

ارزیابی اختلالات غشایی گلبول قرمز با استفاده از یک متد فلوسیتومتریک در جنوب ایران

• دکتر صدیقه شریف زاده

دانشیار ایمونولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی

sharifsd@sums.ac.ir

• دکتر حبیب الله گل افشان

استادیار هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی

golafshanh@sums.ac.ir

• دکتر مهران کریمی

استاد گروه هماتولوژی اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات خون شناسی

• رضا رنجبران

کارشناس ارشد هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی

• طاهره کلانتری

کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی

• لیلی معزی

کارشناس ارشد هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی

چکیده

زمینه: تشخیص اختلالات غشایی گلبول قرمز بالاخص اسفیروسیتوز ارثی (HS) و اوا لوسیتوز ارثی جنوب شرقی آسیا (SAO) بر اساس تاریخچه کلینیکی، مورفولوژی گلبول قرمز و دیگر تست‌های روتین آزمایشگاهی مانند آزمایش شکندگی اسمزی (OFT) می‌باشد. با این وجود، تشخیص این اختلالات در موارد خفیف به آسانی میسر نمی‌باشد. برای اسکرین اختلالات پروتئین‌های غشاء به همراه چند آنمی دیگر از رنگ اتوزین مالیماید (EMA) که به میزان بالایی به پروتئین باند ۳ و در مقادیر کمتر به دیگر پروتئین‌های غشایی متصل می‌شود، استفاده نمودیم.

مواد و روش‌ها: گلبول‌های قرمز افراد سالم و بیماران مبتلا به HS، SAO، الیپتوسیتوز ارثی، آنمی فقر آهن (ID)، تالاسمی مینور و آنمی اتوایمیون همولیتیک با EMA رنگ آمیزی گردیده و سپس با فلوسیتومتری میانگین شدت فلورسانس (MFI) در آنها مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث: گلبول‌های قرمز بیماران HS و آنمی فقر آهن در مقایسه با افراد کنترل کاهش قابل توجه‌ای را در میزان MFI نشان دادند (به ترتیب $p < 0.0001$ و

$p < 0.001$)، در حالی که گلبول‌های قرمز ماکروسیتیک منجر به افزایش مهمی در مقدار MFI شدند ($p < 0.01$). به علاوه، یک همبستگی قابل توجه میان MCV و MFI بیماری‌های مورد مطالعه دیده شد که موارد استثناء آن بیماری‌های HS و تالاسمی مینور بودند. نتایج ما نشان می‌دهد که روش فلوسیتومتری هم یک روش اسکرین و هم یک روش تاییدی قابل اعتماد با حساسیت و اختصاصیت بالاتر (به ترتیب ۹۵٪ و ۹۳٪) از دیگر تست‌های تشخیصی روتین در رابطه با بیماری HS می‌باشد که می‌توانند پیش از انجام تست‌های مولکولی اختصاصی تر در روند تشخیص کمک شایانی را انجام دهند.

لغات کلیدی: گلبول قرمز، اختلالات غشایی، باند ۳، فلوسیتومتری.

مقدمه

سلول‌های قرمز خون (RBC) در حالت طبیعی دیسکی شکل و مقعر الطرفین می‌باشند، که این مورفولوژی RBC توسط پروتئین‌های موجود در اسکلت سلولی ناحیه زیر غشاء حفاظت می‌گردد. این پروتئین‌ها به طور عمده از آلفا اسپکتترین، بتا اسپکتترین، آنکرین، اکترین و باند ۴،۱

و ۴/۲ تشکیل شده‌اند. این شبکه پروتئینی و اتصال آن با لایه لیپیدی غشاء برای حفظ انعطاف پذیری گلبول قرمز و انجام فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن ضروری است [۱]. تعداد زیادی از اختلالات از جمله اسفروسیتوز ارثی (hereditary spherocytosis) و الیپتوسیتوز (elliptocytosis) با کاهش بیان و یا جهش در این پروتئین‌ها ایجاد می‌شود [۲]. نقص ژنتیکی در پروتئین‌های مختلف اسکلت سلولی ممکن است منجر به اختلالاتی از قبیل اسفروسیتوز ارثی (HS)، پیروپویکیلویتوز ارثی (HPP)، الیپتوسیتوز ارثی (HE) و استوماتوسیتوز (stomatocytosis) شود [۳].

در اسفروسیتوز ارثی مورفولوژی گلبول‌های قرمز کروی توپیر یا اسفیرو بوده که آنها را مستعد به همولیز می‌کند. ژن‌های مسئول در بروز بیماری اسفروسیتوز یک یا چند پروتئین از اسکلت سلولی غشای گلبول قرمز را که شامل آنکرین، اسپکتین، پالیدین (پروتئین ۴/۲) و پروتئین باند ۳ (آنیون مبدل ۱) می‌باشد را کدگذاری می‌کنند [۴]. وراثت در بیماری HS در حدود دو سوم از بیماران (نوع معمولی HS) به صورت اتوزومال غالب بوده، که در این حالت جهش در ژن آنکرین شایع‌ترین علت HS است. باقی بیماران HS اتوزومال مغلوب می‌باشند که به علت نقص در یکی از دو پروتئین آلفا اسپکتین یا پروتئین ۴،۲ رخ می‌دهد. مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که برخی از نقایص موجود در پروتئین‌های غشاء به مورفولوژی خاصی از گلبول قرمز (گلبول‌های قرمز قارچی شکل) در بیماران اسفروسیتوز (HS with pincerred RBCs: HSPR) مرتبط است که به طور اختصاصی با نقص در باند ۳ ارتباط دارد [۵].

