

PENAMBAHBAIKAN PROSEDUR PEMROSESAN DARAH UNTUK ANALISIS ABERASI KROMOSOM

Noraisyah Mohd Yusof, Juliana Mahamad, Rahimah Abd Rahim, Yahaya Talib dan Mohd Rodzi Ali

Bahagian Teknologi Perubatan
Agensi Nuklear Malaysia, 43000 KAJANG, MALAYSIA

ABSTRAK

Pengesanan kromosom dilakukan semasa peringkat metafasa sel menggunakan mikroskop secara manual ataupun automatik. Prosedur penyediaan slaid yang diterbitkan oleh IAEA tidak menjamin penghasilan slaid yang baik untuk mengesan metafasa secara automatik. Kadar mengesan menjadi rendah jika terdapat serpihan kotoran sel semasa penyediaan slaid. Kertas kerja ini menerangkan modifikasi yang dilakukan pada prosedur standard. Tempoh masa tindak balas hipotonik pada sel dipanjangkan, pra-rawatan slaid menggunakan RNase dan menambah kekerapan bilasan pada slaid semasa proses pewarnaan kromosom. Keputusan menunjukkan imej metafasa yang lebih baik dan jelas telah dihasilkan serta bilangan metafasa yang dapat dikesan oleh perisian mikroskop automatik juga turut meningkat. Sebagai rumusan penambahbaikan pada protokol sedia ada telah membantu dalam proses ujian aberasi kromosom di Nuklear Malaysia.

Kata kunci : Aberasi kromosom, metafasa, sampel darah, biosimetri.

ABSTRACT

Detection of chromosome at metaphase of the cell cycle is performed either manually or automatically. Procedure for slide preparation published by the IAEA does not guarantee that the quality of slide is suitable for automatic detection. The detection efficiency reduces if there is cell's debris on slides. This paper describes the modifications made to the standard procedure. The period of hypotonic treatment to the cell was lengthened; the slides were pre-treated with RNase and the frequency of rinsing during the chromosomal coloring process was increased. Results show the metaphase images were better and clearer, and numbers of metaphase that can be detected automatically were also increased. In conclusion, modification to the current standard protocol helps to easy the process of chromosome aberration analysis at Nuclear Malaysia.

Key words: Chromosome Aberration, metaphase, whole blood sample, biosimetry

PENGENALAN

Proses kerja ujian aberasi kromosom bermula dari pengkulturan sel, penuaian sel, penyediaan slaid sehingga pewarnaan kromosom. Setiap proses ini amat kritikal kerana ia boleh mempengaruhi hasil akhir. Semasa proses penuaian sel, penghasilan gelendong mitotik akan dihalang dengan penambahan kolsemid (*colcemid*) dan pembahagian sel akan dihentikan pada tahap metafasa. Semasa rawatan hipotonik, membran sel darah merah akan pecah dan menyebabkan kromosom meninggalkan sel. Larutan penetap (*fixer*) pula akan mengekalkan sel dalam keadaan mengembang dan penyingkiran air dari dalam sel menyebabkan bahan dan struktur organel dalam sel menjadi keras. Selain itu, larutan penetap membuang lipid dan protein yang menyebabkan sel menjadi rapuh dan mudah diproses semasa pewarnaan kromosom.

Pada masa ini perisian pengecam metafasa secara automatik telah digunakan bagi menggantikan proses analisis secara manual menggunakan mikroskop cahaya. Penukaran dari sistem manual kepada automasi memberi kesukaran kerana sistem automasi ini perlu dilatih dan disetkan untuk memilih imej yang jelas bagi memudahkan proses analisa. Jika slaid tidak disediakan dengan baik kemungkinan mengakibatkan banyak sel metafasa gagal dikesan oleh perisian.

