



اندازه گیری LH در نمونه سرم

دکتر کازرونی



هورمون LH

- هورمون LH (Luteinizing Hormone) ملکولی گلیکوپروتئینی بزرگی است که دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد.
- زیرواحد آلفا در سه هورمون TSH، HCG و FSH مترشح از هیپوفیز قدامی یکسان هستند و این زیرواحد توانایی اتصال به رسپتور مربوطه را داراست، در حالیکه زیرواحد بتا در آنها متفاوت بوده و نقش فیزیولوژیک هورمون هم مربوط به زیر واحد بتا است.
- این هورمون از هیپوفیز قدامی ترشح می شوند. در هر دو جنس زن و مرد، LH ترشح استروئیدهای جنسی از غدد جنسی را تحریک می کند.
- در بیضه ها، اتصال LH به رسپتورهای روی سلولهای لیدیگ (Leydig cells) باعث تحریک سنتز و ترشح تستوسترون می شود.
- در تخمدان ها، LH در سنتز استروژن نقش دارد. در زنان، تخمک گذاری فولیکول های بالغ در تخمدان با ترشح ناگهانی و بالای LH القاء می شود که تحت عنوان موج LH قبل از تخمک گذاری (preovulatory LH surge) نامیده می شود.
- فولیکول پاره پس از تخمک گذاری به جسم زرد تبدیل میشود. این جسم زرد هورمون های استروئیدی پروژسترون و استرادیول ترشح می کنند که پروژسترون برای نگهداری بارداری ضروری است. در اغلب پستانداران، LH برای ادامه بقاء و عملکرد اجسام زرد مورد نیاز است.



• در موارد زیر به انجام آزمایش LH نیاز است:

- شک بالینی به وجود اختلال هیپوفیزی یا هیپوتالاموسی و تشخیص افتراقی آن (آزمایش تحریک هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) انجام میشود GnRH هورمونی است که توسط هیپوتالاموس تولید شده و هیپوفیز را برای ترشح LH و FSH تحریک میکند. این آزمایش، امکان ارزیابی توانایی غده هیپوفیز برای ساخت LH در پاسخ به تجویز GnRH را فراهم میکند. در این آزمایش، یک نمونه خون گرفته شده و سپس GnRH به فرد تزریق میشود. نمونه های بعدی خون در زمان های مشخصی گرفته شده و سطح LH اندازه گیری میشود. این آزمایش میتواند به تمایز بین اختلال هیپوفیز، زمانی که سطح سرمی LH در پاسخ به GnRH افزایش نمی یابد، یا هیپوتالاموس، زمانی که LH در پاسخ به تزریق GnRH افزایش می یابد، کمک کند.
- شک بالینی به بلوغ زودرس و یا تاخیر در بلوغ
- برای خانمها: ناباروری، قاعدگی نامنظم، خونریزی شدید در قاعدگی، آمنوره، اندازه گیری LH روشی آسان برای تشخیص وقوع تخمک گذاری است (اندازه گیری روزانه LH در حدود زمان میان سیکل زنان می تواند زمان پیک LH را نشان دهد و حدودا زمان تخمک گذاری را نشان دهد اعتقاد بر این است که حداکثر باروری در این روز است).
- برای آقایان: ناباروری همسر، کم بودن تعداد اسپرم، کم بودن توده عضلانی، کاهش میل جنسی



• موارد افزایش تولید LH

➤ هیپوگنادیسم اولیه، فاز لوتئال قاعدگی و پس از یائسگی مشاهده می گردد

➤ به علاوه غلظت های بالای LH در دوره فولیکولار در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)

➤ موارد کاهش LH

➤ نارسایی هیپوفیز یا هیپوتالاموس، استرس شدید، سوءتغذیه، دیده می شود.

