دوره ۲۲، شماره ۷۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحات: ۵۸-۴۵

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی کشت سلول‌های لنفوسیت برای انجام کاریوتایپ با استفاده از روش پلاسمای غنی از پلاکت

امیر شمس[۱]، هدی آیت[۲*]، علی محمد احدی[۲]

[۱] کارشناسی ارشد، مربی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲] دکتری، استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

چکیده

مقدمه: کاریوتایپ یکی از محبوب‌ترین و پرکاربردترین آزمون‌ها در آزمایشگاه‌های ژنتیک در سراسر کشور می‌باشد. در این مطالعه، روش تشخیصی کاریوتایپ و روش درمانی پلاسمای غنی از پلاکت (PRP: Platelet Rich Plasma) با یکدیگر ادغام شدند تا کیفیت انجام آزمون کاریوتایپ بهبود یابد. شایان ذکر است که این روش در آزمایشگاه‌های ژنتیک که نمونه خون مراجعه‌کنندگان به آن‌ها بسیار کم بوده و یا تعداد سلول‌های کمی برای انجام آزمون وجود دارد، حیاتی می‌باشد. با توجه به موارد بیان‌شده، مطالعه حاضر با هدف بهینه‌سازی کشت سلول‌های لنفوسیت برای انجام کاریوتایپ توسط روش پلاسمای غنی از پلاکت انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش کاربردی حاضر که در دانشگاه دولتی شهرکرد و در سال ۱۳۹۴ در ارتباط با ۳۰ نفر صورت گرفت، از روش پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) در جهت افزایش سلول‌های سفید (WBC: White Blood Cell) و کاهش سلول‌های قرمز (RBC: Red Blood Cell) و دیگر عوامل مزاحم و غیرضروری در محیط کشت سلولی به‌منظور بهبود کشت سلول‌های لنفوسیتی استفاده گردید.

یافته‌ها: لام‌های نهایی کاریوتایپ که با استفاده از این روش تهیه شدند، دارای کیفیت بسیار عالی و پس‌زمینه کاملاً شفاف‌تر نسبت به روش معمول انجام کاریوتایپ بودند. لازم به ذکر است که در اسلاید نهایی، دسته‌های کروموزوم‌های بیشتری نسبت به روش معمول انجام کاریوتایپ وجود داشت.

نتیجه‌گیری: کیفیت بهتر کروموزوم‌ها در اسلایدهای کاریوتایپ، مطالعه در مورد ساختار کروموزوم‌ها را بسیار آسان‌تر و دقیق‌تر می‌نماید. از سوی دیگر کمیت بیشتر کروموزوم‌ها در اسلایدهای کاریوتایپ، آنالیز آن‌ها توسط نرم‌افزارهای مخصوص کاریوتایپ را بهبود بخشیده و تشخیص موزائیسم سلولی را دقیق‌تر خواهد ساخت.

کلمات کلیدی: آنالیز کروموزومی، پلاسمای غنی از پلاکت، کاریوتایپ، کشت سلول لنفوسیت، PRP

* **نویسنده مسئول:** هدی آیت، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۲۵۸۲۱۱؛ ایمیل: hoda.ayat@gmail.com

مقدمه

در هسته سلول‌های بدن انسان، ماده وراثتی DNA قرار دارد. در مرحله‌ای از چرخه سلولی، این ماده وراثتی فشرده شده و ساختارهایی به نام کروموزوم را ایجاد می‌کند؛ به‌طوری که ۲۳ جفت کروموزوم در انسان وجود دارد که ۲۲ جفت از آن‌ها اتوزوم (غیرجنسی) و یک جفت جنسی هستند. بررسی کروموزوم‌ها از دیرباز مورد توجه متخصصان ژنتیک بوده است؛ زیرا بسیاری از سندروم‌ها و بیماری‌های ژنتیکی صرفاً با بررسی کروموزوم‌ها قابل‌تشخیص هستند؛ از این رو، روش‌هایی برای بررسی کروموزوم‌ها ایجاد شده‌اند که معروف‌ترین آن‌ها کاریوتایپ نام دارد. کاریوتایپ به زبان ساده، تصویری از کروموزوم‌های یک فرد است که در آن تعداد و ساختار کروموزوم‌ها مشخص می‌شود (۱).

کاریوتایپ را می‌توان از انواع مختلف سلول‌های بدن تهیه نمود. شکل روتین انجام کاریوتایپ، تهیه آن از سلول‌های سفید خونی همچون لنفوسیت‌ها می‌باشد. گزارش نهایی کاریوتایپ معمولاً توسط نرم‌افزارهای مخصوص مرتب‌کننده و گزارش‌دهنده ایجاد می‌شود. امروزه کاریوتایپ یکی از پرطرفدارترین روش‌های تشخیصی در مراکز ژنتیک و آزمایشگاه‌های کشور می‌باشد. آزمون کاریوتایپ در کشور ما در ارتباط با اغلب بیماران مراجعه‌کننده و حتی بسیاری از زوجین مورد مشاوره انجام می‌شود؛ از این رو نیاز به بهبود و بهینه‌سازی انجام این آزمون و باندینگ کروموزوم‌ها وجود دارد (۱).

تاکنون مطالعات بسیاری در راستای بهینه‌سازی کروموزوم‌ها صورت گرفته است که بیشتر آن‌ها در جهت تهیه کاریوتایپ با رزولوشن بالا (HRK: High Resolution Karyotype) بوده‌اند و متأسفانه هیچ راه‌کار نهایی که بتواند برای تمام نمونه‌ها و آزمایشگاه‌ها کاربرد داشته باشد، ارائه نشده است. در ارتباط با مشکلات عمده موجود در این زمینه می‌توان به کیفیت‌های متفاوت نمونه‌های سلولی که از بیماران گرفته می‌شوند، سخت‌بودن کنترل کیفیت نمونه‌ها و شرایط متفاوت آزمایشگاه‌ها و دستگاه‌های مختلف در آزمایشگاه‌ها اشاره کرد؛ از این رو بیشتر آزمایشگاه‌های ژنتیک کشور از روش معمول با رزولوشن پایین استفاده می‌کنند و روش‌های بهینه مانند HRK در آزمایشگاه‌ها رواج نیافته‌اند (۲،۳).