تظاهرات بالینی بیماری HS معمولاً توسط همولیز همراه با آنمی، افزایش رتیکولوسیت‌ها، اسپلنومگالی، یرقان و یک سابقه خانوادگی مشخص می‌شود. با توجه به یافته‌های آزمایشگاهی، بیماران مبتلا به HS دارای سلول‌های اسفیروسیت مشخص با فقدان رنگ پریدگی مرکزی در لام خون محیطی و افزایش شکنندگی اسمزی گلبول قرمز (OF) می‌باشند. الیپتوسیتوز ارثی با الگوی اتوزومال غالب به ارث برده می‌شود و با حضور گلبول‌های قرمز بیضوی کشیده در لام خون محیطی مشخص می‌گردد [۴، ۶]. با این که الیپتوسیتوز ارثی در تمام مناطق آب و هوایی دیده شده،

شیوع آن در مناطق آفریقایی و مدیترانه‌ای بیشتر گزارش گردیده است، که علت آن نیز به مقاومت این بیماران به مالاریا ارتباط داده شده است [۶]. پیروپویکیلویتوز ارثی عامل کم خونی همولیتیک شدید و نادری است که ارتباط قوی ای با بیماری الیپتوسیتوز ارثی دارد. بیماران مبتلا به پیروپویکیلویتوز ارثی معمولاً در اوایل دوره نوزادی با کم خونی شدید همولیتیک، گلبول‌های قرمز شکسته شده، پویکیلویتوز، الیپتوسیتوز و میکرواسفیروسیتوز در اسمیر خون محیطی مشخص می‌گردند [۷]. یک سوم از افراد فامیل بیماران مبتلا به پیروپویکیلویتوز ارثی، مبتلا به بیماری الیپتوسیتوز ارثی می‌باشند. یک نقص ژنتیکی در پروتئین اسپکتین، در بسیاری از موارد الیپتوسیتوز ارثی و پیروپویکیلویتوز ارثی مشاهده گردیده است [۸]. بیش از ۶۰٪ از موارد الیپتوسیتوز ارثی نتیجه جهش در آلفا اسپکتین می‌باشد، در حالی که ۳۰٪ و ۵٪ از این بیماری به ترتیب به علت جهش در ژن‌های بتا اسپکتین و پروتئین ۴،۱ رخ می‌دهد [۷].

شکنندگی اسمزی در انواع تیپیک الیپتوسیتوز ارثی نرمال و طبیعی است، در حالی که در فرم‌های شدید الیپتوسیتوز و پیروپویکیلویتوز ارثی افزایش می‌یابد [۶].

اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا (SAO) یک واریانت غیرمعمول از الیپتوسیتوز ارثی می‌باشد که در مالزی، فیلیپین و دیگر نقاط جنوب شرق آسیا دیده می‌شود [۹]. الیپتوسیت‌های تخم مرغی شکل یا اوالوسیت‌ها و همچنین حضور استوماتوسیت‌های دارای شکاف طولی در لام خون محیطی این بیماران یافت می‌شود. در این بیماران حذف ژنومی ۲۷ جفت بازی منجر به حذف ۹ اسید آمینه واقع در N-ترمینال دومین سیتوپلاسمی از پروتئین باند ۳ می‌گردد [۱۰، ۱۱].

اختلالات پروتئینی غشای گلبول‌های قرمز خون، به ویژه در بیماری اسفیروسیتوز ارثی، در درجه اول توسط علائم بالینی بیمار، سابقه خانوادگی و بررسی لام خون محیطی همراه با آزمایش‌هایی از قبیل شکنندگی اسمزی و آزمایش لیز گلیسرول اسیدی تشخیص داده می‌شوند. با این حال، این آزمایش‌ها که حساسیت و اختصاصیت کمتری را نشان داده‌اند. البته در مطالعاتی تشخیص این اختلالات غشای سلولی توسط





قرار گرفت.

