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 شکنندگی 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 ائوزین مالیماید (EMA) که به میزان بالایی به پروتئین باند ۳ و در مقادیر کمتر به دیگر پروتئین‌های غشایی متصل می‌شود، استفاده نمودیم.

مواد و روش ها: 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 اسپکترین، بتا اسپکترین، آنکرین، اکتین و باند ۴،۱

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

و ٤/٢ 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 [١]. تعداد زیادی از اختلالات از جمله اسفروسیتوز ارثی (hereditary spherocytosis) والیپتوسیتوز (elliptocytosis) با کاهش بیان و یا جهش در این پروتئین‌ها ایجاد می‌شود [٢] . نقص ژنتیکی در پروتئین‌های مختلف اسکلت سلولی ممکن است منجر به اختلالاتی از قبیل اسفروسیتوز ارثی (HS)، پیروپویکیلوسیتوز ارثی (HPP)، الیپتوسیتوز ارثی (HE) و استوماتوسیتوز (stomatocytosis) شود[٣].

دراسفروسیتوز ارثی مورفولوژی گلبول‌های قرمز کروی توپر 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، اسپکترین، پالیدین (پروتئین ٤/٢) و پروتئین باند ٣ (آنیون مبدل ١) می‌باشد را کدگذاری می‌کنند [٤]. 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 شایع ترین علت HS است. باقی بیماران HS اتوزومال مغلوب می‌باشند که به علت نقص در یکی از دو پروتئین آلفا اسپکترین یا پروتئین ٤,٢ رخ می‌دهد. مطالعات مولکولی نشان داده اند که برخی از نقایص موجود درپروتئین‌های غشاء به مورفولوژی خاصی از گلبول قرمز (گلبول‌های قرمز قارچی شکل) در بیماران اسفیروسیتوز (HS with pincered RBCs: HSPR) مرتبط است که به طور اختصاصی با نقص در باند ٣ ارتباط دارد [٥].

تظاهرات بالینی بیماری HS معمولا توسط همولیز همراه با آنمی، افزایش رتیکولوسیت ها، 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 [٤، ٦]. 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 [٦]. پیروپویکیلوسیتوز ارثی عامل کم خونی همولیتیک شدید و نادری است که ارتباط قوی ای با بیماری الیپتوسیتوز ارثی دارد. بیماران مبتلا به پیروپویکیلوسیتوز ارثی معمولا در اوایل دوره نوزادی با کم خونی شدید همولیتیک، گلبول‌های قرمز شکسته شده، پویکیلوسیتوز، الیپتوسیتوز و میکرواسفیروسیتوز در اسمیر خون محیطی مشخص می‌گردند [٧]. یک سوم از افراد فامیل بیماران مبتلا به پیروپویکیلوسیتوز ارثی، مبتلا به بیماری الیپتوسیتوز ارثی می‌باشند. یک نقص ژنتیکی در پروتئین اسپکترین، در بسیاری از موارد الیپتوسیتوز ارثی و پیروپویکیلوسیتوز ارثی مشاهده گردیده است [٨]. بیش از ٦٠٪ از موارد الیپتوسیتوز ارثی نتیجه جهش در آلفا اسپکترین می‌باشد، در حالی که ٣٠٪ و ٥٪ از این بیماری به ترتیب به علت جهش در ژن‌های بتا اسپکترین و پروتئین ٤,١ رخ می‌دهد [٧].

شکنندگی اسمزی در انواع تیپیک الیپتوسیتوز ارثی نرمال و طبیعی است، در حالی که در فرم‌های شدید الیپتوسیتوز و پیروپویکیلوسیتوز ارثی افزایش می‌یابد [٦].

اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا (SAO) یک واریانت غیرمعمول از الیپتوسیتوز ارثی می‌باشد که در مالزی، فیلیپین و دیگر نقاط جنوب شرق آسیا دیده می‌شود [٩]. 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 ٢٧ جفت بازی منجر به حذف ٩ اسید آمینه واقع در N-ترمینال دومین سیتوپلاسمی از پروتئین باند ٣ می‌گردد [١٠، ١١].