در این مطالعه سعی بر آن بود که روش‌هایی ارائه شود که در بیشتر آزمایشگاه‌های کشور قابل‌پیاده‌سازی بوده و در صورت کمبود سلول‌های خونی در نمونه خون افرادی مانند نوزادان، کودکان و بیماران دارای نقص سلول‌های خونی، اختلالی در نتیجه نهایی کاریوتایپ ایجاد نشود و اسلایدهای نهایی از کیفیت مطلوبی برخوردار باشند. امید است در صورت بهبود کمی و کیفی کاریوتایپ در این مطالعه، اطلاعات بیشتر و مناسب‌تری پس از بررسی کروموزوم‌ها در اختیار متخصصان ژنتیک قرار گیرد و بیماری‌های ژنتیکی با اختلالات کوچک کروموزومی قابل‌تشخیص باشند و بررسی موزائیسم سلولی آسان‌تر گردد تا بدین‌طریق متخصصان ژنتیک، تشخیص بهتر و مطمئن‌تری را از بررسی کاریوتایپ به‌دست آورند. شایان ذکر است که در این روش، زمان انجام آزمون کاریوتایپ کاهش می‌یابد تا آزمایشگاه‌های ژنتیک بتوانند با سرعت بیشتری جواب نهایی را در اختیار بیماران قرار دهند. علاوه‌براین، هزینه انجام آزمون کاریوتایپ به دلیل حذف سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) کاهش می‌یابد تا از این طریق، فشار مالی کمتری به بیماران برای انجام این آزمون وارد شود (۴،۵).

مواد و روش‌ها

مطالعه کاربردی حاضر در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه دولتی شهرکرد در ارتباط با ۳۰ نفر صورت گرفت.

بدین‌منظور، ۳۰ داوطلب از گروه‌های مختلف سنی و از هر دو جنس انتخاب شدند. نمونه‌گیری به روش تصادفی طبقه‌ای صورت گرفت و حجم نمونه با تقسیم مساوی افراد میان گروه‌ها تعیین شد. بدین‌منظور، پنج مرد و پنج زن از هر گروه سنی ۱۸ تا ۳۶ سال، ۳۷ تا ۵۴ سال و ۵۵ تا ۷۲ سال انتخاب شدند و ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی به روش بسته (لوله ونوجکت خلا) از آن‌ها تهیه گردید. شایان ذکر است که از هر فرد دو نمونه خون محیطی گرفته شد؛ به‌طوری که یک نمونه در لوله ونوجکت سبز ۵ میلی‌لیتری حاوی هپارین سیترات بود که برای کشت سلول‌های لنفوسیت به روش معمول به‌عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت و برای نمونه دیگر در لوله ونوجکت از کیت مخصوص PRP برای کشت سلول‌های لنفوسیت به روش بهینه‌سازی‌شده به‌عنوان گروه مورد مطالعه بهره گرفته شد.

در روش معمول انجام کاریوتایپ از پروتکل ساده کشت سلول‌های لنفوسیتی استفاده می‌گردد. بدین‌منظور، ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر خون محیطی هپارینه که حاوی تمامی سلول‌های خونی و پلاسمای خون می‌باشد، برای کشت سلولی به فلاسک کشت T25 که حاوی محیط کشت کامل دارای سرم جنین گاوی است، اضافه گردید. در روش بهینه‌سازی‌شده انجام کاریوتایپ به‌صورت انتخابی، تنها از قسمت‌هایی از اجزای خون برای کشت سلولی استفاده می‌شود. بدین‌منظور اجزای خون توسط سانتریفیوژ جدا گردیدند. سلول‌های سفید خون که شامل: لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها هستند به فلاسک کشت T25 که حاوی محیط کشت کامل و فاقد سرم جنین گاوی بود، اضافه گردید. در ادامه، پلاکت و پلاسمای خون از لوله‌های مخصوص PRP استخراج شد. شایان ذکر است که به ازای هر لوله مخصوص PRP، در مجموع ۲ میلی‌لیتر پلاسما و پلاکت به‌دست آمد که پس از فعال‌سازی با محلول فعال‌ساز پلاکتی به فلاسک کشت T25 فوق اضافه گردید.

در روش بهینه‌سازی‌شده انجام کاریوتایپ، اجزای خون به‌کاررفته در کشت سلول، کاملاً برای کشت لنفوسیت‌ها مناسب هستند و اجزای اضافه مانند سلول‌های قرمز خونی در محیط کشت وارد نمی‌شوند. شایان ذکر می‌باشد که در این روش، محیط کشت فاقد سرم جنین گاوی است؛ در صورتی که در روش معمول انجام کاریوتایپ، تمامی اجزای خونی از جمله سلول‌های قرمز خون در محیط کشت وارد شده و محیط کشت دارای سرم جنین گاوی می‌باشد.

روش تهیه محیط کشت کامل

برای تهیه محیط کشت از هود لامینار کلاس ۲ استفاده شد. برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، ابتدا ۷۷ میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی RPMI1640 با ۲۰ میلی‌لیتر از سرم جنین گاوی (FBS) مخلوط گردید و در ادامه، ۱ میلی‌لیتر گلوتامکس (Glutamax) و ۱ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک Pen/Strep به آن اضافه شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر فیتوهماگلوتینین (PHA: Phytohemagglutinin) به ترکیب بالا اضافه گردید تا محیط کشت کامل حاصل شود. لازم به ذکر است که در روش بهینه‌سازی‌شده نیازی به اضافه‌کردن سرم جنین گاوی وجود ندارد و به جای آن از سرم خود بیمار و پلاکت‌های فعال‌شده در آن استفاده می‌شود. درصد مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت کامل در هر دو روش در جدول ۱ نشان داده شده است (۶،۷).

انجام کاریوتایپ بر روی سلول‌های خونی

برای تهیه کاریوتایپ از سلول‌های خونی، سلول‌های لنفوسیتی مناسب می‌باشند. در پژوهش حاضر برای تهیه این نوع کاریوتایپ، شش مرحله به شرح زیر انجام شد (۸-۱۱):

۱. نمونه‌گیری

۲. کشت سلولی
۳. برداشت یا هاروست
۴. لام‌گیری یا اسلایدینگ
۵. باندینگ و رنگ‌آمیزی کروموزوم
۶. آنالیز اسلاید نهایی زیر میکروسکوپ

۱. مرحله اول نمونه‌گیری (Sampling): جمع‌آوری خون با استفاده از لوله‌های خلا نسبی یا ونوجکت سرسبز دارای هپارین سیترات و توسط نیدل دوطرفه و هولدر صورت گرفت و در نهایت ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد. برای تهیه کاریوتایپ در بزرگسالان، ۳۰۰ میکرولیتر خون و در کودکان، ۲۰۰ میکرولیتر از خون داخل لوله ونوجکت برداشته شد و مابقی آن برای تکرار آزمایش در همان لوله حاوی ضد انعقاد در یخچال نگهداری گردید. لازم به ذکر است که خون گرفته‌شده تنها تا ۷۲ ساعت دارای بهترین فعالیت سلولی برای کشت سلولی می‌باشد. باید خاطرنشان ساخت که لوله‌های خون‌گیری ونوجکت، فاقد آلودگی بوده و یک بار مصرف هستند. جمع‌آوری خون به وسیله لوله‌های خون‌گیری ونوجکت با توجه به مزیت‌هایی از جمله سرعت عمل بیشتر، عدم آلودگی محیطی و همولیز کمتر خون نسبت به روش خون‌گیری سرنگی در مراکز آزمایشگاهی برای انواع آزمون‌های هماتولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، خون به دلیل وجود خلا نسبی موجود در لوله‌ها از رگ به لوله وارد می‌شود؛ به‌طوری که ابتدا سوزن دوطرفه به نگه‌دارنده متصل گشته و یک طرف سوزن وارد رگ می‌گردد و سمت دیگر سوزن، پوشش پلاستیکی لوله خلا را سوراخ می‌نماید تا به دلیل اختلاف فشار موجود میان لوله و رگ، خون به داخل لوله مکیده شود. نکته قابل‌توجه در مورد این لوله‌ها آن است که میزان همولیز ایجادشده، کاهش یافته و سلول‌های سالم بیشتری برای کشت سلولی وجود خواهد داشت.