Protokol yang dikeluarkan oleh Agensi Tenaga Atom Antarabangsa (IAEA) telah menetapkan tempoh masa 15-20 minit untuk rawatan hipotonik bagi teknik disentrik serta saranan melakukan pra-rawatan slaid menggunakan RNase A . Dalam kajian ini, masa rawatan hipotonik telah dipanjangkan kepada 30 minit, melakukan langkah pra-rawatan slaid serta menambah jumlah bilasan semasa pewarnaan kromosom menggunakan larutan Giemsa. Hasil yang diperoleh menunjukkan imej yang lebih jelas, kurang serpihan kotoran sel dan dapat meningkatkan kadar bilangan metafasa menggunakan mikroskop automatik.

METODOLOGI

Pengkulturan sampel

Sampel dikultur menggunakan 1ml darah yang dimasukkan secara aseptik ke dalam 10ml media kultur. Sampel kemudiannya dieramkan selama 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator yang dibekalkan dengan 5% CO₂. Selepas 45 jam pengeraman, 0.1ml kolsemid dimasukkan ke dalam kelalang pengkulturan secara pantas untuk memberhentikan proses mitosis. Sampel dieram semula selama 3 jam lagi sebelum diproses untuk mendapatkan sel pada peringkat metafasa.

Penuaian sel

Selepas proses pengeraman tamat, sampel boleh diproses seperti biasa tanpa menggunakan teknik aseptik. Sampel darah diempar, bahagian atas yang terhasil atau supernatan dibuang dan kemudiannya digantikan dengan larutan hipotonik. Larutan 0.075M kalium klorida dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 37°C. Seterusnya sampel akan dipanaskan dalam pengukus air selama 30 minit pada suhu yang sama. Sampel kemudiannya diempar sekali lagi pada kelajuan yang sama iaitu 1000rpm dan supernatannya dibuang. Proses seterusnya adalah menambahkan larutan penetap sediaan segar (3:1 metanol/ asid asetik) secara perlahan-lahan dan berhati-hati untuk mengelakkan sel bergumpal. Sampel diempar sekali lagi dan digantikan dengan larutan penetap baru, yang mana proses ini diulangi sebanyak 3 kali sehingga supernatan menjadi jernih. Langkah terakhir adalah dengan meninggalkan sedikit supernatan untuk dicampurkan dengan pelet sel sebelum dititikkan ke atas slaid kaca yang bersih.

Pra-rawatan slaid

Setelah slaid dikeringkan semalaman pada suhu bilik, ia akan menjalani proses pra-rawatan slaid menggunakan RNase A sebelum kromosom diwarnakan. Langkah ini adalah untuk menyingkirkan sisa bahan sitoplasmik yang boleh diwarnakan oleh pelarut Giemsa. Pengasingan bahan sitoplasmik ini akan memberikan imej yang lebih jelas dan bersih. Larutan kerja RNase A berkepekatan 0.5mg/ml disediakan dengan memanaskan terlebih dahulu pada suhu 70°C selama 10 minit menggunakan pemanas blok kering. Setelah disejukkan pada suhu bilik, ia kemudiannya dicairkan dengan menambahkan air suling pada suhu 37°C dengan nisbah 1:20 (larutan stok RNase : air suling). Slaid perlu dibilas dengan air suling sebelum direndam ke dalam larutan kerja RNase selama 10 minit pada suhu 37°C. Setelah itu, slaid dicuci dengan air suling dan direndam pula ke dalam larutan penetap 3:1 metanol: asid asetik selama 2 minit sebelum dikeringkan pada suhu bilik.