روش کار

- کیت الیزای LH موجود، بر اساس **سنجش الیزای ساندویچی** تهیه شده است
- در این تکنیک، آنتی بادی‌ها بر علیه LH روی سطح چاهک‌ها پوشش داده شده است. سپس نمونه‌ای حاوی آنتی ژن (LH) به چاهک‌ها اضافه شده و بعد از آن، برای انجام واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی و ایجاد کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی به پلیت واکنش زمان داده می‌شود (انکوباسیون اول).
- پس از آن مرحله شستشو توسط بافر فسفات را داریم (شستشو برای حذف unbound material)
- مرحله بعد آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم پراکسیداز به واکنش اضافه شده و اجازه داده می‌شود تا این آنتی بادی به آنتی ژن (از طریق اپی توپ epitope یا سایت اتصال دیگر آنتی ژن متصل می‌شود) اتصال یابد (انکوباسیون دوم).
- پس از این مرحله، آنتی بادی‌های آزاد با شستشو حذف می‌شوند.
- در نهایت **مخلوط سوبسترا و کروموژن (مخلوط H2O2 و تترامتیل بنزیدین)** اضافه می‌شود
- آنزیم پراکسیداز واکنش اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین توسط H2O2 را کاتالیز میکند.
- کمپلکس ابی رنگی در نتیجه اکسیداسیون تترامتیل بنزیدین حاصل می‌شود.
- با اضافه کردن سولفوریک اسید که متوقف کننده واکنش است رنگ نهایی زرد رنگ است.
- **جذب کمپلکس رنگی با غلظت آنتی ژن رابطه مستقیم دارد.**
- استانداردهای LH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.
- این روش اختصاصیت بالایی دارد، زیرا به یک جفت آنتی بادی برای اتصال به آنتی ژن و تشخیص نیاز دارند (در خصوص آنتی ژنهایی که دارای دو جایگاه اپیتوپیک هستند و لذا میتوان دو آنتی بادی بر علیه این اپیتوپها طراحی کرد میتوان از روش ساندویچی استفاده کرد روش ساندویچی خصوصا در مواردی که غلظت آنتی ژن در نمونه پایین است و در نمونه ای که حاوی مقادیر بالایی از عوامل مداخله گر میباشد ترجیح داده میشود).



• محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.



ELISA

- قبل از انجام آزمایش، حدود 30 دقیقه فرصت دهید تا **معرف‌های کیت به دمای اتاق** یا دمای مشخص شده در اطلاعات ارائه شده برسند. همچنین لازم است پیش از انجام آزمایش، نمونه‌های منجمد کاملاً ذوب شوند.
- باز کردن فویل حاوی پلیت (بلافاصله بعد از آنکه از یخچال خارج شد): پلیت سرد بخار آب موجود در هوا را به قطرات کوچکی تبدیل می‌کند که روی جدارهای چاهکها خواهد نشست. این عمل سبب می‌شود که در برخی تست‌ها که حجم نمونه کم است (مثلاً 10 میکرولیتر) سبب رقیق شدن نمونه شود.
- **بررسی ماکروسکوپی کلیه اجزاء کیت** قبلاً از مصرف به لحاظ وجود کدورت ، آلودگی قارچی و ذرات خارجی الزامی است.
- محلول کروموژن که قبل از مصرف تغییر رنگ داده باشد احتمالاً آلوده و فاسد شده است.
- شرایط محیطی را حفظ کنید، به عنوان مثال دما و رطوبت باید در طول آزمایش و بین سنجش نتایج ثابت باشد.
- اطمینان حاصل کنید که کلیه تجهیزات از جمله سمپلر ، پلیت و آنالایزر **کالیبره** هستند.
- در طول آزمایش، نوک سمپلر و چاهک پلیت را به صورت بصری بازرسی کنید تا میزان حجم‌برداری و افزودن معرف کنترل شود.
- تاکید می‌شود که از محلول‌ها موجود در کیت‌های مختلف، خصوصاً با سری ساخت متفاوت استفاده نشود.

• عمل **شستشو** جهت جدا کردن ترکیبات اتصال یافته به کف چاهک از ترکیباتی که متصل نشده اند صورت می گیرد

• **آماده سازی بافر** یا محلول شستشو هر بار بایستی به حد نیاز مصرفی باشد. تهیه بیش از حد محلول بافر و ماندن بافر در محیط آزمایشگاه منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال آن میگردد

قبل از هر چیز به روش تهیه محلول شستشو در بروشور کیت توجه شود ، تهیه **محلول شستشو غلیظ تر** از حد توصیه شده منجر به تخریب و جدا شدن مولکولهای اتصال یافته می شود و جذب نوری کاهش می یابد. در مقابل کاهش توانایی محلول شستشو به دلیل **رقیق سازی** زیاد باعث عدم جدا شدن اتصالات غیر اختصاصی و ایجاد جذب زمینه ای بالا می شود.

مرحله شستشو باید حداقل سه بار برای هر چاهک انجام شود. در آخرین مرحله شستشو و پس از خروج کامل محلول از چاهک با برگرداندن پلیت باید محلول اضافی داخل چاهک را با کوبیدن بر سطح یک کاغذ یا دستمال نمگیر خالی نمائید.

