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 $\rho<0.0001$ و $\rho<0.001$)، در حالی که گلبول‌های قرمز ماکروسیتیک منجر به افزایش مهمی در مقدار MFI شدند ($\rho<0.01$). 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 2026-06-03]

و ٤/٢ تشـکیل شـده‌اند. این شـبکه پروتئینی و اتصال آن با لایـه لیپیدی غشـاء برای حفـظ انعطاف پذیـری گلبول قرمز و انجـام فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن ضروری اسـت [١]. تعـداد زیـادی از اختلالات از جمله اسفروسـیتوز ارثی (hereditary spherocytosis) والیپتوسیتوز (elliptocytosis) بـا کاهش بیان و یا جهش در این پروتئین‌ها ایجاد می‌شـود [٢] . نقص ژنتیکی در پروتئین‌های مختلف اسکلت سلولی ممکن اسـت منجر به اختلالاتی از قبیل اسفروسـیتوز ارثی (HS)، پیروپویکیلوسـیتوز ارثی (HPP)، الیپتوسیتوز ارثی (HE) و استوماتوسیتوز (stomatocytosis) شود[٣].

دراسفروسـیتوز ارثی مورفولوژی گلبول‌های قرمز کروی توپر یا اسـفیرو بوده که آنها را مسـتعد بـه همولیز می‌کند. ژن‌های مسـئول در بـروز بیماری اسفروسـیتوز یک یا چند پروتئین از اسـکلت سلولی غشـای گلبول قرمز را که شامل آنکرین، اسـپکترین، 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) بـه صـورت اتوزومال غالب بوده، کـه در این حالت جهش در ژن آنکریـن شـایع ترین علت HS اسـت. باقی بیماران HS اتوزومال مغلوب می‌باشـند که بـه علت نقص در یکی از دو پروتئیـن آلفا اسـپکترین یا پروتئیـن ٤,٢ رخ می‌دهد. مطالعات مولکولی نشان داده اند که برخی از نقایص موجود درپروتئین‌های غشـاء به مورفولوژی خاصی از گلبول قرمز (گلبول‌های قرمز قارچی شـکل) در بیماران اسفیروسـیتوز (HS with pincered RBCs: HSPR) مرتبط است که به طور اختصاصی با نقص در باند ٣ ارتباط دارد [٥].

تظاهرات بالینی بیماری HS معمولا توسـط همولیز همراه بـا آنمی، افزایش رتیکولوسـیت ها، اسـپلنومگالی، یرقان و یک سـابقه خانوادگی مشخص می‌شود. با توجه به یافته‌های آزمایشـگاهی، بیمـاران مبتـلا بـه HS دارای سـلول‌های اسفیروسـیت مشخص با فقدان رنگ پریدگی مرکزی در لام خون محیطی و افزایش شکنندگی اسمزی گلبول قرمز(OF) می‌باشـند. الیپتوسیتوز ارثی با الگوی اتوزومال غالب به ارث برده می‌شـود و با حضور گلبول‌های قرمز بیضوی کشـیده در لام خـون محیطی مشـخص می‌گـردد [٤، ٦]. با این که الیپتوسـیتوز ارثـی در تمام مناطق آب و هوایی دیده شـده، شـیوع آن در مناطـق آفریقایی و مدیترانه‌ای بیشـتر گزارش گردیده اسـت، که علـت آن نیز به مقاومت ایـن بیماران به مالاریا ارتباط داده شـده اسـت [٦]. پیروپویکیلوسیتوز ارثی عامل کم خونی همولیتیک شـدید و نادری اسـت که ارتباط قـوی ای با بیماری الیپتوسـیتوز ارثـی دارد. بیماران مبتلا به پیروپویکیلوسـیتوز ارثـی معمولا در اوایـل دوره نوزادی با کم خونی شـدید همولیتیک، گلبول‌های قرمز شکسته شده، پویکیلوسیتوز، الیپتوسـیتوز و میکرواسفیروسیتوز در اسمیر خـون محیطی مشـخص می‌گردند [٧]. یک سـوم از افراد فامیـل بیمـاران مبتلا به پیروپویکیلوسـیتوز ارثـی، مبتلا به بیماری الیپتوسـیتوز ارثی می‌باشـند. یک نقـص ژنتیکی در پروتئین اسپکترین، در بسـیاری از موارد الیپتوسیتوز ارثی و پیروپویکیلوسـیتوز ارثی مشاهده گردیده است [٨]. بیش از ٦٠٪ از موارد الیپتوسیتوز ارثی نتیجه جهش در آلفا اسپکترین می‌باشـد، در حالی که ٣٠٪ و ٥٪ از ایـن بیماری به ترتیب به علت جهش در ژن‌های بتا اسـپکترین و پروتئین ٤,١ رخ می‌دهد [٧].