Pewarnaan kromosom

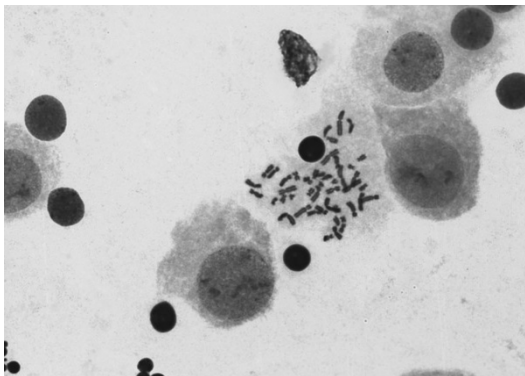
Kromosom pada slaid diwarnakan menggunakan 2% pewarna Giemsa yang dilarutkan dalam air suling selama 10 minit. Setelah itu slaid dibilas dengan air suling beberapa kali sehingga bersih. Pembilasan perlu dilakukan sehingga warna lumuran menjadi sedikit pudar. Warna yang pekat akan mengakibatkan imej yang dijejak menjadi terlalu gelap dan seterusnya menyukarkan analisa kromosom. Slaid dikeringkan pada suhu bilik dan pewarna Giemsa dipelihara dengan meletakkan media pelekap DPX dan ditutup dengan kaca penutup.

Penganalisaan slaid

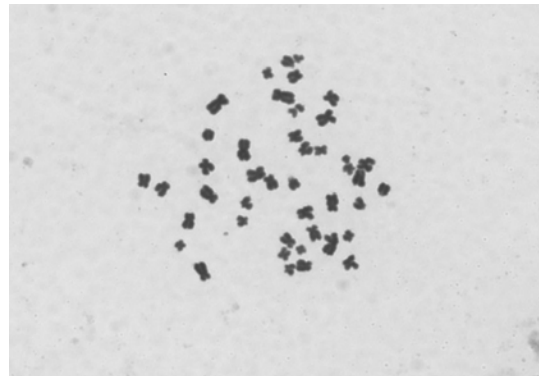
Kromosom dianalisis menggunakan mikroskop automatik yang dilengkapi dengan perisian Metafer 4. Slaid diimbis menggunakan objektif 20x sebelum imej terpilih dijejak menggunakan objektif rendaman minyak 63x. Kesemua langkah ini dilakukan secara automatik kecuali langkah pemilihan sel metafasa. Pemilihan sel metafasa yang mempunyai imej yang jelas dan bersih daripada serpihan sitoplasma dilakukan secara manual. Imej yang telah dijejak, disimpan sebelum dianalisis. Proses analisis dilakukan menggunakan perisian Metafer 4.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Gambarajah 1 hingga 6 menunjukkan slaid sebelum dan selepas penambahbaikan dilakukan. Keputusan menunjukkan perbezaan yang ketara selepas penambahbaikan dilakukan.

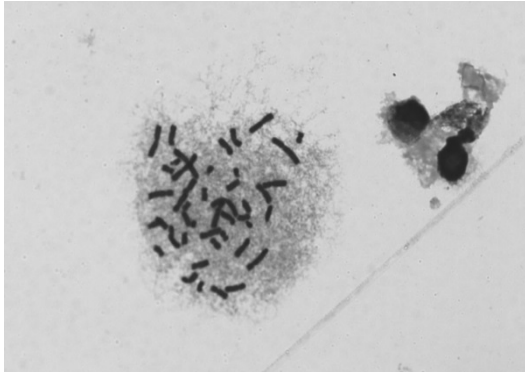


Gambarajah 1. Rawatan hipotonik selama 15 min

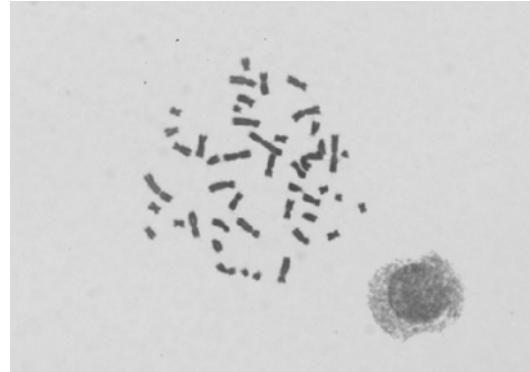


Gambarajah 2. Rawatan hipotonik selama 30 min

Gambarajah 1 menunjukkan slaid yang telah dirawat dengan hipotonik selama 15 minit. Pada bahagian latar belakang terdapat serpihan sitoplasma dan membran sel yang tidak terpecah sepenuhnya. Gambarajah 2 menunjukan imej kromosom yang diberi rawatan hipotonik selama 30 minit. Tempoh masa yang lama diperlukan untuk memastikan membran sel telah terpecah sepenuhnya dan menghasilkan imej yang lebih bersih