آنالیز گلبول‌های قرمز با روش فلوسایتومتری

آنالیز گلبول‌های قرمز با روش فلوسایتومتری که توسط کینگ و همکارانش شرح داده شده، مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. به طور خلاصه گلبول‌های قرمز دو بار با محلول فسفات بافر (PBS) شست‌وشو داده شدند. پنج میکرولیتر از گلبول‌های قرمز شسته شده با ۲۵ میکرولیتر از رنگ EMA به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی حاوی رنگ باند نشده جمع‌آوری گردید. گلبول قرمز نشاندار شده ۳ بار با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد آلبومین گاوی (BSA-PBS) شست‌وشو داده شد. گلبول‌های قرمز جمع شده در ته لوله آزمایش مجدداً در ۰/۵ میلی لیتر از محلول BSA-PBS به صورت سوسپانسیون در آمده و در نهایت برای آنالیز این سلول‌ها با فلوسیتومتری ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی در حجم ۱/۴ میلی لیتر از محلول BSA-PBS اضافه گردید. شدت فلورسانس (MFI)، برای ۱۰,۰۰۰ سلول در کانال FL1 از دستگاه فلوسیتومتری FACS کالبر (BD FACS caliber) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و انحراف معیار (SD) با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۱۷/۰ محاسبه شد و میانگین $\pm SD$ با استفاده از آزمون t در طرفه مقایسه شد. ارتباط بین MFI و حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) توسط آزمون همبستگی پیرسون مورد مقایسه قرار گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تشخیص بیماران

با توجه به معیارهای نقص غشاء، نتایج حاصل از بررسی لام خون محیطی در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است.

بررسی گلبول‌های قرمز نشاندار شده با رنگ EMA در

بیماران توسط میزان MFI

نمودارهای هیستوگرام مرتبط با شدت فلورسانس گلبول‌های قرمز نشاندار شده با رنگ EMA در افراد سالم

الکتروفورز با متد سدیم دودسیل سولفات - ژل پلی آکریل آمید ژل الکتروفورسیس (PAGE-SDS) تایید شده است [۱۲]. اخیراً، شدت فلورسانس در گلبول‌های قرمز توسط یک روش فلوسیتومتری با استفاده از رنگ مالیامید (EMA) اندازه‌گیری شده است، که این رنگ به طور اختصاصی، در مقادیر بیشتری به لیزین ۴۳۰ موجود در اولین لوپ خارج سلولی از پروتئین باند ۳ متصل گردیده و در مقادیر کمتری به پروتئین‌های گروه خونی ار-اچ (Rh) و مارکر CD47 در غشاء RBC متصل می‌گردد [۱۳، ۱۴]. هدف از این مطالعه ارزیابی این روش فلوسیتومتری در اسکرین و جداسازی بیماری‌های اختلالات پروتئینی غشاء مانند اسفیروسیتوز ارثی و اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا از دیگر اختلالات خونی سلول‌های قرمز بود.

مواد و روش‌ها

گروه بیمار و کنترل

گروه بیمار شامل ۲۰ فرد مبتلا به HS، ۲ فرد مبتلا به HSPR، ۲۲ فرد مبتلا به HE، ۲ فرد مبتلا به HPP و در ۲ فرد مبتلا به SAO، همراه با ۳۶ فرد مبتلا به دیگر اختلالات گلبول‌های قرمز شامل ماکروسیتوز همراه با کم خونی مگالوبلاستیک (۱۴ مورد)، تالاسمی مینور (۷ مورد)، آنمی شدید فقر آهن با MCV کمتر از ۷۰ (۱۳ مورد) و کم خونی همولیتیک خود ایمن (AIHA) (۲ مورد) بودند. پانزده فرد سالم با اندکس‌های خونی نرمال و مورفولوژی طبیعی گلبول قرمز به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

مشاهدات آزمایشگاهی

شاخص‌های خونی در دستگاه سل کانتر سیستمکس مدل KX-21 اندازه‌گیری شد. مورفولوژی گلبول قرمز در لام خون محیطی رنگ آمیزی شده با رنگ رایت مورد بررسی قرار گرفت. معیارهای تشخیصی در بیماران مبتلا به اسفیروسیتوز ارثی، افزایش در تولید رتیکولوسیت‌ها (رتیکولوسیتوز و پلی کروماتوفیلیا)، افزایش اسفیروسیت‌های تیپیک و فقدان عوامل مرتبط با سیستم ایمنی (تست کومبس منفی) در نظر گرفته شد. نتایج لام خون محیطی و شاخص‌های خونی توسط دو فرد متخصص مورد بررسی



حساسیت و اختصاصیت و میزان پیش بینی شونده از موارد مثبت و منفی در آزمایش MFI، به ترتیب ۹۵٪، ۹۳٪، ۹۵٪ و ۹۳٪ بود. علاوه بر این، نسبت احتمال از موارد مثبت و منفی در آزمایش MFI به ترتیب ۱۴ و ۰/۰۵ نشان داده شد.

بررسی ارتباط MFI و MCV

ارتباط میان MCV و MFI در هر دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. ارتباط معنی داری بین MCV و MFI در هر یک از گروه‌های کنترل، (MCV: 92 ± 4 ; MFI: 337 ± 44 ; $P = 0.045$)، (MCV: 84 ± 7 ; MFI: 335 ± 35 ; $P = 0.039$) HE و ماکروسیتوز (MCV: 113 ± 10 ; MFI: 416 ± 82 ; $P = 0.033$) و کمبود شدید آهن (MCV: 66 ± 5 ; MFI: 280 ± 19 ; $P = 0.028$) مشاهده گردید.