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

اوالوسـیتوز جنوب شرقی آسـیا (SAO) یک واریانت غیرمعمـول از الیپتوسـیتوز ارثـی می‌باشـد کـه در مالزی، فیلیپین و دیگر نقاط جنوب شـرق آسـیا دیده می‌شود [٩]. الیپتوسـیت‌های تخم مرغی شکل یا اوالوسیت‌ها و همچنین حضور استوماتوسـیت‌های دارای شکاف طولی در لام خون محیطـی این بیماران یافت می‌شـود. در ایـن بیماران حذف ژنومی ٢٧ جفت بازی منجر به حذف ٩ اسـید آمینه واقع در N-ترمینال دومین سیتوپلاسـمی از پروتئین باند ٣ می‌گردد [١٠، ١١].

اختلالات پروتئینی غشـای گلبول‌های قرمز خون، به ویژه در بیماری اسفیروسـیتوز ارثی، در درجه اول توسـط علائم بالینی بیمار، سـابقه خانوادگی و بررسـی لام خون محیطی همراه با آزمایش‌هایی از قبیل شـکنندگی 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 2026-06-03]

الکتروفورز با متد سدیم دودسیل سولفات – ژل پلی آکریل آمید ژل الکتروفورسیس (PAGE -SDS) تایید شده است [۱۲]. اخیرا، شدت فلورسانس در گلبول‌های قرمز توسط یک روش فلوسیتومتری با استفاده از رنگ مالیماید (EMA) اندازه گیری شده است، که این رنگ به طور اختصاصی، در مقادیر بیشتری به لیزین ٤۳۰ موجود در اولین لوپ خارج سلولی از پروتئین باند ۳ متصل گردیده و در مقادیر کمتری به پروتئین های گروه خونی ار- اچ (Rh) و مارکر CD47 در غشاء RBC متصل می‌گردد [۱۳، ١٤]. 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 روش ها

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 ۳٦ فرد مبتلا به دیگر اختلالات گلبول‌های قرمز شامل ماکروسیتوز همراه با کم خونی مگالوبلاستیک (١٤ 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 سیسمکس مدل KX-21 اندازه گیری 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 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 بار با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد آلبومین گاوی (PBS-BSA) شست‌وشو داده شد. گلبول‌های قرمزجمع شده در تله لوله آزمایش مجددا 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 ۱/٤ میلی لیتر از محلول BSA-PBS اضافه گردید. شدت فلورسانس (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 نسخه ۱۷/۰ محاسبه شد و میانگین ± SD با استفاده از آزمون t دو 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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 ($n=20$) و فقر شـدید آهن ($n=13$) نسـبت بـه 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 ($n=14$) بـه طـور معنـی داری بالاتر از گـروه کنترل بود (416 ± 82، $p<0.01$). میـزان MFI گلبول‌هـای قرمـز بیمـاران مبتلا به HE ($n=22$) و تالاسـمی مینور ($n=7$) نسـبت به افراد نرمال اختلاف قابل توجهی را نشان نداد (به ترتیـب 335 ± 35، $p>0.5$ و 344 ± 35، $p>0.5$). بـا این حال، در بیماران