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

الکتروفورز با متد سدیم دودسیل سولفات –ژل پلی آکریل آمید ژل الکتروفورسیس (PAGE –SDS) تایید شده است [۱۲]. اخیرا، شـدت فلورسـانس در گلبول‌های قرمز توسـط یک روش فلوسـیتومتری با اسـتفاده از رنگ مالیماید (EMA) اندازه گیری شـده اسـت، که این رنگ بـه طور اختصاصی، در مقادیـر بیشـتری به لیزیـن ٤٣٠ موجـود در اولین لوپ خارج سـلولی از پروتئین باند ۳ متصل گردیده و در مقادیر کمتـری به پروتئیـن های گـروه خونـی ار– اچ (Rh) و مارکر CD47 در غشـاء RBC متصل می‌گردد [۱۳، ١٤]. هـدف از این مطالعـه ارزیابی این روش فلوسـیتومتری در اسکرین و جداسازی بیماری‌های اختلالات پروتئینی غشاء مانند اسفیروسـیتوز ارثی و اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا از دیگر اختلالات خونی سلول‌های قرمز بود.

مواد و روش ها

گروه بیمار و کنترل

گـروه بیمار شـامل ۲۰ فرد مبتلا بـه HS، ۲ فرد مبتلا به HSPR، ۲۲ فـرد مبتـلا بـه HE، ۲ فرد مبتـلا به HPP و در ۲ فـرد مبتلا بـه SAO، همراه با ۳٦ فـرد مبتلا به دیگر اختلالات گلبول‌های قرمز شـامل ماکروسـیتوز همراه با کم خونی مگالوبلاسـتیک (١٤ مورد)، تالاسمی مینور (۷ مورد)، آنمی شـدید فقر آهن با MCV کمتـر از ۷۰ (۱۳ مورد) و کـم خونی همولیتیک خود ایمن (AIHA) (۲ مورد) بودند. پانزده فرد سـالم با اندکس‌های خونـی نرمال و مورفولوژی طبیعی گلبول قرمز به عنوان گروه شـاهد مورد بررسی قرار گرفت.

مشاهدات آزمایشگاهی

شـاخص‌های خونی در دسـتگاه سـل کانتر سیسـمکس مدل KX-21 اندازه گیری شـد. مورفولـوژی گلبول قرمز در لام خون محیطی رنگ آمیزی شـده بـا رنگ رایت مورد بررسـی قرار گرفت. معیارهای تشـخیصی در بیماران مبتلا به اسفیروسـیتوز ارثـی، افزایش در تولید رتیکولوسـیت‌ها (رتیکولوسیتوز و پلی کروماتوفیلیا)، افزایش اسفیروسیت‌های تیپیـک و فقـدان عوامـل مرتبط با سیسـتم ایمنی (تسـت کومبـس منفی) در نظر گرفته شـد. نتایـج لام خون محیطی و شاخص‌های خونی توسط دو فرد متخصص مورد بررسی 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 جمع آوری گردید. گلبول قرمز نشاندار شده ۳ بـار با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد آلبومین گاوی (PBS-BSA) شست‌وشـو داده شد. گلبول‌های قرمزجمع شـده در تـه لولـه آزمایـش مجـددا در ۰/۵ میلـی 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 ۱/٤ میلی لیتر از محلول BSA-PBS اضافـه گردید. شـدت فلورسـانس (MFI)، برای ۱۰،۰۰۰ سلول در کانال FL1 از دستگاه فلوسیتومتری FACS کالیبر (BD FACS caliber) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

میانگین و انحراف معیار (SD) با استفاده از برنامه SPSS نسـخه ۱۷/۰ محاسـبه شـد و میانگین ± SD با استفاده از آزمون t دو طرفه مقایسـه شـد. ارتباط بیـن MFI و حجم متوسـط گلبول قرمز (MCV) توسـط آزمون همبسـتگی 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 غشـاء، 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

نمودارهـای هیسـتوگرام مرتبـط با شـدت فلورسـانس گلبول‌های قرمز نشـاندار شده با رنگ EMA در افراد سالم

