بررسی گلیکوپروتئین های سطحی پلاکتی به روش فلوسیتومتری در سندرم برنارد سولیر

کریم شمس اسنجان*

A survey on platelet surface glycoprotiens in patients with Bernard-Souliar syndrome by flowcytometry

K. Shams Asanjan

Abstract

Background: The gold standard diagnosis of the Bernard-Souliar syndrome (BSS), a rare disease, is to prove the absence of Ib/IX surface complex on platelets with the use of aggregometric methods. Flowcytometry is an ideal method in analysis of surface markers on cells.

Objective: The use of flowcytometric analysis in diagnosis of Bernard-Souliar syndrome.

Methods: 15 suspected BSS, 20 healthy persons as control group and 3 ITP patints were selected to be analysed for the presence of GPIbα and GPIIIa on the surface of platelets with the application of FITC conjugated monoclonal antibodies using flowcytometry.

Findings: All healthy persons in control group and 3 ITP patients showed normal expression of both glycoprotiens on platelets using flowcytometry. All 15 suspected BSS patients showed lack of GPIbα but a normal expression of GPIIIa on platelets.

Conclusion: The application of flowcytometry for diagnosis of BSS is a quick, accurate, and precise method, which together with aggregometric method can be used for diagnosis of BSS.

Keywords: Bernard-Souliar Syndrome, Flowcytometry, Glycoprteins, Diagnosis

چکیده

زمینه : سندرم برنارد سولیر بیماری نادری است که کلید تشخیصی آن اثبات عدم حضور کمپلکس غشایی پلاکت Ib/IX با استفاده از روش تجمع سنجی پلاکتی است.

هدف : مطالعه به منظور بررسی امکان استفاده از روش فلوسیتومتری پلاکت ها در تشخیص بیماری برنارد سولیر انجام شد.

مواد و روش ها : در سال ۱۳۷۹ در سازمان انتقال خون ایران ۱۵ بیمار مشکوک به سندرم برنارد سولیر به عنوان گروه مورد و بیست فرد سالم به عنوان گروه شاهد و نیز ۳ بیمار مبتلا به ITP انتخاب شدند. تحلیل های فلوسیتومتریک برای بررسی حضور GPIbα و GPIIIa بر سطح پلاکت ها با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال کونژگه با FITC انجام شد.

یافته ها : با روش فلوسیتومتری در تمام ۱۵ بیمار مشکوک به برنارد سولیر، نقص در عرضه GPIbα و عرضه طبیعی GPIIIa وجود داشت. عرضه این دو گلیکوپروتئین در تمام افراد گروه شاهد و ۳ بیمار مبتلا به ITP طبیعی بود.

نتیجه گیری : فلوسیتومتری روشی سریع، دقیق و مطمئن در تشخیص بیماری سندرم برنارد سولیر است که می تواند در کنار روش اگریگومتری به کار رود.

کلید واژه ها : سندرم برنارد سولیر، فلوسیتومتری، گلیکوپروتئین ها، تشخیص

* مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
آدرس مکاتبه : قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی Email: Sh.Asengan@gmail.com