۲. مرحله کشت (Culture): در مرحله کشت سلولی، محیط کشت کامل مورد نیاز می‌باشد. در این مرحله دو گروه مجزای کشت سلولی از نمونه انجام شد که در گروه اول از پروتکل استاندارد و در گروه دوم از پروتکل بهینه‌سازی‌شده استفاده گردید. در این ارتباط، در گروه اول ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر خون هپارینه به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت استاندارد کامل ساخته‌شده در فلاسک کشت سلولی T25 اضافه گردید. در گروه دوم سلول‌های سفید خونی موجود در لوله ونوجکت پس از سانتریفیوژ جداسازی شدند و به محیط کشت کامل فاقد سرم جنین گاوی در فلاسک کشت سلولی T25 اضافه گردیدند. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر پلاکت و پلاسمای خون از لوله ونوجکت مخصوص PRP جداسازی شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول فعال‌ساز پلاکتی مخلوط گردید و در نهایت به فلاسک کشت سلولی T25 اضافه شد. در مرحله بعد، فلاسک‌های کشت هر دو گروه درون انکوباتور قرار داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. شایان ذکر است که انکوباتور دارای سیستم کنترل CO_2 و مجهز به روتیتور داخلی بود و در طول کشت سلولی، میزان CO_2 همواره روی ۵ درصد کنترل گردید. ذکر این نکته ضرورت دارد که محیط کشت هر روز به لحاظ عدم وجود آلودگی چک می‌شد. مواد مورد استفاده برای ساخت محلول فعال‌ساز پلاکتی به همراه غلظت مورد نیاز آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱: درصد کل مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت استاندارد و بهینه‌سازی‌شده

مواد محیط کشت	RPMI1640	FBS	Plasma	Platelet	Glutamax	Pen/Strep	PHA
پروتکل استاندارد	۷۷ درصد	۲۰ درصد	---	---	۱ درصد	۱ درصد	۱ درصد
پروتکل بهینه‌سازی‌شده	۷۷ درصد	---	۱۸ درصد	۲ درصد	۱ درصد	۱ درصد	۱ درصد

جدول ۲: محلول فعال‌ساز پلاکتی

نوع ماده	NaCl	$NaHCO_3$	Na_2HPO_4	$MgCl_2$	HEPES
غلظت ماده	۱۳۴ میلی‌مولار	۱۲ میلی‌مولار	۰/۳۴ میلی‌مولار	۱ میلی‌مولار	۱۰ میلی‌مولار

۳. مرحله جمع‌آوری (Harvest): پس از گذشت ۷۲ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر تایمیدین به فلاسک‌های کشت سلولی اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس، ۲۵ میکرولیتر کلسمید (با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) یا کلشسین (با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه انکوبه گردید. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر تریپسین ۵ درصد به فلاسک کشت سلولی اضافه شد و به مدت دو دقیقه در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه نیز ۴ میلی‌لیتر محیط RPMI1640 به آن اضافه شد. در نهایت، سوپ سلولی حاصل‌شده به لوله فالکن ۱۵ منتقل گردید و در سانتریفیوژ قرار داده شد و با شدت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی (Supernatant) دور ریخته شد. لازم به ذکر است که رسوب حاصل که حاوی سلول‌های سفید خونی بود، توسط پیپت پاستور به آرامی ورتکس شد. سپس، محلول هیپوتونیک KCL (Potassium Cchloride) ۷۵ میلی‌مولار آماده گشت. در ادامه، ۵/۶ گرم از KCL در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل گردید و PH آن معادل ۷/۲ تنظیم شد. در مرحله بعد، محلول هیپوتونیک KCL که در دمای اتاق قرار داده شده بود به رسوب اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. برای مخلوط‌کردن، درب لوله فالکن بسته شد و لوله به آرامی بالا و پایین گشت. پس از مخلوط‌شدن، لوله به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، لوله در سانتریفیوژ قرار گرفت و با شدت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه، محلول رویی (Supernatant) دور ریخته شد و رسوب به آرامی ورتکس گردید. سپس، ۶ میلی‌لیتر از محلول فیکساتور که حاوی ترکیب اسید استیک و متانول به نسبت ۱ به ۳ بود و در همان روز تهیه شده و در یخچال نگهداری گشته و دارای دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بود، به لوله اضافه گردید. سپس، لوله به آرامی حرکت داده شد تا رسوب در محلول فیکساتور حل گردد. در مرحله بعد، لوله در سانتریفیوژ قرار داده شد و با شدت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، محلول رویی (Supernatant) دور ریخته شد و رسوب به آرامی ورتکس گردید. شایان ذکر است که مرحله فیکس‌کردن مطابق با روش مذکور حداقل سه بار انجام شد تا رسوب تشکیل‌شده به رنگ شیری درآید. در این مرحله، سلول‌های خونی لنفوسیتی آماده تهیه لام شده بودند؛ بدین‌منظور به مدت چهار ساعت در یخچال نگهداری شدند تا آماده لام‌گیری شوند.

۴. مرحله لام‌گیری (Sliding): از روز قبل اسلایدهایی که به دقت شسته و تمیز شده بودند و توسط دستمال نانو پاک شده و فاقد هرگونه ذرات و یا لکه بودند، درون فریزر گذاشته شدند تا دمای لام‌ها به حدود ۵- درجه سانتی‌گراد برسد. سپس، لام‌ها روی یک سینی قرار داده شدند و لوله فالکن حاوی سلول‌ها که در یخچال بود، برداشته شد و توسط پیپت پاستور، ورتکس گردید. در ادامه با استفاده از پیپت پاستور، چند قطره از محلول شیری‌رنگ درون لوله برداشته شد.