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

و بیمـاران مبتـلا بـه HS، HSPR، HE، HPP، SAO، ماکروسیتوز، فقر شـدید آهن، تالاسمی مینور و AIHA در شکل ۲ نشـان 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 شـدید آهن نسـبت به افراد گروه کنترل شـدت 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. بیمـاران مبتلا به HS، فقر شـدید آهن و ماکروسـیتوز تفـاوت معنـی داری را نسـبت به گروه کنترل نشـان دادند (به ترتیب $p < 0.0001$ و $p < 0.001$ 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 = ۲۰) و فقر شـدید آهن (n= ۱۳) نسـبت بـه گروه کنترل به طور قابل توجهی پایین تر بود (به ترتیب ۲۵۲ ± ۵۷، $P = 0.0001$ و ۲۸۰ ± ۱۹، $P = 0.001$) در حالی که نتایج حاصله از MFI بیماران مبتلا به ماکروسیتوز (n = ۱٤) بـه طـور معنـی داری بالاتر از گـروه کنترل بود (٤۱٦ ± ۸۲، $p < 0.01$). میـزان MFI گلبول‌هـای قرمـز بیمـاران مبتلا به HE (n = ۲۲) و تالاسـمی مینور (n= ۷) نسـبت به افراد نرمال اختلاف قابل توجهی را نشان نداد (به ترتیـب ۳۳۵ ± ۳۵، $p > 0.5$ و ۳٤٤ ± ۳۵، $p > 0.5$). بـا این حال، در بیماران

HSPR(n=۲)، HPP (n=۲) و

SAO (n=۲) MFI

کمتری نسـبت به گروه کنترل مشاهده گردید در حالی که بیماران مبتلا به AIHA (n=۲) درمقایسه با گروه کنترل هیچ اختلافی را نشان ندادند.

ارزیابی آزمایش MFI

مـا برخـی از آزمون‌هـای آمـاری از قبیل حساسـیت و اختصاصیـت، میزان پیـش بینی شـونده (predictivity) موارد مثبت و منفی و نسبت احتمال (likelihood ratio) از مـوارد مثبت و منفی را برای ارزیابـی آزمایش MFI در گروه بیمار HS مورد اسـتفاده قـرار دادیم. در بیماران HS، 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، نسـبت احتمال از موارد مثبت و منفـی در آزمایـش MFI به ترتیب ۱٤ و ۰/۰۵ نشـان داده شد.

بررسی ارتباط MFI و MCV

ارتباط میان MCV و MFI در هر دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۱ نشـان داده شده اسـت. ارتباط معنی داری بین MCV و MFI در هر یک از گروه‌های کنترل،

HE(MCV: ۸٤ ± ۷/۵ ، MFI : ۳۳۵ ± ۳۵ و $P= 0.039$)

ماکروسیتوز (MCV: ۱۱۳ ± ۱۰/۲ ، MFI : ٤۱٦ ± ۸۲، $P = 0.033$)

و کمبود شدید آهن (MCV: ٦٦ ± ۵/۸، MFI: ۲۸۰ ± ۱۹، $P= 0.028$)

مشاهده گردید.

بین MCV و MFI در بیماران

HS (MCV: ۸۸ ± ۹/۵ ، MFI : ۲۵۲ ± ۵۷، $p > 0.5$)

و تالاسمی مینور (MCV: ٦۷ ± ٦/٦، MFI: ۳٤٤ ± ۳۵، $p > 0.5$)

هیچ رابطه معنی داری مشاهده نگردید.

بحث

بـه طور کلـی اختلالات غشـای گلبـول قرمز بر اسـاس تاریخچـه بالینی بیماری و لام خـون محیطی همراه با برخی از آزمایش‌های خونی روتین مانند آزمون شـکنندگی اسـمزی تشـخیص داده می‌شوند [۱۵]. با این حال این روش‌ها دارای اختصاصیت و حساسیت دقیق برای تشخیص موارد خفیف یا آتیپیک از اختلالات اسـکلتی غشـا گلبول قرمز نمی‌باشند. از سـوی دیگر، اندازه گیری مقدار پروتئین‌های اسـکلت سلولی در غشای گلبول‌های قرمز مشکل می‌باشد، زیرا تغییرات ناچیز این پروتئین‌ها از مقدار نرمالشـان 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 ایـن منظور، الکتروفورز به روش SDS -PAGE از غشـای سـلول‌های قرمز در تعداد کمی از آزمایشـگاه‌های تخصصی انجام می‌شـود. بـا این حال، ایـن روش الکتروفـورز دقت و صحـت لازم برای انـدازه گیری مقادیر ناچیـز کاهش در

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

پروتئین‌های غشـاء که در موارد خفیف بیماری دیده می‌شـود را ندارد [۱۶].