بین MCV و MFI در بیماران HS (MCV: 88 ± 9 ; MFI: 252 ± 57 ; $0.5 < P$) و تالاسمی مینور (MCV: 67 ± 6 ; MFI: 344 ± 35 ; $0.5 < P$) هیچ رابطه معنی داری مشاهده نگردید.

بحث

به طور کلی اختلالات غشای گلبول قرمز بر اساس تاریخچه بالینی بیماری و لام خون محیطی همراه با برخی از آزمایش‌های خونی روتین مانند آزمون شکندگی اسمزی تشخیص داده می‌شوند [۱۵]. با این حال این روش‌ها دارای اختصاصیت و حساسیت دقیق برای تشخیص موارد خفیف یا آتیپیک از اختلالات اسکلتی غشا گلبول قرمز نمی‌باشند. از سوی دیگر، اندازه گیری مقدار پروتئین‌های اسکلت سلولی در غشای گلبول‌های قرمز مشکل می‌باشد، زیرا تغییرات ناچیز این پروتئین‌ها از مقدار نرمالشان بایستی با دقت اندازه گیری شود. در این راستا، برخی از بیماران مبتلا به HS تنها فقط ۱۰ تا ۱۵ درصد کاهش در پروتئین‌های غشاء نشان داده‌اند. برای این منظور، الکتروفورز به روش SDS-PAGE از غشای سلول‌های قرمز در تعداد کمی از آزمایشگاه‌های تخصصی انجام می‌شود. با این حال، این روش الکتروفورز دقت و صحت لازم برای اندازه گیری مقادیر ناچیز کاهش در

و بیماران مبتلا به HS، HSPR، HE، HPP، SAO، ماکروسیتوز، فقر شدید آهن، تالاسمی مینور و AIHA در شکل ۲ نشان داده شده است. شدت فلورسانس به صورت میانگین شدت فلورسانس (MFI) در کانال FL1 مشخص گردید. سلول‌های قرمز نشاندار شده از بیماران HS، HSPR، HPP، SAO و گروه با کمبود شدید آهن نسبت به افراد گروه کنترل شدت فلورسانس کمتری را نشان داد، در حالی که گلبول‌های قرمز نشاندار شده از بیماران دارای ماکروسیتوز نسبت به افراد گروه شاهد شدت فلورسانس بیشتری را نشان داد. بیماران مبتلا به HS، فقر شدید آهن و ماکروسیتوز تفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند (به ترتیب $P > 0.0001$ ، $P > 0.001$ و $P > 0.01$).

اطلاعات داده‌ها در گروه‌های بیمار و گروه کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان MFI گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به HS ($n = 20$) و فقر شدید آهن ($n = 13$) نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی پایین تر بود (به ترتیب 252 ± 57 ، $P = 0.0001$ و 280 ± 19 ، $P = 0.001$) در حالی که نتایج حاصله از MFI بیماران مبتلا به ماکروسیتوز ($n = 14$) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود (416 ± 82 ، $P > 0.01$). میزان MFI گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به HE ($n = 22$) و تالاسمی مینور ($n = 7$) نسبت به افراد نرمال اختلاف قابل توجهی را نشان نداد (به ترتیب 335 ± 35 ، $P > 0.5$ و 344 ± 35 ، $P > 0.5$). با این حال، در بیماران HSPR ($n=2$)، HPP ($n=2$) و SAO ($n=2$) MFI

کمتری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید در حالی که بیماران مبتلا به AIHA ($n=2$) در مقایسه با گروه کنترل هیچ اختلافی را نشان ندادند.

ارزیابی آزمایش MFI

ما برخی از آزمون‌های آماری از قبیل حساسیت و اختصاصیت، میزان پیش بینی شونده (predictivity) موارد مثبت و منفی و نسبت احتمال (likelihood ratio) از موارد مثبت و منفی را برای ارزیابی آزمایش MFI در گروه بیمار HS مورد استفاده قرار دادیم. در بیماران HS،



بیماران مبتلا به HS، منجر به کاهش باند ۳ در اسکلت سلولی غشاء می‌گردد. مهم ترین علت نقص ژنتیکی در بیماران HSPR و SAO نقص در پروتئین باند ۳ می‌باشد. همچنین یک بیان غیر طبیعی از باند ۳ در کم خونی ناشی از فقر آهن دیده شده است که نتایج ما نیز این یافته را تایید می‌کند [۱۸] و [۱۹].

