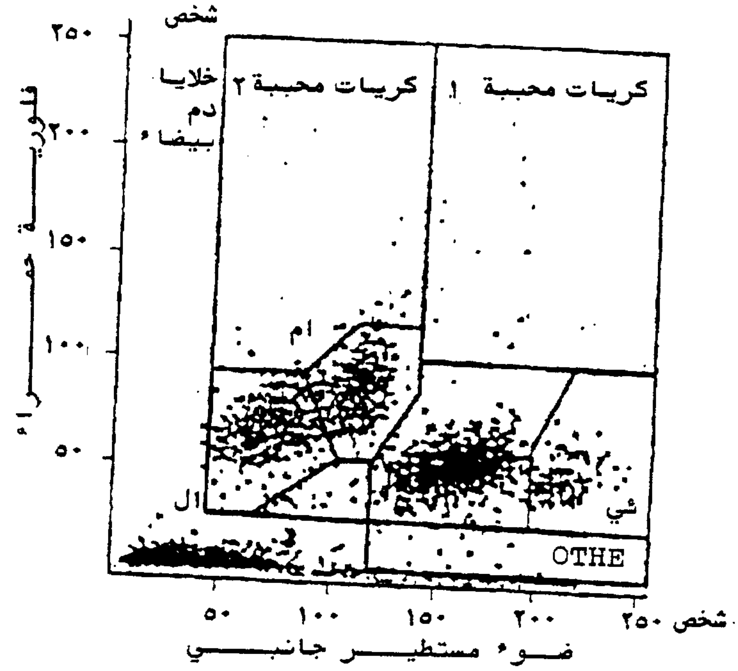
شكـــل (١٦)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
M
L
E
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

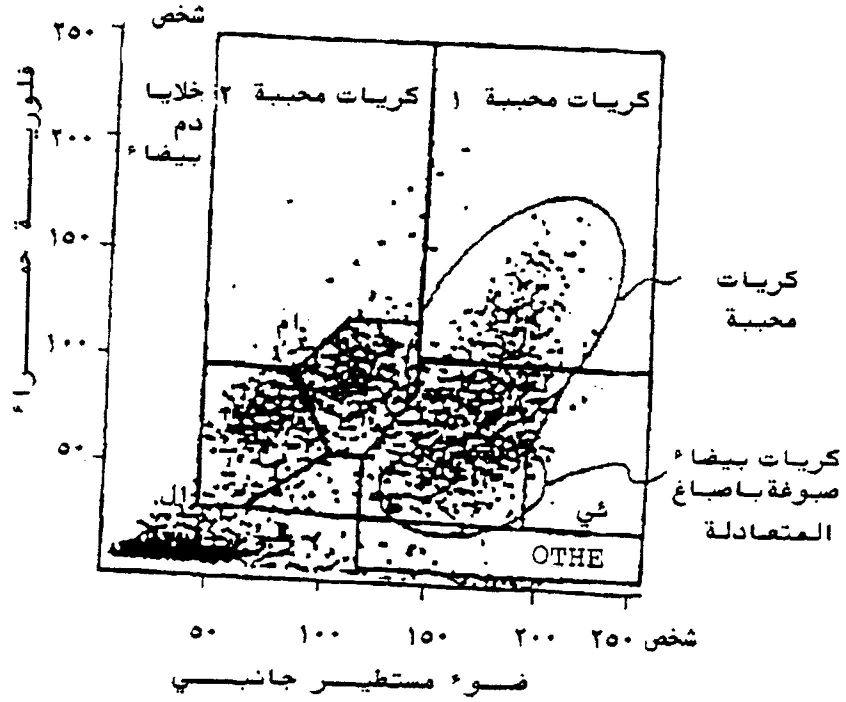
شكل (١٧)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
كريات محببة
كريات بيضاء
صبوغة بالاصباغ
المتعادلة
ال
ئي
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