بسـیاری از بیماران مبتلا به HS تنها ۱۰٪ تا ۱۵٪ و یا حتی درصد پایین تری از سـلول‌های اسفیروسیت را نشان می‌دهند که ممکن اسـت منجر به تشخیص ضعیف باPAGE -SDS گردد، که این امر در نتیجه کاهش ناچیز از پروتئین‌های غشـاء رخ می‌دهـد. ایـن موضوع انگیـزه‌ای برای پیـدا کردن یک روش ساده مانند فلوسـیتومتری با استفاده از رنگ EMA در تشخیص اختلالات غشا گردید. مدت زمان انجام این آزمایش تنهـا حدود ۲ سـاعت طول می‌کشـد و دارای حساسـیت و اختصاصیت بالاتری از روش‌های معمول در اسکرین بیماران مبتلا به HS، از قبیل شکنندگی اسمزی، می‌باشد.

نتایج حاصل از فلوسـیتومتری گلبول قرمز نشـاندار شده از بیمـاران HS، HSPR، SAO، HPP و کمبود شـدید 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 ترتیـب $P<0.0001$ و $P<0.001$). بـا توجه بـه MFI، گلبول‌های قرمز نشاندار شده از بیماران مبتلا به HE، تالاسمی مینور و AIHA تفاوت معنی داری را با گروه شـاهد نشـان نداد. از سـوی دیگر، بیماران با گلبول‌های قرمز ماکروسـیت، به طور قابل توجهی MFI بالاتری را نسـبت به گروه کنترل نشان دادند ($P<0.01$). علت احتمالی نتایج آماری غیر معنی دار در بیمـاران مبتلا به HSPR (که MFI آنها حتی کمتر از بیمـاران مبتلا به HS بوده اسـت)، SAO و HPP در تعداد کم این بیماران (در هر گروه ۲ بیمار) در مقایسـه با HS (۲۰ بیمار) می‌باشـد. گلبول قرمز نشاندار شـده از بیماران مبتلا به HPP یک الگوی منحصر به فرد از MFI (هیستوگرام دو قله ای) را نشـان داد (شـکلE-2). مقادیر MFI سلول‌های قرمز بیماران مبتلا به HE مشـابه میزان MFI گلبول‌های قرمز افراد کنترل بود. نتایج ما در تایید مطالعات گذشته [۱۳] نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان MFI سـلول‌های قرمزدر بین دو گروه HE و کنترل وجود ندارد.

در بیماران مبتلا به HS، شـایع ترین نقص در پروتئین‌های غشـا گلبول‌های قرمز، فقدان آنکرین می‌باشد که منجر به جدا شـدن باند ۳ از پروتئین آنکرین (در محل‌های اتصال با افینیتی کم) می‌گردد [۱۷]. این افزایش باند ۳ جدا شـده از غشـا در بیماران مبتلا به HS، منجر به کاهش باند ۳ در اسکلت سلولی غشـاء می‌گـردد. مهم ترین علـت نقص ژنتیکـی در بیماران HSPR و SAO نقص در پروتئین باند ۳ می‌باشـد. همچنین یک بیان غیر طبیعی از باند ۳ در کم خونی ناشـی از فقر آهن دیده شـده است که نتایج ما نیز این یافته را تایید می‌کند [۱۸و ۱۹].