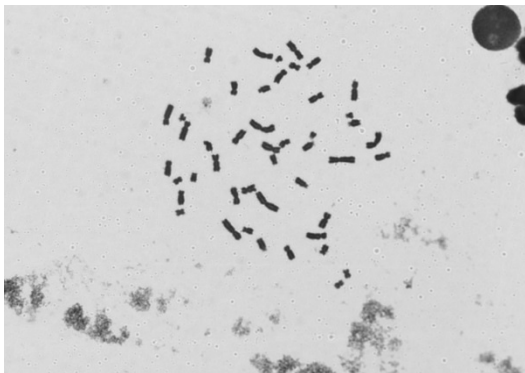


Gambarajah 3. Slaid tanpa pra-rawatan RNase A

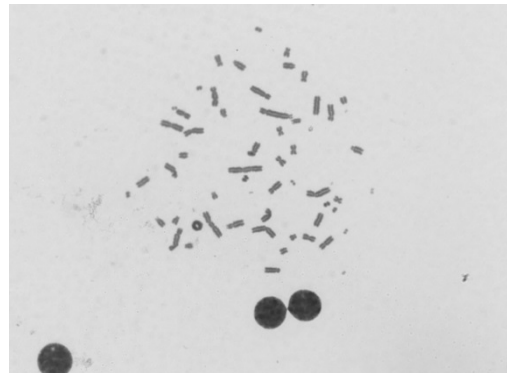


Gambarajah 4. Slaid dengan pra-rawatan RNase A

Gambarajah 3 dan 4 menunjukkan slaid yang tidak dirawat dengan RNase dan yang dirawat dengan RNase A. RNase berfungsi untuk menyingkirkan sisa bahan sitoplasma yang turut diwarnakan bersama kromosom. Pengasingan bahan sitoplasma akan menjadikan imej yang lebih jelas.



Gambarajah 5. Pewarnaan Giemsa yang pekat



Gambarajah 6. Pewarnaan Giemsa yang pudar

Gambarajah 5 menunjukkan imej kromosom yang diwarnakan dengan pewarnaan Giemsa pada kepekatan yang tinggi. Imej yang terbentuk memberikan kontras warna yang tinggi antara sel dan latar belakang. Gambarajah 6 menunjukkan imej kromosom yang dihasilkan lebih jelas apabila air suling digunakan untuk membilas slaid selepas proses pewarnaan. Walaupun imej kromosom agak pudar namun penghasilan imej begini dapat memudahkan proses analisa.

Menurut laporan teknikal IAEA No. 405, sampel perlu dirawat secara hipotonik selama 15-20 minit. Walau bagaimana pun, tempoh masa tersebut didapati tidak mencukupi untuk memecahkan membran sel sepenuhnya. Larutan supernatan berwarna merah cair menunjukan tidak banyak sel darah merah yang pecah. Tempoh masa rawatan dipanjangkan sehingga 30 minit. Keputusan menunjukkan tempoh masa 30 min adalah

sangat sesuai. Ini berdasarkan pada warna larutan supernatan yang berwarna merah pekat kerana lebih banyak sel darah merah yang pecah.

Pra-rawatan slaid menggunakan RNase telah disarankan oleh IAEA untuk teknik *FISH*. Analisis kromosom menggunakan teknik *FISH* sangat sensitif pada gangguan yang wujud pada slaid. Oleh itu slaid dan sampel yang diproses perlu bersih supaya dapat mengurangkan isyarat hingat atau "*noise signal*". Langkah ini didapati berkesan untuk analisis menggunakan perisian automatik dan telah meningkatkan kualiti imej yang dihasilkan.