با توجه به اتصال اختصاصی رنگ EMA به پروتئین باند ۳، ما نیز همبستگی بین MCV و MFI را در افراد هر گروه مشخص نمودیم. همبستگی معنی داری بین MCV و MFI در بیماران مبتلا به

HE (MCV: 84 ± 7 ; MFI: 335 ± 35 ; $P = 0.039$)

گلبول های قرمز ماکروسیت

(MCV: 113 ± 10 ; MFI: 416 ± 82 ; $P = 0.033$)

و فقر آهن شدید

(MCV: 66 ± 8 ; MFI: 280 ± 19 ; $P = 0.028$)

و گلبول های قرمز افراد سالم

(MCV: 92 ± 4 ; MFI: 337 ± 44 ; $P = 0.045$)

مشاهده گردید. بین MCV و MFI بیماران مبتلا به

HS (MCV: $78/5 \pm 9/5$; MFI: 250 ± 58 ; $P < 0.5$)

و تالاسمی مینور

(MCV: 67 ± 6 ; MFI: 344 ± 35 ; $P < 0.5$)

همبستگی معنی داری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که یک ارتباط مستقیم بین MCV و MFI (افزایش MCV ممکن است منجر به افزایش MFI گردد و بالعکس) وجود دارد که می‌تواند منجر به یک ارتباط مستقیم بین MCV، سطح RBC و میزان بیان باند ۳ گردد. بنابراین، بنا به ارتباط مذکور، ارتباط مستقیمی بین MCV و MFI در بیماران HS و تالاسمی مینور دیده نمی‌شود.

بنابراین موارد استثنا در این یافته، بیماران مبتلا به HS و کم خونی تالاسمی مینور بودند. اگر چه سلول های اسفیروسیت در لام خونی کوچک تر از سلول های قرمز فرد نرمال به نظر می‌رسند (به دلیل این که قطر سلول های اسفیروسیت و نه حجم آنها را می‌توان در یک اسمیر خون محیطی مورد بررسی قرار داد)، حجم سلول های اسفیروسیت نرمال و طبیعی بوده و با توجه به انعطاف ناپذیری غشای سلولی اسفیروسیت ها، تغییری در MCV مشاهده نمی‌شود.

پروتئین های غشاء که در موارد خفیف بیماری دیده می‌شود را ندارد [۱۶].

بسیاری از بیماران مبتلا به HS تنها ۱۰٪ تا ۱۵٪ و یا حتی درصد پایین تری از سلول های اسفیروسیت را نشان می‌دهند که ممکن است منجر به تشخیص ضعیف با PAGE-SDS گردد، که این امر در نتیجه کاهش ناچیز از پروتئین های غشاء رخ می‌دهد. این موضوع انگیزه ای برای پیدا کردن یک روش ساده مانند فلوسیتومتری با استفاده از رنگ EMA در تشخیص اختلالات غشا گردید. مدت زمان انجام این آزمایش تنها حدود ۲ ساعت طول می‌کشد و دارای حساسیت و اختصاصیت بالاتری از روش های معمول در اسکرین بیماران مبتلا به HS، از قبیل شکنندگی اسمزی، می‌باشد.

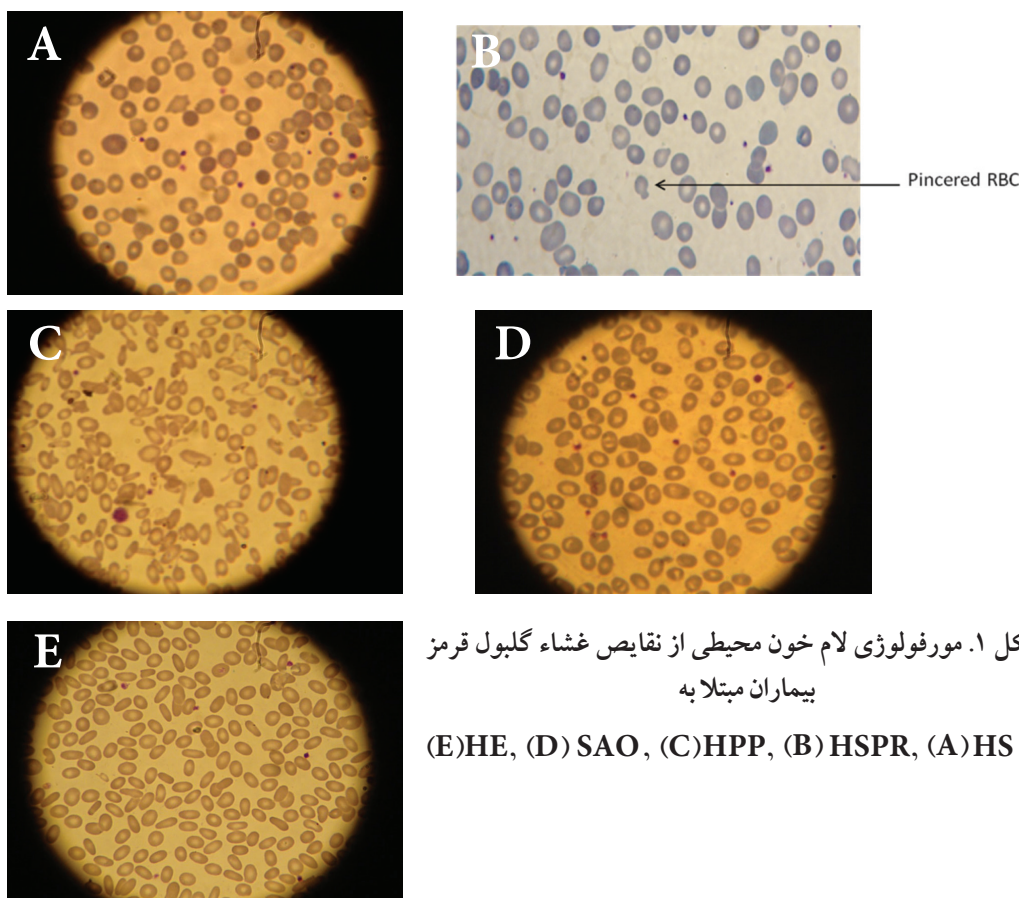
نتایج حاصل از فلوسیتومتری گلبول قرمز نشاندار شده از بیماران HSPR، SAO، HPP و HS و کمبود شدید آهن MFI کمتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد، که تنها در گروه HS و بیماران مبتلا به کمبود شدید آهن معنی دار بود (به ترتیب $P > 0.0001$ و $P > 0.001$). با توجه به MFI، گلبول های قرمز نشاندار شده از بیماران مبتلا به HE، تالاسمی مینور و AIHA تفاوت معنی داری را با گروه شاهد نشان نداد. از سوی دیگر، بیماران با گلبول های قرمز ماکروسیت، به طور قابل توجهی MFI بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P > 0.01$). علت احتمالی نتایج آماری غیر معنی دار در بیماران مبتلا به HSPR (که MFI آنها حتی کمتر از بیماران مبتلا به HS بوده است)، SAO و HPP در تعداد کم این بیماران (در هر گروه ۲ بیمار) در مقایسه با HS (۲۰ بیمار) می‌باشد. گلبول قرمز نشاندار شده از بیماران مبتلا به HPP یک الگوی منحصر به فرد از MFI (هیستوگرام دو قله ای) را نشان داد (شکل ۲-E). مقادیر MFI سلول های قرمز بیماران مبتلا به HE مشابه میزان MFI گلبول های قرمز افراد کنترل بود. نتایج ما در تایید مطالعات گذشته [۱۳] نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان MFI سلول های قرمز در بین دو گروه HE و کنترل وجود ندارد.