در هنگام شستشوی چاهک باید اطمینان حاصل کرد که محلول شستشو **تمام چاهک ها را پوشانده** است. از **سر ریز شدن** محلول چاهکها باید اجتناب شود.

• اگر **محلول شستشو واجد حباب** باشد از وارد شدن آن به داخل چاهک ها جلوگیری شود چرا که این حباب سطح تماس محلول واش را با چاهک کم کرده و اثرات شستشو را کاهش می دهد.

• **pH آب مقطری** که برای محلول شستشو استفاده می شود اگر بیش از حد اسیدی و یا قلیایی باشد می تواند بر روی اتصالات آنتی ژن - آنتی بادی اثر گذاشته و روی سنجش تاثیر بگذارد.

• در مورد شستشوی اتوماتیک با دستگاه واشر دقت شود که سرعت ریختن محلول و اسپیراسیون محلول تنظیم باشد.

• در نظر گرفتن **زمان خیس خوردن چاهک** در فواصل شستشو (ریختن بافر و تخلیه) طبق دستورالعمل کیت الزامی است و معمولاً بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه است.

در برخی روش های شستشو ، برای شستشوی بهتر یک زمان انتظار بنام **soak time** ذکر میشود. بدین ترتیب که پس از ریختن محلول درون چاهک ها مدتی صبر کرده و بعد چاهک را خالی می کنیم. این زمان از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه متغیر است. در صورتیکه این زمان توصیه شده باشد باید حتماً رعایت گردد.

- اطمینان حاصل کنید که **سمپلرها کالیبره** باشند.
- برای برداشتن حجم کم، سرسمپلر را **بین ۲ تا ۵ میلیمتر** در محلول وارد کنید. فرو بردن بیش از حد باعث آغشته شدن بالای سرسمپلر و تشکیل حباب می گردد. برای برداشتن حجم بالا سر سپلر را تا ۱۰ میلی متری هم می توان داخل محلول وارد کنید.
- شاسی سمپلر را تا مرحله 1 به سمت پایین فشار دهید. در همین حال، و بدون رها کردن شاسی سمپلر را به صورت عمودی بین ۲ تا ۵ میلیمتر در محلول وارد کنید.
- شاسی را آرام رها کنید تا مایع بداخل سر سمپلر وارد شود. در این مرحله نباید حبابی داخل سر سمپلر مشاهده شود. در غیر این صورت باید مجدداً عمل کشیدن مایع را تکرار کنید.
- **عمود نگه داشتن سمپلر**. توجه شود زاویه بیش از ۲۰ درجه از حالت عمود برای برداشتن محلول، منجر به خطا خواهد شد.
- سر سپلر را حتماً از کنار ظرف فاصله دهید.
- تخلیه‌ی نمونه: نوک سمپلر را در زاویه‌ای بین ۱۰ الی ۴۵ درجه نسبت به دیواره‌ی ظرف قرار دهید شاسی را به آرامی تا مرحله 1 به پایین فشار دهید. 1-3 ثانیه صبر کرده، آنگاه شاسی را تا مرحله 2 فشار دهید تا مایع کاملاً خالی شود.

- مرطوب کردن نوک سمپلر یا **pre-wetting** در مواردی که سمپلرها بزرگتر از 10 μm باشد لازم است
- **برخورد نوک سمپلر آلوده با سوبسترا** و یا بازماندن طولانی مدت درب ظرف سوبسترا می تواند منجر به آلودگی قارچی یا باکتریال سوبسترا گردد
- دقت در رعایت **زمان انکوباسیون** **حائز اهمیت** میباشد (خطای زمانی در انکوباسیون های کوتاه مدت بیشتر می باشد).
- پلیت ها خصوصا در هنگام **رنگزایی باید در دمای 25-18** درجه سانتی گراد قرار گرفته و در معرض باد سرد و گرم نباشند چرا که دمای محیط می تواند سرعت واکنش رنگزایی را تغییر داده و در نتیجه منجر به رنگزایی کم یا زیاد شده و با بی اعتبار کردن کنترل مثبت و منفی کل کار انجام شده را بی اعتبار می کنند.
- در مرحله انکوباسیون سوبسترای TMB به هیچ وجه از فویل برای پوشاندن سطح پلیت استفاده ننمایید.
- پوشاندن سطح استریپ ها با پوشش پارافیلیم یا برچسب های مخصوص در هر مرحله انکوباسیون ضروری است. این امر مانع تبخیر محلولها از محیط واکنش و از طرفی مانع ورود گرد و غبار به محیط عمل آنزیم میگردد.