Langkah terakhir yang dilakukan bagi meningkatkan kualiti imej adalah dengan menambah bilangan bilasan slaid selepas pewarnaan Giemsa. Pada peringkat awal bilangan bilasan dilakukan sebanyak 2 atau 3 kali untuk mengekalkan warna ungu pekat pada kromosom. Pada masa ini, bilangan bilasan ditambah melebihi tiga kali sehingga pewarnaan kromosom menjadi ungu pudar.

Analisis menggunakan mikroskop cahaya memerlukan pewarnaan yang lebih gelap. Imej berwarna yang terhasil dipancarkan secara terus dari objektif ke lensa mata "*eyepiece*". Keadaan ini membolehkan sel metafasa mudah untuk dibezakan dengan latarbelakang yang lebih cerah. Berbeza dengan mikroskop automatik, imej tidak dipancar secara langsung. Imej dihantar kepada kamera monokrom dan seterusnya dipancarkan ke *eyepiece* dan skrin komputer. Imej biasanya kelihatan hitam putih dan sukar untuk membezakan antara sel metafasa dengan latarbelakang slaid. Sekiranya sel diwarnakan terlalu pekat, ia menyukarkan personel untuk menganalisis slaid kelak. Selain itu, imej juga dikesan menggunakan objektif rendaman minyak 63x berbanding 100x menggunakan mikroskop cahaya. Ini kerana imej pada objektif 100x adalah lebih besar.

Kebarangkalian imej kromosom tidak dapat dikesan oleh perisian automatik adalah lebih tinggi kerana semasa langkah menitikkan ampai sel ke atas slaid kaca, kemungkinan akan ada kromosom yang terpisah jauh dari kelompok asal sel metafasa. Sekiranya analisa manual dilakukan, personel boleh mencari sendiri kromosom yang mungkin terpisah jauh. Apabila menggunakan mikroskop automatik, sistem hanya diarah untuk menangkap imej tanpa mengambil kira kromosom yang terpisah. Oleh sebab itu, objektif rendaman minyak 63x digunakan untuk memastikan imej cukup besar untuk dianalisis serta memastikan kesemua imej kromosom dapat dikesan dalam satu bidang pandangan mikroskop.

KESIMPULAN

Penukaran kaedah analisa slaid dari manual kepada automatik menimbulkan masalah untuk mendapatkan imej yang baik apabila mempraktikkan prosedur standard sedia ada. Beberapa langkah penambahbaikan telah dilakukan iaitu memanjangkan tempoh rawatan hipotonik, melaksanakan langkah pra-rawatan slaid serta menambahkan bilangan bilasan selepas pewarnaan Giemsa. Penambahbaikan ini telah memberikan hasil yang positif di mana kualiti imej dapat ditingkatkan sekali gus menambahkan bilangan sel metafasa yang dapat dikesan oleh mikroskop automatik.

RUJUKAN

1. Henegariu, O., Heerama, N.A., Wright, L.L., Bray-Ward, P., Ward, D.C. and Vance, G.H. (2001), Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry*. 43:101-109.
2. International Atomic Energy Agency, (2001), *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment A Manual*. Tech. Rep. Series No. 405, Vienna, Austria.
3. Kanda.R. (2000), Improvement of accuracy of chromosome aberration analysis for biological radiation dosimetry. *J.Radiat.Res.*41:1-8.
4. Moroni, M.M., Krasnopolsky, K., Subramanian, U., Martin, P.R., Doherty, K.M. and Prasanna, P.G.S. (2008), Does cell culture type and blood transport temperature affect dicentric yield and radiation dose assessment?. *J. Med. CBR. Def.* Vol.6.