در این مطالعه پیپت پاستور در فاصله حدود ۵۰ سانتی‌متری لام‌ها قرار گرفت و دو قطره یکی به سمت چپ لام و دیگری به سمت راست آن پرتاب شد. پس از مشاهده قوس و قزح (حلقه نیوتون)، یک قطره فیکساتور (اسید استیک و متانول به نسبت ۱:۳) روی آن چکانده شد و از

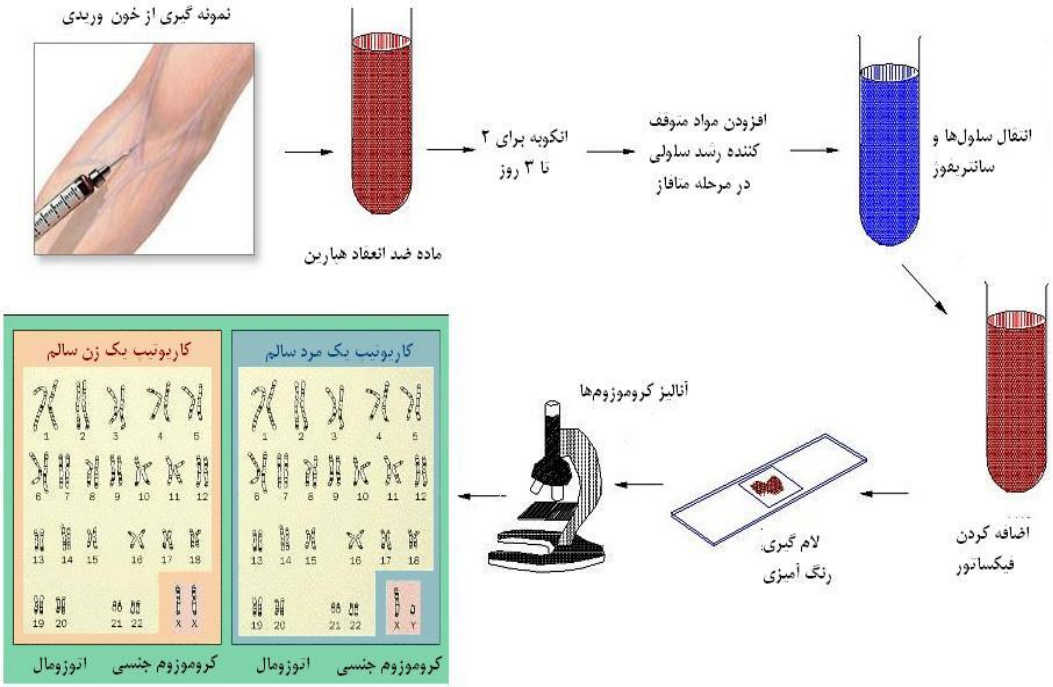
تکان‌دادن لام تا زمان خشک‌شدن کامل آن پرهیز گردید. شایان ذکر است که برای انجام این مرحله، دمای مناسب اتاق معادل ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت آن حدود ۵۰ درصد بود. علاوه‌براین، محیط ایزوله عاری از هرگونه ذرات و گرد و غبار بود.

۵. مرحله رنگ‌آمیزی و باندینگ: لام‌های تهیه‌شده به دو صورت رنگ‌آمیزی شدند: الف. رنگ‌آمیزی ساده به‌منظور شناسایی و شمارش کروموزومی و ب. رنگ‌آمیزی همراه با باندینگ به‌منظور بررسی ساختارهای یوکروماتین، هتروکروماتین، سانترومرو، تلومرو، ساتلایت، باندها و ساب‌باندها. در این مطالعه به‌منظور رنگ‌آمیزی ساده، محلول گیمسا به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دوبار تقطیر، رقیق گردید و PH آن معادل ۷ تنظیم شد. در ادامه، رنگ حاصل رقیق‌شده از فیلتری با مش ۰/۴ میکرون عبور داده شد و در ظرف رنگ‌آمیزی نگهداری گردید. سپس، لام‌ها درون ظرف رنگ‌آمیزی فرو برده شدند و پس از گذشت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه از ظرف رنگ خارج گردیدند و با آب مقطر شستشو داده شدند و برای خشک‌شدن لام روی استند قرار گرفتند. پس از خشک‌شدن لامل، توسط چسب انتلان لامل‌گذاری شد تا بدین‌طریق برای مدت زمان طولانی قابل‌بررسی باشد و به کروموزوم‌های روی آن آسیبی وارد نگردد.

۶. آنالیز اسلاید زیر میکروسکوپ: در این مرحله پس از اینکه اسلایدهای لامل‌گذاری با چسب انتلان مهر و موم (سیلد) شدند، زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند و از کروموزوم‌ها عکس گرفته شد (۱۲). مراحل شش‌گانه انجام کاریوتایپ در شکل ۱ نشان داده شده است (۱۳).

پلاسمای غنی‌شده با پلاکت (PRP)

پلاسمای غنی از پلاکت، پلاسمای غلیظ‌شده خون است که دارای مقادیر فراوان پلاکت می‌باشد. از این پلاسما که از خود بیمار تهیه می‌گردد، برای ترمیم بریدگی‌ها و ضایعات پوستی، صدمات بافت نرم و بهبود رشد فولیکول‌های مو در برخی از مراکز درمانی استفاده می‌شود. پلاکت‌ها بیش از



شکل ۱: شش مرحله انجام کاریوتایپ

هفت نوع از عوامل رشد یا فاکتورهای رشد را ترشح می‌کنند. مهم‌ترین فاکتورهای ترشح‌شده توسط پلاکت‌ها عبارت هستند از: فاکتور رشد پلاکتی، فاکتور رشد شبه‌انسولینی، فاکتور رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و فاکتور رشد تغییردهنده بتا که این فاکتورها در فرایند ترمیم ضایعات و صدمات بافت‌های بدن شرکت دارند (۱۶-۱۴).

افزایش تراکم سلولی

در این مطالعه یک مرحله به مراحل پنج‌گانه انجام کاریوتایپ اضافه شد که برگرفته از اصول انجام PRP بود. پس از مرحله نمونه‌گیری که توسط ونوجکت‌های هپارین سیترات صورت گرفت، ۵ میلی‌لیتر خون از بیمار گرفته شد. سپس، لوله ونوجکت داخل سانتریفیوژ قرار گرفت و با شدت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. باید توجه داشت که پس از این مرحله، چهار فاز در لوله مشاهده می‌گردد. چهار فاز اصلی خون در شکل ۲ قابل‌مشاهده می‌باشند (۱۷،۱۸).

فاز اول رسوب (Pellet) که به رنگ قرمز بود (حاوی سلول‌های قرمز یا RBC) در پایین قرار گرفته بود. فاز دوم حاوی سلول‌های سفید یا WBC خون بود که به رنگ سفید مشاهده می‌شد. فاز سوم نیز که به بافی‌کت مشهور است، حاوی پلاکت‌های غنی از پلاسما بوده و به رنگ شیری مشاهده می‌شود. فاز چهارم که رنگ زرد دارد نیز پلاسمای خون است. در پژوهش حاضر در گروه اول (کنترل) از روش معمول انجام کاریوتایپ استفاده شد. بدین‌منظور ۵۰ میکرولیتر از خون هپارینه به محیط کشت با سرم جنین گاوی اضافه گردید و در انکوباتور قرار گرفت. در گروه دوم (با PRP) سرم جنین گاوی حذف شد و پلاسمای خود فرد که در فاز بالای لوله قرار داشت به جای آن به محیط کشت اضافه گردید. در ادامه، فازهای بافی‌کت و سلول‌های سفید خونی جدا شدند و وارد محیط کشت گردیدند. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول فعال‌ساز پلاکت که ترکیب آن در جدول ۲ ارائه شده است، به محیط کشت اضافه گردید و در انکوباتور قرار گرفت. شکل (۲- الف) فازهای موجود در لوله خون سانتریفیوژشده را نشان می‌دهد. در شکل (۲- ب) نیز اجزای کیت جداسازی PRP از خون قابل‌مشاهده می‌باشد (۲۱-۱۹).