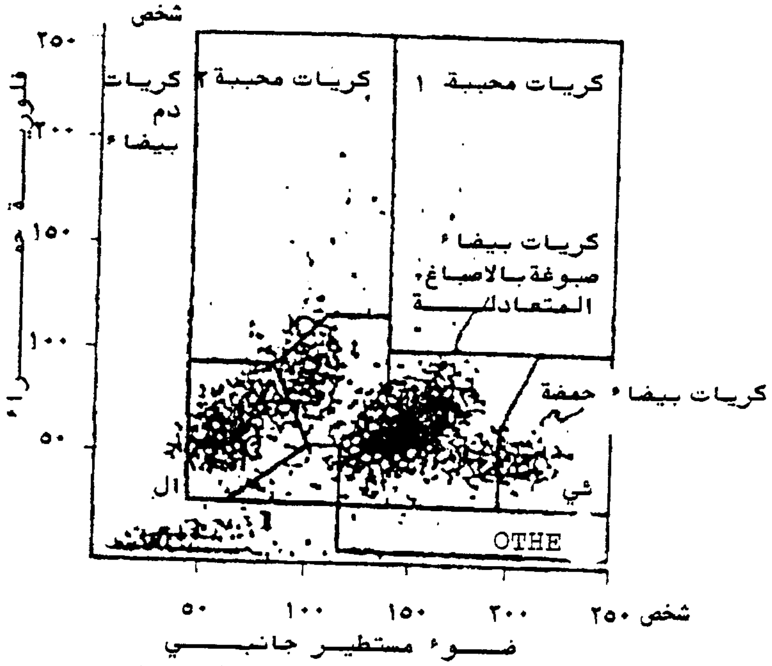
شكل (١٨)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
خلايا دم بيضاء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
ام
ال
ثي
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

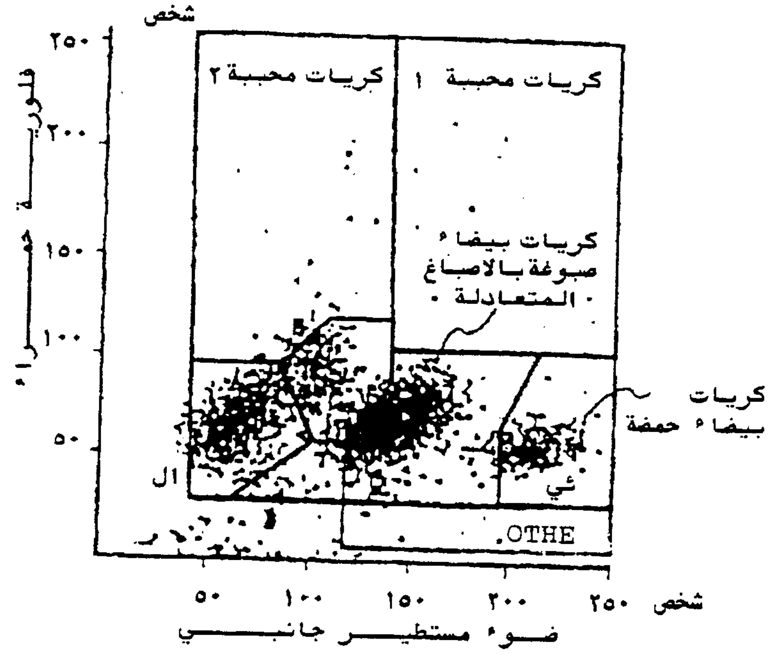
شكل (١٩)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
خلايا دم بيضاء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
كريات محببة
ام
ال
ثي
كريات بيضاء صبوغة باصباغ المتعادلة
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

شكل (٢٠)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات دم بيضاء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
كريات بيضاء صبوغة بالاصباغ المتعادلة
كريات بيضاء حمضة
ال
ثي
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

شكل (٢١)


شخص
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
فلورية حمراء
كريات محببة ٢
كريات محببة ١
كريات بيضاء صبوغة بالاصباغ المتعادلة
كريات بيضاء حمضة
ال
ثي
OTHE
٥٠
١٠٠
١٥٠
٢٠٠
٢٥٠ شخص
ضوء مستطير جانبي

شكل (٢٢)