در بیماران مبتلا به HS، شایع ترین نقص در پروتئین های غشا گلبول های قرمز، فقدان آنکرین می‌باشد که منجر به جدا شدن باند ۳ از پروتئین آنکرین (در محل های اتصال با افینیتی کم) می‌گردد [۱۷]. این افزایش باند ۳ جدا شده از غشا در

انجام گرفت، حساسیت آزمایش به ۹۹ درصد رسید [۲۰]. در این مطالعه تاکید ما بر تاریخچه بیماری و تغییرات مورفولوژیکی گزارش شده در لام خون محیطی می تواند اطلاعات مفیدی در مورد نقص غشاء RBC در اختیار ما قرار دهد (شکل ۱). همه بیماران مشکوک به HS که در لام خون محیطی آنها سلول اسفروسیت گزارش گردیده است، در میزان MFI کاهش قابل توجهی را نشان دادند. در کل به نظر می رسد که روش مبتنی بر رنگ فلورسانس، یک روش تشخیصی قابل اعتماد می باشد که دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی (به ترتیب ۹۵٪ و ۹۳٪) نسبت به تست های روتین و مرسوم در تشخیص بیماران مبتلا به HS می باشد. ما پیشنهاد می کنیم که این روش فلوسیتومتری مبتنی بر رنگ فلورسانس، قبل از انجام آزمایش های مولکولی و اختصاصی غشاء پروتئین، هم به عنوان یک تست غربالگری سریع و هم به عنوان یک تست تاییدی در تشخیص بیماران مبتلا به HS، HSPR، SAO و HPP کمک خواهد نمود.

علاوه بر این در اکثر موارد، اسفروسیت ها دارای حجم نرمال بوده و MCV را تغییر نمی دهند، در حالی که تنها در موارد نادری از HS، MCV پایین مشاهده گردیده است، که این نیز به علت تولید میکرواسفروسیت هایی است که همراه با کاهش در حجم سلولی می باشند. بنابراین در اسفروسیتوز نقص در غشاء RBC و در نتیجه کاهش MFI نمی تواند توسط MCV تحت تاثیر قرار داده شود. از سوی دیگر علی رغم MCV پایین در تالاسمی مینور که به دلیل کاهش میزان هموگلوبین داخل سلولی می باشد، هیچ تغییری در MFI دیده نمی شود. بنابراین به میزان طبیعی MFI در بیماران مبتلا به تالاسمی مینور می تواند به دلیل عدم وجود نقص در بیان بند ۳ باشد.