HSPR($n=2$)، HPP ($n=2$) و

MFI ($n=2$) SAO

کمتری نسـبت به گروه کنترل مشاهده گردید در حالی که بیماران مبتلا به AIHA ($n=2$) 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 ۱۴ 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،

(MCV: $92 \pm 4/4$، MFI: 337 ± 44، $P=0.045$)،

HE(MCV : $84 \pm 7/5$، MFI : 335 ± 35 و $P=0.039$)

ماکروسیتوز (MCV: $113 \pm 10/2$، MFI : 416 ± 82، $P=0.033$)

و کمبود شدید آهن (MCV: $66 \pm 5/8$، MFI: 280 ± 19، $P=0.028$)

مشاهده گردید.

بین MCV و MFI در بیماران

HS (MCV: $88 \pm 9/5$، MFI : 252 ± 57، $p>0.5$)

و تالاسمی مینور (MCV: $67 \pm 6/6$، MFI: 344 ± 35، $p>0.5$)

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 2026-06-03]

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 HPP، SAO، HSPR، HS 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، $p>0.5$)

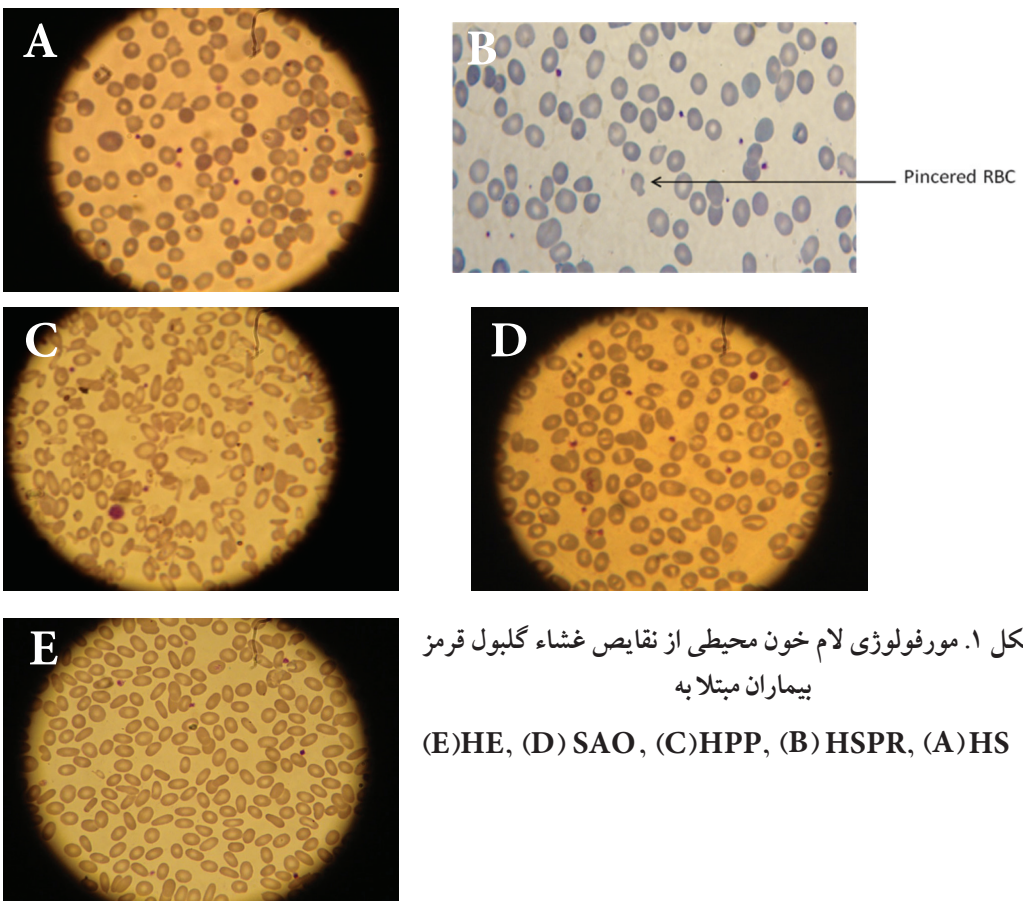
همبسـتگی معنی داری مشاهده نشـد. به نظر می‌رسد که یک ارتباط مسـتقیم بیـن MCV و MFI (افزایش MCV ممکن است منجر به افزایش MFI گردد و بالعکس) وجود دارد که می‌تواند منجر به یک ارتباط مسـتقیم بین MCV، سطح RBC و میزان بیان باند ۳ گردد. بنابراین، بنا به ارتباط مذکور، ارتباط مسـتقیمی بیـن MCV و MFI در بیماران 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 2026-06-03]