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

HE (MCV: ۸۴ ± ۷/۷، MFI: ۳۳۵ ± ۳۵، $P = 0.039$)

گلبول های قرمز ماکروسیت

(MCV: ۱۱۳ ± ۱۰/۲، MFI: ۴۱۶ ± ۸۲، $P = 0.033$)

و فقر آهن شدید

(MCV : ۶۶ ± ۵/۸ ، MFI : ۲۸۰ ± ۱۹، $P = 0.028$)

و گلبول های قرمز افراد سالم

(MCV: ۹۲ ± ۴/۴، MFI : ۳۳۷ ± ۴۴، $P = 0.045$)

مشاهده گردید. بین MCV و MFI بیماران مبتلا به

HS (MCV: ۷۸/۵ ± ۹/۵، MFI: ۲۵۰ ± ۵۸، $P>0.5$)

و تالاسمی مینور

(MCV: ۶۷ ± ۶/۶، MFI: ۳۴۴ ± ۳۵، $P>0.5$)

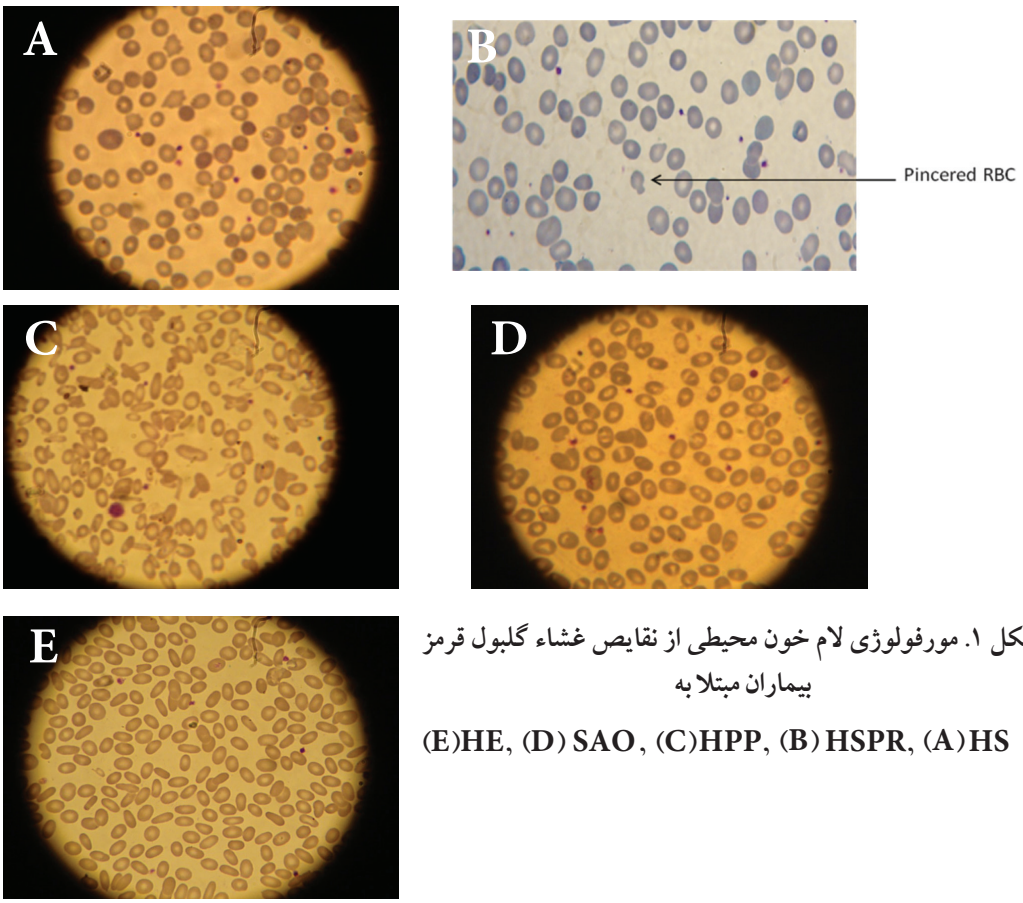
همبسـتگی معنی داری مشاهده نشـد. به نظر می‌رسد که یک ارتباط مسـتقیم بیـن MCV و MFI (افزایش MCV ممکن است منجر به افزایش MFI گردد و بالعکس) وجود دارد که می‌تواند منجر به یک ارتباط مسـتقیم بین MCV، سطح RBC و میزان بیان باند ۳ گردد. بنابراین، بنا به ارتباط مذکور، ارتباط مسـتقیمی بیـن MCV و MFI در بیماران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