مزایای افزایش تراکم سلولی

روش‌های مختلفی برای افزایش تراکم سلولی وجود دارد. در این مطالعه از روش PRP استفاده گردید؛ به‌طوری که

شکل (۲- الف): فازهای خون پس از سانتریفیوژ

شکل (۲- ب): اجزای کیت جداسازی PRP از خون

با انجام سانتریفیوژ بر روی ونوجکت‌های حاوی خون و ماده ضد انعقادی هپارین سیترات، سه فاز اصلی شکل گرفت (فاز بالایی پلاسمای خون است؛ فاز وسط که به بافی‌کت مشهور می‌باشد، شامل پلاکت و سلول‌های سفید خون است؛ فاز پایین حاوی سلول‌های قرمز خون می‌باشد).

۱. مزیت اول این روش این است که سلول‌های RBC خون که فاقد کروموزوم هستند را از محیط کشت حذف می‌کند و دیگر نیازی به چندین مرحله شستشو و فیکس‌کردن نمی‌باشد. همچنین در این روش سلول‌های WBC فضای بیشتری را برای کشت در اختیار داشته و بدون مزاحمت سلول‌های RBC می‌توانند تقسیم شوند.

۲. مزیت دوم این روش، وجود مقدار زیاد پلاسما و پلاکت‌ها نسبت به روش کشت معمول است؛ به‌طوری که این پلاکت‌ها خود می‌توانند فاکتورهای رشد را تولید نموده و به محیط کشت اضافه نمایند. این امر برای کشت بهتر و سریع‌تر سلول‌های لنفوسیتی بسیار مناسب می‌باشد. البته شایان ذکر است که پلاکت‌ها برای تولید فاکتورهای رشد باید فعال شوند که این امر توسط محلول فعال‌ساز پلاکتی امکان‌پذیر می‌گردد.

۳. مزیت سوم این روش، وجود پلاسمای زیاد نسبت به روش معمول است که این پلاسمای خونی، نیاز به استفاده از FBS را کاهش می‌دهد. این امر علاوه بر صرفه اقتصادی در انجام کاریوتایپ باعث کاهش ریسک آلوده‌شدن محیط کشت توسط FBS (که ممکن است آلوده باشند) می‌شود.

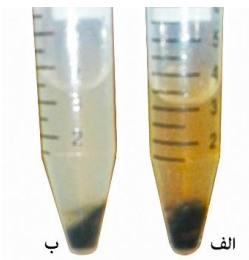
۴. مزیت چهارم این روش، عدم تحریک آنتی‌ژنی لنفوسیت‌ها توسط پروتئین‌های جنین گاوی است؛ به‌طوری که با حذف سرم جنین گاوی، دیگر پروتئین‌های بیگانه در محیط کشت وجود ندارند و لنفوسیت‌ها تنها در برابر پروتئین‌های انسانی خودی قرار می‌گیرند؛ این ویژگی مانع از واکنش آنتی‌ژنی در لنفوسیت‌ها می‌شود.

نتایج

در این مطالعه از آنالیزهای کمی و کیفی به‌منظور بررسی مقایسه روش معمول با روش بهینه‌سازی‌شده استفاده گردید. همچنین از لام نئوبار برای شمارش سلول‌های لنفوسیتی در محیط کشت گروه کشت ساده و گروه کشت بهینه‌سازی‌شده بهره گرفته شد. نرم‌افزار ImageJ نیز برای شمارش سلول‌های لنفوسیتی در اسلایدهای نهایی کاریوتایپ دو گروه ساده و بهینه‌سازی‌شده مورد استفاده قرار گرفت.

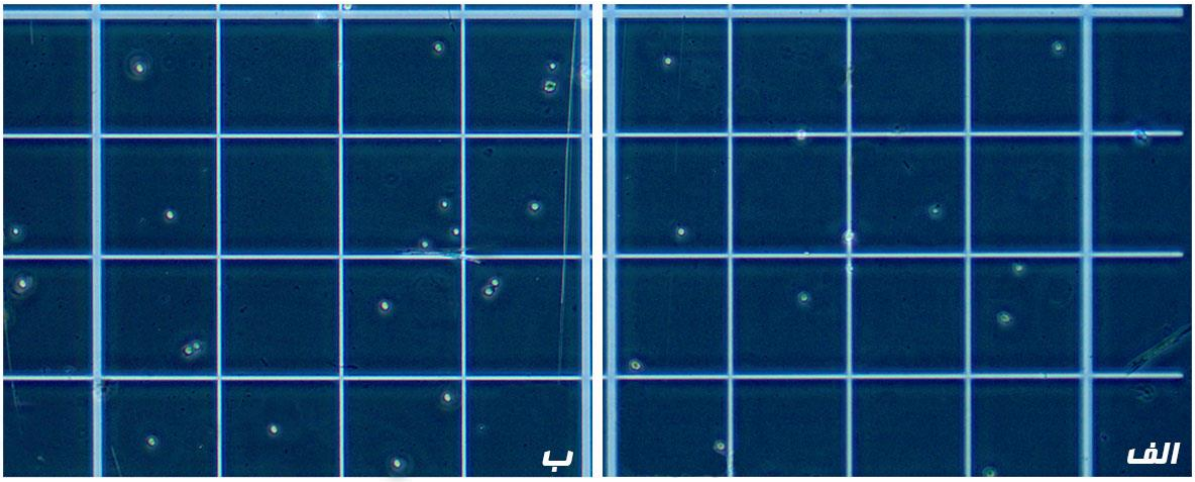
آنالیز کمی و کیفی سلول‌های لنفوسیتی

در مرحله جمع‌آوری یا هاروست روش بهینه‌سازی‌شده، از آنجایی که لوله آزمایش تنها حاوی سلول‌های WBC کشت‌یافته بود، سلول‌های لنفوسیت بیشتری نسبت به حالت معمول کشت گردید. باید توجه داشت که پس از هر مرحله سانتریفیوژ در مراحل مختلف جمع‌آوری سوپرناتانت، محلول سلولی سفیدرنگ‌تری نسبت به حالت معمول مشاهده می‌شود (شکل ۳). در شکل ۴ رنگ پس‌زمینه



شکل ۳: مقایسه رنگ سوپ سلولی
الف: با استفاده از روش معمول؛ ب: با استفاده از روش بهینه‌سازی

شکل ۴: مقایسه رنگ پس‌زمینه پس از لام‌گیری
الف: با استفاده از روش معمول؛ ب: با استفاده از روش بهینه‌سازی