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 2026-06-03]

تشکر و سپاسگزاری

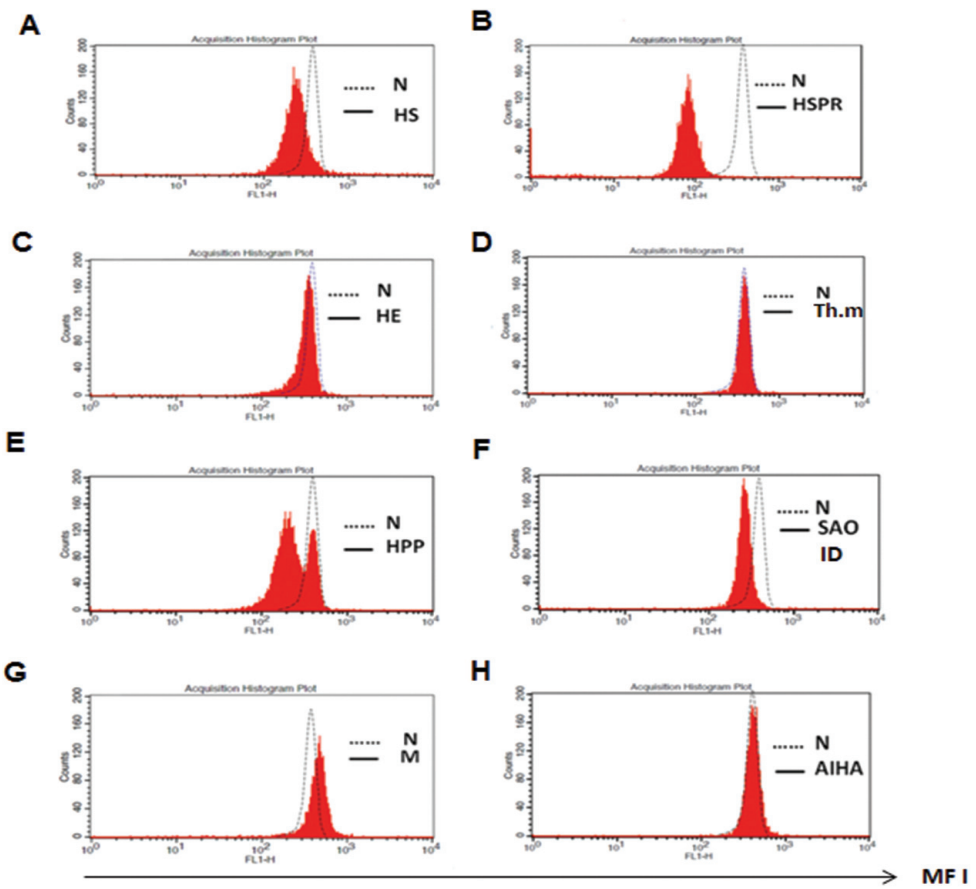
این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز (گرانت شماره ۹۰-۵۶۹۷) انجام شده است.

(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 الیپتوسیتوز 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 2026-06-03]

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 **: 0.01> p. گروه‌های کوچک دو نفره توسط MFI و MCV هر یک از دو فرد بیمارنشان داده شده است.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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 2026-06-03]