بنابراین موارد اسـتثنا در این یافته، بیمـاران مبتلا به HS و کـم خونـی تالاسـمی مینور بودنـد. اگر چه سـلول‌های اسفیروسـیت در لام خونی کوچک تر از سـلول‌های قرمز فرد نرمال به نظر می‌رسـند (به دلیل این که قطر سـلول‌های اسفیروسـیت و نه حجم آنها را می‌توان در یک اسمیر خون محیطی مورد بررسی قرار داد)، حجم سلول‌های اسفیروسیت نرمـال و طبیعی بوده و بـا توجه به انعطاف ناپذیری غشـای سلولی اسفیروسـیت ها، تغییری در MCV مشاهده نمی‌شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

علاوه بر این در اکثر موارد، اسفیروسیت‌ها دارای حجم نرمال بوده و MCV را تغییر نمی‌دهند، در حالی که تنها در موارد نادری از HS، MCV پایین مشاهده گردیده است، که این نیز به علت تولید میکرواسفیروسیت‌هایی است که همراه با کاهش در حجم سلولی می‌باشند. بنابراین در اسفروسیتوز نقص در غشاء RBC و در نتیجه کاهش MFI نمی‌تواند 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 می‌باشد، هیچ تغییری در MFIدیده نمی‌شود. بنابراین به میزان طبیعی MFI در بیماران مبتلا به تالاسمی مینور می‌تواند به دلیل عدم وجود نقص در بیان بند ۳ باشد.

برخی از مطالعات گذشته برای تشخیص HS، درجات متفاوتی ازحساسیت آزمایش شکنندگی اسمزی (OFT) (محدوده ۴۸٪ تا ۹۵٪) را، مستقل از اختلالات پروتئین‌های غشا گزارش کرده اند [۲۰]. با این حال زمانی که OFT همراه با آزمایش لیز گلیسرول اسیدی بر روی خون انکوبه شده 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 می‌تواند 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 اسفیروسیت گزارش گردیده است، درمیزان MFI کاهش قابل توجهی را نشان دادند. در کل به نظر می‌رسد که روش مبتنی بر رنگ فلورسانس، یک روش تشخیصی قابل اعتماد می‌باشد که دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی (به ترتیب ۹۵٪ و ۹۳٪) نسبت به تست‌های روتین و مرسوم در تشخیص بیماران مبتلا به HS می‌باشد. ما پیشنهاد می‌کنیم که این روش فلوسیتومتریک مبتنی بر رنگ فلورسانس، قبل از انجام آزمایش‌های 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، SAO، HSPR و HPP کمک خواهد نمود.



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

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

تشکر و سپاسگزاری

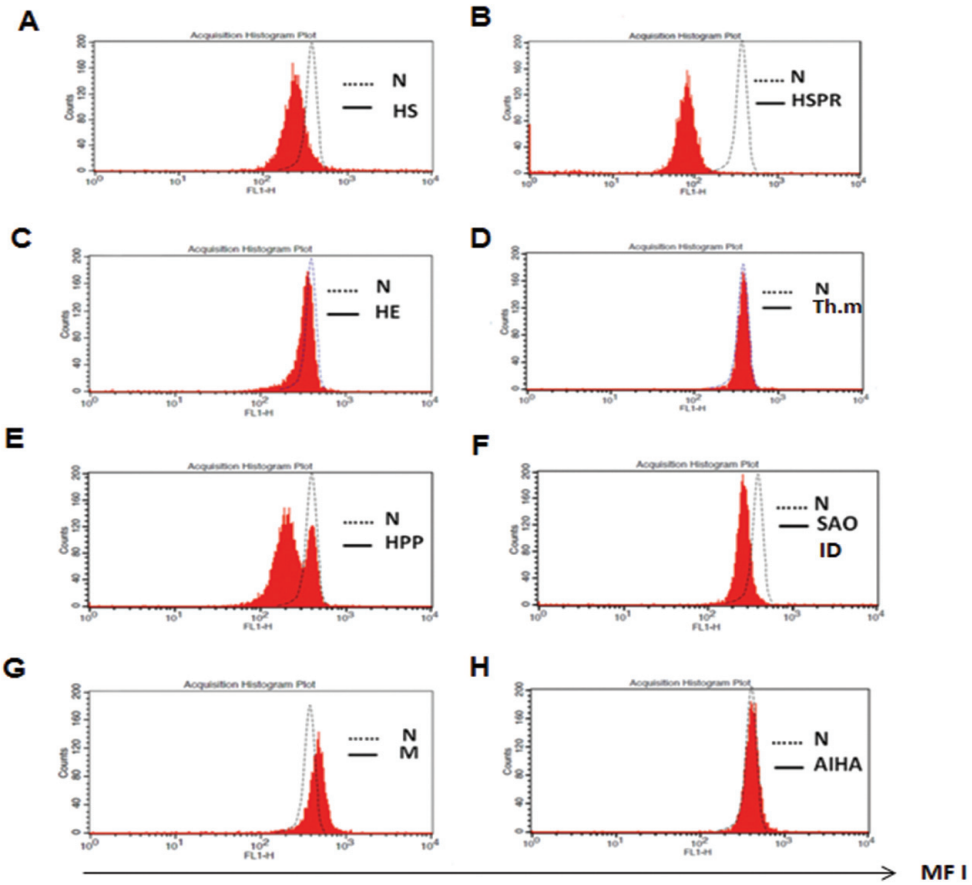
این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز (گرانت شماره ۹۰-۵۶۹۷) انجام شده است.