برخی از مطالعات گذشته برای تشخیص HS، درجات متفاوتی از حساسیت آزمایش شکنندگی اسمزی (OFT) (محدوده ۴۸٪ تا ۹۵٪) را، مستقل از اختلالات پروتئین های غشا گزارش کرده اند [۲۰]. با این حال زمانی که OFT همراه با آزمایش لیز گلیسرول اسیدی بر روی خون انکوبه شده



شکل ۱. مورفولوژی لام خون محیطی از نقایص غشاء گلبول قرمز بیماران مبتلا به

(E)HE, (D) SAO, (C)HPP, (B) HSPR, (A)HS



تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز (گزارش شماره ۹۰-۵۶۹۷) انجام شده است.

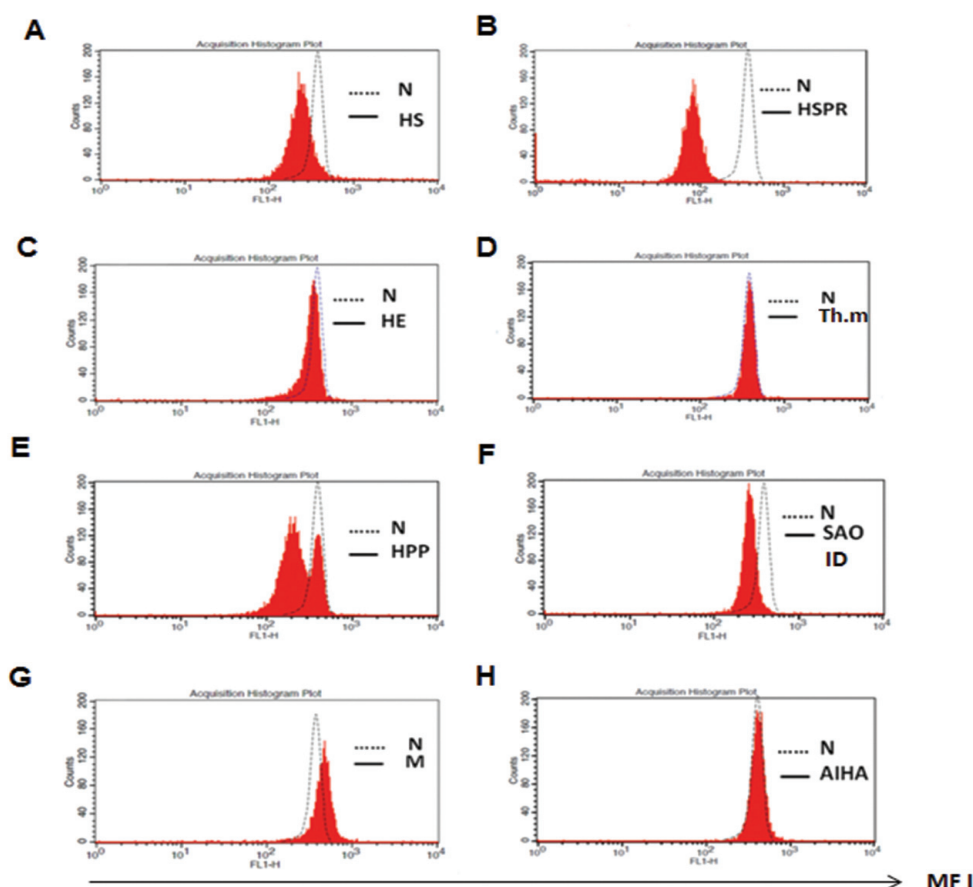
HS (A) و HSPR (B): در لام خون محیطی بیماران مبتلا به HS اسفروسیتوز، آنیزوسیتوز و پلی کرومیشیا (افزایش رتیکولوسیت ها) مشاهده می گردد. سلول های اسفروسیت که سلول های قرمز کوچک و متراکم که فاقد هاله مرکزی می باشند، با توجه به از دست دادن غشاء RBC به وجود می آیند.

HPP (C): سلول های قرمز در بیماران مبتلا به پیروپوکیلویتوز ارثی، دارای اشکال عجیب و غریب،

آنیزوسیتوز، قطعات شکسته شده، میکروپوکیلویتوز، میکرواسفروسیتوز و سلول های قرمز در حال جوانه زدن می باشند.

SAO (D): سلول های قرمز در اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا اغلب به عنوان الیتوسیت های استوماتوسیتی، شرح داده می شوند. سلول های قرمز به جای بودن دیسکی شکل بودن، دارای یک شکاف طویل در ناحیه هاله مرکزی می باشند. بخش کوچکی از سلول های استوماتوسیت دارای دو شکاف عرضی می باشند، که ظاهری شبیه به سلول های استوماتوسیت دوپل را ایجاد می کند.

HE (E): گستره محیطی بیماری با الیتویستوز ارثی را نشان می دهد که دارای گلبول های قرمز بیضی شکل به



شکل ۲. نمایش هیستوگرام های مرتبط با شدت فلورسانس گلبول های قرمز نشاندار شده با رنگ EMA در افراد سالم و بیماران مبتلا (A) HS، (B) HSPR، (C) HE، (D) Th.m، (E) HPP، (F) ID و فقر شدید آهن (G) AIHA و (H) AIHA

سلول‌های قرمز خون با رنگ EMA رنگ آمیزی گردیده و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری میانگین شدت فلورسانس حاصله، تحت عنوان MFI اندازه گیری شد. اختصارات: N: گروه کنترل سالم، Th.m: تالاسمی مینور، M: ماکروسیتوز، AIHA: کم خونی همولیتیک اتوایمیون.