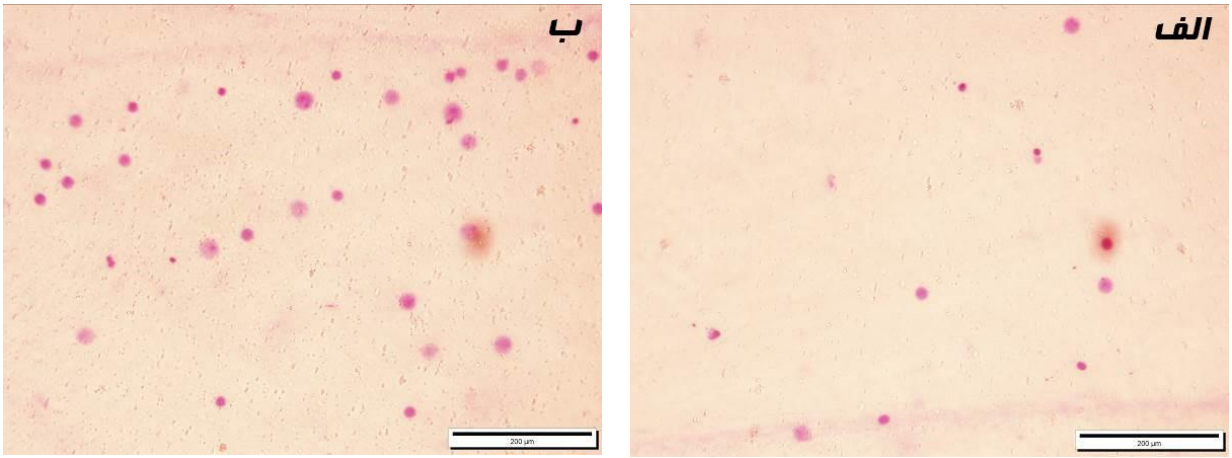


شکل ۵: شمارش سلول‌های لنفوسیتی توسط لام نئوبار الف: با استفاده از روش معمول؛ ب: با استفاده از روش بهینه‌سازی

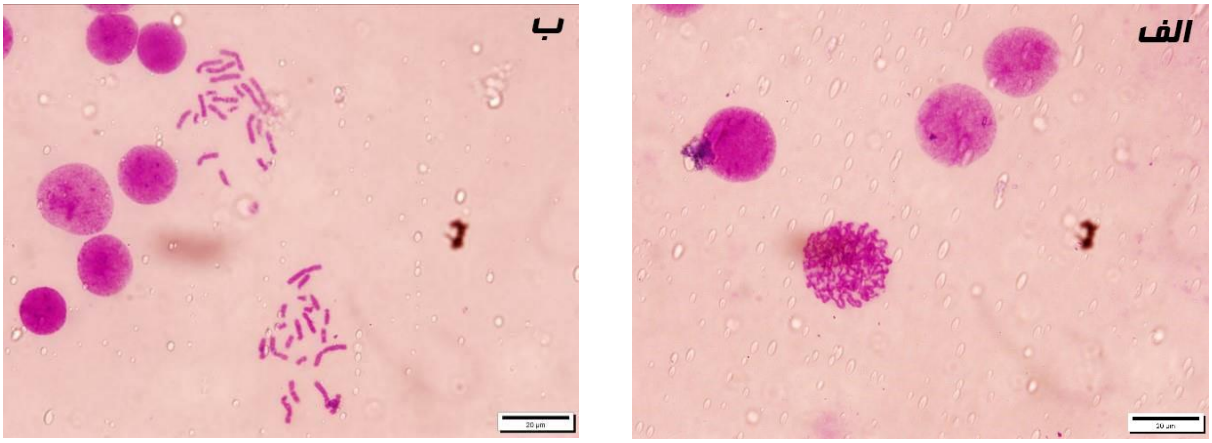
پس از لام‌گیری و رنگ‌آمیزی با گیمسا در گروه بهینه‌سازی‌شده، روشن‌تر از گروه معمول می‌باشد که این امر دبری کمتری را در تصاویر نهایی ایجاد می‌کند. پس از اتمام مرحله کشت سلولی، شمارش سلول‌ها توسط لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان‌دهنده افزایش سه برابری سلول‌های لنفوسیتی نسبت به حالت معمول بود که این مهم در شکل ۵ قابل‌مشاهده می‌باشد.

آنالیز اسلایدهای کاریوتایپ

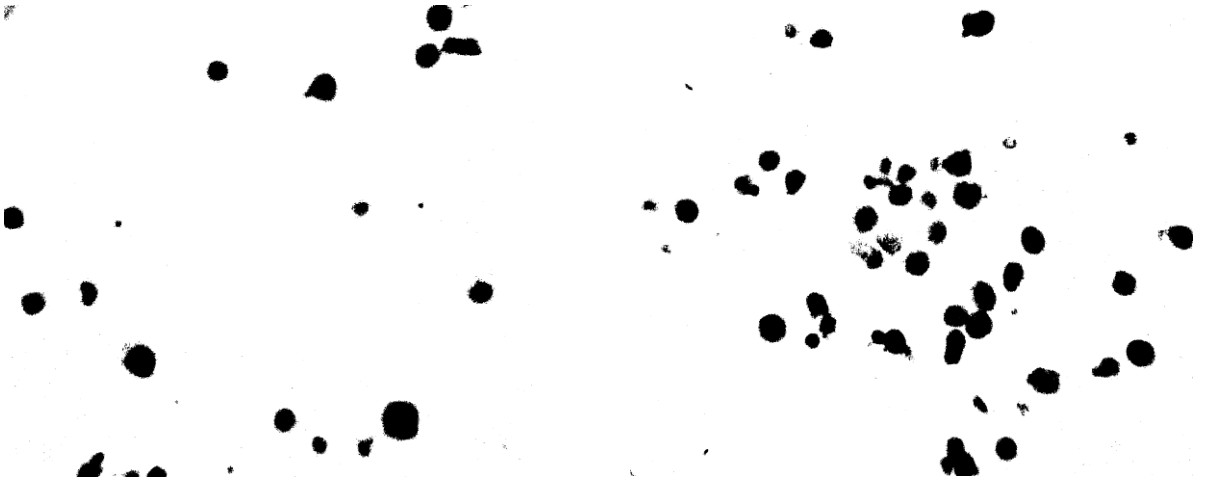
اسلایدهای نهایی کاریوتایپ در گروه بهینه‌سازی‌شده دارای تراکم بهتری از سلول‌های لنفوسیتی هستند که این مهم در شکل ۶ نشان داده شده است. افزایش تراکم سلول‌های لنفوسیتی در اسلایدهای کاریوتایپ باعث افزایش تعداد سلول‌های بازشده با کروموزوم‌های قابل‌مشاهده می‌شود که این امر آنالیز کاریوتایپ را آسان‌تر ساخته و در آنالیز موزائیسم‌های سلولی بسیار مفید می‌باشد. در شکل ۷ افزایش تعداد سلول‌های بازشده با کروموزوم‌های قابل‌مشاهده در حالت بهینه‌سازی‌شده مشاهده می‌شود. شمارش تعداد سلول‌های لنفوسیتی در اسلایدهای کاریوتایپ در دو حالت معمولی و بهینه‌سازی‌شده توسط نرم‌افزار ImageJ نیز در