(A)HS و (B)HSPR: در لام خون محیطی بیماران مبتلا به HS اسفروسیتوز، آنیزوسیتوز و پلی کرومیشیا (افزایش رتیکولوسیت ها) مشاهده می‌گردد. سلول‌های اسفیروسیت که سلول‌های قرمز کوچک و متراکم که فاقد هاله مرکزی می‌باشند، با توجه به از دست دادن غشاء RBC به وجود می‌آیند.

(C)HPP: سلول‌های قرمز در بیماران مبتلا به پیروپویکیلوسیتوز ارثی، دارای اشکال عجیب و غریب، آنیزوسیتوز، قطعات شکسته شده، میکروپویکیلوسیتوز، میکرواسفیروسیتوز و سلول‌های قرمز در حال جوانه زدن می‌باشند.

(D)SAO: سلول‌های قرمزدر اوالوسیتوز جنوب شرقی آسیا اغلب به عنوان الیپتوسیت‌های استوماتوسیتی، شرح داده می‌شوند. سلول‌های قرمز به جای بودن دیسکی شکل بودن، دارای یک شکاف طویل در ناحیه هاله مرکزی می‌باشند. بخش کوچکی از سلول‌های استوماتوسیت دارای دو شکاف عرضی می‌باشند، که ظاهری شبیه به سلول‌های استوماتوسیت دوبل را ایجاد می‌کند.

(E)HE: گستره محیطی بیماری با الیپتویستوز ارثی را نشان می‌دهد که دارای گلبول‌های قرمز بیضی شکل به



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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

جای گلبول‌های قرمز مقعر الطرفین دیسکی شکل است.
اختصارات: HS: اسفروسیتوز ارثی، HSPR: اسفروسیتوز ارثی به همراه گلبول‌های قرمز قارچی شکل، HPP: پیروپویکیلوسیتوزارثی، SAO: اوالوسیتوزجنوب شرقی آسیا و HE: الیپتوسیتوز ارثی.

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.

جدول ۱ . آنالیز گلبول قرمز نشاندار شده با رنگ ائوزین-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 (ρ-value)	MCV(fl) (mean± SD)	میزان‌همبستگی‌بین MCV و MFI (ρ-value)
گروه کنترل سالم	15	337 ± 44		92 ± 4.3	*0.045
اسفیروسیتوز ارثی	20	252 ± 57	**<0.0001	88 ± 9.5	>0.5
اسفیروسیتوز ارثی به همراه گلبول قرمز قارچی شکل	2	199 & 80		86 & 89	
الیپتوسیتوز ارثی	22	335 ± 35	>0.5	84 ± 7.5	*0.039
پیروپویکیلوز 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 بیمارنشان داده شده است.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]

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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-07-04]