جای گلبول‌های قرمز مقعر الطرفین دیسکی شکل است. اختصارات: HS: اسفروسیتوز ارثی، HSPR: اسفروسیتوز ارثی به همراه گلبول‌های قرمز فارچی شکل، HPP: پیروپویکیلوسیتوز ارثی، SAO: اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا و HE: الپتوسیتوز ارثی.

جدول ۱. آنالیز گلبول قرمز نشاندار شده با رنگ اتوزین-۵ - مالیماید (EMA) توسط فلوسایتومتری در اختلالات متنوع هماتولوژیک و بررسی ارتباط بین MFI با MCV در این بیماران

گروه‌های بیمار و کنترل	تعداد (NO)	MFI (mean± SD)	مقایسه MFI دو گروه بیمار و کنترل (p-value)	MCV (fl) (mean± SD)	میزان همبستگی بین MFI و MCV (p-value)
گروه کنترل سالم	15	337 ± 44		92 ± 4.3	*0.045
اسفروسیتوز ارثی	20	252 ± 57	**<0.0001	88 ± 9.5	>0.5
اسفروسیتوز ارثی به همراه گلبول قرمز فارچی شکل	2	199 & 80		86 & 89	
الپتوسیتوز ارثی	22	335 ± 35	>0.5	84 ± 7.5	*0.039
پیروپویکیلوژ ارثی	2	271 & 260		54 & 57	
اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا	2	279 & 274		94 & 101	
آنمی همولیتیک اتوایمیون	2	419 & 332		105 & 106	
ماکروسیتوز	14	416 ± 82	**<0.01	113 ± 10	*0.033
آنمی فقر آهن	13	280 ± 19	**<0.001	66 ± 5.8	*0.028
تالاسمی مینور	7	344 ± 35	>0.5	67 ± 6.6	0.5

*: $P > 0.05$ **: $P > 0.01$. گروه‌های کوچک دو نفره توسط MFI و MCV هر یک از دو فرد بیمار نشان داده شده است.

References

- 1- Zeman, K., H. Engelhard, and E. Sackmann, Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effects of cell shape and membrane organization. *Eur Biophys J*, 1990. 18(4): p. 203-19.
- 2- Palek, J., Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Rev*, 1987. 1(3): p. 147-68.
- 3- Cynober, T., N. Mohandas, and G. Tchernia, Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. *J Lab Clin Med*, 1996. 128(3): p. 259-69.
- 4- Gallagher, P.G., Update on the clinical spectrum and genetics of red blood cell membrane disorders. *Curr Hematol Rep*, 2004. 3(2): p. 85-91.
- 5- Gallagher, P.G., Red cell membrane disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 13-8.
- 6- Gallagher, P.G., Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol*, 2004. 41(2): p. 142-64.
- 7- Bain, B., Red cell membrane disorders. *A Practical Guide*, ed. I.B. Cells2006: Wiley-Blackwell.
- 8- Zhang, Z., et al., Dynamic molecular modeling of pathogenic mutations in the spectrin self-association domain. *Blood*, 2001. 98(6): p. 1645-53.
- 9- Mohandas, N., et al., Rigid membranes of Malayan ovalocytes: a likely genetic barrier against malaria. *Blood*, 1984. 63(6): p. 1385-92.
- 10- Liu, S.C., et al., Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest*, 1981. 68(3): p. 597-605.
- 11- Schofield, A.E., et al., Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis. *J Mol Biol*, 1992. 223(4): p. 949-58.
- 12- Fairbanks, G., T.L. Steck, and D.F. Wallach, Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 1971. 10(13): p. 2606-17.
- 13- King, M.J., et al., Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, 2000. 111(3): p. 924-33.
- 14- King, M.J., J.S. Smythe, and R. Mushens, Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *British journal of haematology*, 2004. 124(1): p. 106-113.
- 15- Bolton-Maggs, P.H., et al., Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, 2004. 126(4): p. 455-74.
- 16- Eber, S. and S.E. Lux, Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol*, 2004. 41(2): p. 118-41.
- 17- Reinhardt, D., et al., Increase in band 3 density and aggregation in hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis*, 2001. 27(2): p. 399-406.
- 18- Li, J.Y., J.X. Li, and Z.M. Yang, Abnormalities of ion-exchange proteins of the red cell membrane in iron deficiency anemia. *Chin Med J (Engl)*, 1992. 105(2): p. 116-9.
- 19- Huang, Q., et al., Erythroid 5-aminolevulinate synthase mediates the upregulation of membrane band 3 protein expression by iron. *Cell Biochem Funct*, 2010. 28(2): p. 122-5.
- 20- Mariani, M., et al., Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. *haematologica*, 2008. 93(9): p. 1310-1317.