شکل ۶: مقایسه تعداد سلول‌های لنفوسیتی پرومتافاز در اسلایدهای کاریوتایپ در دو حالت معمولی و بهینه‌سازی‌شده با بزرگنمایی عدسی ۴۰x
الف: با استفاده از روش معمول؛ ب: با استفاده از روش بهینه‌سازی



شکل ۷: افزایش تعداد سلول‌های بازشده با کروموزوم‌های قابل‌مشاهده در حالت بهینه‌سازی‌شده با بزرگنمایی عدسی ۱۵۰x
الف: با استفاده از روش معمول؛ ب: با استفاده از روش بهینه‌سازی



Slide	Count	Total Area	Average Size	%Area
گروه بهینه‌سازی	۵۷	۱۹۷۳۲۷	۳۴۶۱/۸۷۷	۶/۳۱۱

Slide	Count	Total Area	Average Size	%Area
گروه ساده	۲۷	۷۸۶۹۴	۲۹۱۴/۵۹۳	۳/۰۹۶

شکل ۸: مقایسه تعداد سلول‌های لنفوسیتی در اسلایدهای کاریوتایپ در دو حالت معمولی و بهینه‌سازی‌شده توسط نرم‌افزار ImageJ

شکل ۸ نشان داده شده است.

بحث

در مطالعه حاضر در پروتکل بهینه‌سازی‌شده انجام کاریوتایپ، کیفیت بهتر کروموزوم‌ها و کمیت بیشتر آن‌ها در تصاویر نهایی اسلایدهای کاریوتایپ مشاهده شد. همچنین رنگ پس‌زمینه پس از لام‌گیری و رنگ‌آمیزی با گیمسا در گروه بهینه‌سازی‌شده، روشن‌تر و دارای دبری کمتری از گروه معمول بود. در این راستا، Pawitan و همکاران با حذف سرم جنین گاوی و سرم جنین گوساله از محیط کشت سلول‌های انسانی و نیز افزودن پلاکت‌های حاصل از روش PRP به محیط کشت توانستند کشت سلول‌های مزانشیمی (BM-MSC: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell) و سلول چربی (AT-SC: Adipose tissue-derived stem cells) را بهبود ببخشند. در مطالعه حاضر نیز از همین روش برای کشت سلول‌های لنفوسیتی استفاده شد و نتایج خوبی حاصل گردید. همچون پژوهش حاضر، Pawitan و همکاران در مطالعه خود به تعداد بیشتری از سلول‌های کشت‌شده

دست یافتند که این امر امکان اثربخش‌بودن این روش در کشت سلول در تمامی رده‌های سلولی انسانی را محتمل می‌کند (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر Myung و همکاران برای فعال‌سازی پلاک‌های حاصل از روش PRP از روشی نوین توسط دستگاه هموژنایزر استفاده کردند و نتایج خوبی را برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف به‌دست آوردند. در پژوهش مذکور مهاجرت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز بهبود یافته بود. تفاوت یافته‌های مطالعه Myung و همکاران با نتایج پژوهش حاضر در روش فعال‌سازی پلاکت‌ها است. پژوهشگران مذکور از روش مکانیکی برای فعال‌سازی پلاکت‌ها استفاده کردند؛ در صورتی که در مطالعه حاضر برای کشت سلول‌های لنفوسیتی از روش شیمیایی برای فعال‌سازی پلاکت‌ها استفاده گردید و در هر دو مطالعه نتایج خوبی برای کشت سلولی مشاهده شد. مقایسه این دو مطالعه نشان‌دهنده امکان استفاده از روش‌های دیگر برای فعال‌سازی پلاک‌های حاصل از روش PRP می‌باشد (۲۳).

Gaßling و همکاران نیز با مقایسه دو روش پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) با روش فیبرین غنی از پلاکت (PRF: Platelet-Rich Fibrin) در کشت سلول‌های استئوبلاستی نشان دادند که کاربرد روش PRP در کشت سلولی منجر به سطوح بالاتری از رشد سلولی در مقایسه با روش PRF می‌شود. در مطالعه حاضر نیز از روش PRP برای کشت سلول‌های لنفوسیتی استفاده شد و نتایج خوبی را در ارتباط با افزایش رشد سلولی نشان داد. این امر حاکی از برتری روش PRP نسبت به روش‌های دیگر می‌باشد (۲۴).

نکات کلیدی در راستای انجام بهینه آزمون کاریوتایپ

نمونه‌گیری از خون محیطی به روش بسته، یکی از کلیدی‌ترین مراحل در انجام صحیح آزمون کاریوتایپ بوده و رعایت نکات دقیق و اصولی در نمونه‌گیری بر کیفیت نهایی اسلایدهای کاریوتایپ اثرگذار می‌باشد. در این ارتباط، رعایت موارد زیر در مرحله نمونه‌گیری در این آزمون پیشنهاد می‌شود:

۱. بهتر است در مرحله سانتریفیوژ از دستگاه‌های سانتریفیوژ سوینگ هد (Swing Head) (بال متحرک) و دارای کنترل دما استفاده نمود تا فازهای مختلف به موازات یکدیگر و به‌صورت صاف تشکیل شوند و با کنترل دما، مانع از آسیب دیدن سلول‌ها گردند.

۲. استفاده از سوزن یا نیدل دوطرفه با گیت 15G که این نوع سوزن دارای قطر بزرگی بوده و مطلوب‌تر است و در موقع خارج‌شدن سلول‌ها به سمت ونوجکت، آسیب کمتری را به آن‌ها وارد می‌کند.

متأسفانه کیت تجاری مخصوص انجام آزمون کاریوتایپ در ایران تولید نشده است. با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر می‌توان کیت بهینه‌سازی و بومی‌سازی‌شده به‌منظور انجام آزمون کاریوتایپ را تولید کرد تا آزمایشگاه‌های ژنتیک کشور بتوانند بر مبنای استاندارد یکسانی این آزمون را انجام دهند.

امید است انجام چنین مطالعاتی در مورد بیمارانی که دارای سندروم‌های کروموزومی ناشناخته هستند، بیشتر انجام شود و با همراهی روش‌های تشخیصی مولکولی با استفاده از این روش بتوان راه‌کار مناسبی را برای تشخیص این گروه از بیماران به‌دست آورد.

نتیجه‌گیری

با تلفیق آزمون کاریوتایپ و روش درمانی PRP می‌توان به روش بهینه در انجام کاریوتایپ دست یافت که مزایای بسیاری از جمله کاهش سلول‌های RBC، افزایش سلول‌های WBC همچون لنفوسیت‌ها و نیز پلاکت‌های تولیدکننده فاکتورهای رشد در محیط کشت و عدم تحریک آنتی‌ژنی

لنفوسیت‌ها توسط پروتئین‌های جنین گاوی را به همراه دارد. حذف سرم جنین گاوی و جایگزینی آن با سرم انسانی خود بیمار و پلاکت‌های فعال‌شده در آن باعث کاهش ریسک آلودگی و زمان انجام آزمایش می‌شود؛ بدین‌طریق آزمایشگاه‌های ژنتیک می‌توانند با هزینه کمتر و کیفیت بیشتری این آزمون را انجام بدهند.

حمایت مالی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه دولتی شهرکرد می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی دانشگاه دولتی شهرکرد و دانشکده علوم پایه این دانشگاه در راستای انجام این پایان‌نامه تشکر نمایند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی ملاحظات اخلاقی در مورد آزمودنی‌ها، نمونه‌گیری از داوطلبان و سایر موارد پژوهشی براساس بیانیه هلسینکی (Helsinki) و کد سی و یک گانه اخلاق پژوهشی کشور تنظیم و رعایت شد.

تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه ارتباط مالی میان نویسندگان مقاله با روش و موادی که پژوهش در مورد آن‌ها صورت‌گرفته است، وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دکتر عمادی بیگی؛ ریاست دانشکده علوم پایه دانشگاه دولتی شهرکرد (به دلیل حمایت‌ها و راهنمایی‌های علمی) و نیز از هیأت داوران پایان‌نامه که پژوهشگران را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری رساندند، تشکر نمایند.

References

1. Shams A. Principle of clinical cytogenetic. Tehran: Self-Published (Amir Shams); 2014. P. 120.
2. Fernández R, Guillamón A, Gómez-Gil E, Esteva I, Almaraz MC, Cortés-Cortés J, et al. Analyses of karyotype by G-banding and high-resolution microarrays in a gender dysphoria population. Gen Genom. 2018; 40(5):465-73.
3. Du P, Li L, Liu H, Fu L, Qin L, Zhang Z, et al. High-resolution chromosome painting with repetitive and single-copy oligonucleotides in Arachis species identifies structural rearrangements and genome differentiation. BMC Plant Biol. 2018; 18(1):240.
4. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, Filby A, Gemelos G, Hill M, et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. Mol Hum Reprod. 2010; 16(12):944-9.
5. Lupski JR. Genome mosaicism-one human, multiple genomes. Science. 2013; 341(6144):358-9.
6. Meisner LF, Johnson JA. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. Methods. 2008; 45(2):133-41.
7. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reprod Med Biol. 2017; 16(2):99-117.
8. Balajee AS, Hande MP. History and evolution of cytogenetic techniques: current and future applications in basic and clinical research. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2018; 836 (Pt A):3-12.
9. Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. Fertil Steril. 2001; 75(4):678-82.
10. Ferguson-Smith MA, Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. Nat Rev Genet. 2007; 8(12): 950-62.
11. Shabir PA, Wani AA, Nawchoo IA. Banding techniques in chromosome analysis. In: Bhat TA, Wani AA, editors. Chromosome structure and aberrations. New Delhi: Springer India; 2017. P. 167-80.
12. Arora T, Dhir R. A review of metaphase chromosome image selection techniques for automatic karyotype generation. Med Biol Eng Comput. 2016; 54(8): 1147-57.
13. Howe B, Umrigar A, Tsien F. Chromosome preparation from cultured cells. J Vis Exp. 2014; 83:e50203.
14. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-rich plasma: growth

factors and pro- and anti-inflammatory properties. J Periodontol. 2007; 78(4):661-9.
15. Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of platelet-rich plasma extraction: variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. Orthop J Sports Med. 2017; 5(1):2325967116675272.
16. Oudelaar BW, Peerbooms JC, Huis in 't Veld R, Vochteloo AJ. Concentrations of blood components in commercial platelet-rich plasma separation systems: a review of the literature. Am J Sports Med. 2018; 47(2):479-87.
17. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. Am J Sports Med. 2010; 39(2):266-71.
18. Lansdown DA, Fortier LA. Platelet-rich plasma: formulations, preparations, constituents, and their effects. Operat Techn Sports Med. 2017; 25(1):7-12.
19. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. Am J Sports Med. 2008; 36(6):1171-8.
20. Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolíbar I, Rodríguez L, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2016; 5:CD006899.
21. Leiter O, Seidemann S, Overall RW, Ramasz B, Rund N, Schallenberg S, et al. Exercise-induced activated platelets increase adult hippocampal precursor proliferation and promote neuronal differentiation. Stem Cell Rep. 2019; 12(4):667-79.
22. Pawitan JA. Platelet rich plasma in xeno-free stem cell culture: the impact of platelet count and processing method. Curr Stem Cell Res Ther. 2012; 7(5):329-35.
23. Myung H, Jang H, Myung JK, Kim MJ, Lee SB, Jang WS, et al. A method for the activation of platelet-rich plasma via bead mill homogenizer for mesenchymal stem cell culture. Tissue Eng Part C Methods. 2017; 23(8):465-73.
24. Gassling VL, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol. 2009; 108(1):48-55.

Volume 22, Issue 70, Summer 2019, Pages: 45-58

Original Article

Optimization of Lymphocyte Cell Culture for Karyotype Using a Platelet-rich Plasma Method

Amir Shams[1], Hoda Ayat[2*], Ali Mohammad Ahadi[2]

[1] MSc, Instructor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] PhD, Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 11 May 2019 **Accepted:** 01 August 2019

Abstract

Introduction: Karyotype is one of the most popular and most widely used tests in genetic laboratories throughout the country. In this study, the karyotype diagnostic method and platelet-rich plasma therapy (PRP) have been integrated into each other to improve the quality of the karyotype test. This technique is essential in genetic labs where blood samples are deficient, or few cells are available for a karyotype test. The aim of this study was to optimize lymphocyte cell cultures for performing a karyotype test using a platelet-rich plasma method.

Materials and Methods: This applied study included 30 cases from Shahrekord University in 2013. Platelet-rich plasma therapy was used to increase white blood cell and decrease red blood cells as well as other annoying and unnecessary factors in cell culture media to improve the lymphocyte cell culture.

Results: The final slides of karyotypes made with this method had excellent quality and a reasonably transparent background, compared to the conventional methods. It should be noted that in the final slide, there were more chromosomes than those in the conventional karyotype method.

Conclusion: The better quality of the chromosomes in the karyotype slides makes the study of the chromosomes' structure very convenient and more accurate. On the other hand, the more chromosomes are retained in the karyotype slides which improve their analysis using special karyotype software and make the detection of structural mosaicism more accurately in karyotype slides.

Keywords: Chromosome analysis, Karyotype, Lymphocyte cell culture, Platelet-rich plasma

***Corresponding Author:** Hoda Ayat, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Tel: 09122258211; Email: hoda.ayat@gmail.com