*** مقدمه :**

ترمبوسیتوپنی از جمله اختلال های شایعی است که همواره به علت‌یابی دقیق و موشکافانه نیاز دارد. اغلب این بیماران به ترمبوسیتوپنی‌های تخریبی همانند پورپورای ترمبوسیتوپنیک اتوایمیون (ITP) مبتلا هستند. علاوه بر این، اختلال های کیفی مادرزادی پلاکت، دسته‌ای دیگر از بیماری ها هستند که معمولاً همراه با ترمبوسیتوپنی دیده می‌شوند. به دلیل اندازه بزرگ پلاکت در این اختلال‌ها، در شمارش خودکار تعداد پلاکت ها به صورت کاذب کاهش یافته گزارش می شود.[۱] حضور پلاکت‌های بسیار بزرگ بایستی توجه پزشکان را به سوی احتمال وجود یک اختلال کیفی مادرزادی پلاکتی جلب کند.[۲] به دلیل تابلوی بالینی و یافته‌های خونی مشابه، تشخیص افتراقی اختلال های کیفی پلاکتی مانند سندرم برنارد سولیر، آنومالی می‌هگلین، ترومبوسیتوپاتی همراه اجسام دهل و سندرم پلاکت خاکستری آلپورت از بیمارهای ترمبوسیتوپنی اکتسابی نظیر ITP دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای است. در این بین بیماری برناردسولیر اختلال نسبتاً نادری است که معمولاً دارای الگوی توارث اتوزومال مغلوب است، هرچند که مواردی از توارث آن به صورت اتوزومال غالب نیز دیده شده است.[۲و۳] اختلال اساسی در این بیماری مربوط به نقص در کمپلکس غشایی گیرنده عامل فون‌ویلبراند درسطح پلاکت‌هاست که در اثر موتاسیون در ژن های اجزای کمپلکس گلیکوپروتئینی Ib IX اتفاق می‌افتد. کلید تشخیص بیماری برنارد سولیر منوط به اثبات نقص توانایی تجمع پلاکت‌های فرد در پاسخ به آنتی‌بیوتیک ریستوستین در دستگاه تجمع‌سنج پلاکتی است که این ناهنجاری با افزودن پلاسمای طبیعی تصحیح نمی‌شود.[۱و۳و۴] در بیماران برنارد سولیر مشکلاتی در استفاده از روش تجمع‌سنجی برای تایید تشخیص بیماری به جهت حجم زیاد نمونه خون مورد نیاز وجود دارد که این مسأله بخصوص در نوزادان و کودکان مشکوک به برناردسولیر همواره مشکل آفرین است.[۲]

در سال ۱۹۸۵ و ۱۹۸۷ به ترتیب گروه ادلمن و آلن میچلسون با استفاده از فلوسیتومتری همزمان دو رنگی و با به کارگیری آنتی‌بادی مونوکلونال علیه گلیکوپروتئین Ib متصل به FITC (Fluorescein Isothiocyanate) و آنتی‌بادی منوکلونال علیه گلیکوپروتئینIIIa متصل به PE (phycoerythrin) توانستند امکان استفاده از فلوسیتومتری برای مطالعه این دو گلیکوپروتئین را بر سطح پلاکت ها نشان دهند.[۵و۶] در سال ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷ گروه تومر و گروه ریچارد کوهن در دو تحقیق مشابه امکان مطالعه گلیکوپروتئین‌های پلاکتی را در بیماران برنارد سولیر سنجیدند.[۲و۷] ویژگی مشترک این مطالعه ها استفاده از فلوسیتومتری همزمان دو رنگی با به کارگیری آنتی‌بادی مونوکلونال علیه گلیکوپروتئین Ib متصل به FITC و آنتی‌بادی منوکلونال علیه گلیکوپروتئینIIIa متصل به PE بود. هردو این گروه‌ها توانستند نقص در عرضه گلیکوپروتئین Ib را در بیماران برنارد سولیر نشان دهند هر چند در تحقیقات هر دو گروه تعداد بیماران مورد مطالعه کم بود.

این مطالعه به منظور بررسی امکان استفاده از فلوسیتومتری در تشخیص بیماری برنارد سولیر با ارزیابی جداگانه گلیکوپروتئین Ib و گلیکوپروتئین IIIa بر سطح پلاکت‌ها بر روی ۱۵ بیمار انجام شد.

*** مواد و روش ها :**

با بررسی سوابق بیماران مراجعه کننده به بخش انعقاد آزمایشگاه سازمان انتقال خون تهران در سال ۱۳۷۹ از بین بیماران با علائم خون ریزی به علت اختلال های کمّی و کیفی پلاکت، ۱۵ بیمار مشکوک به برنارد سولیر انتخاب شدند. ۲۰ فرد سالم که فاقد هرگونه سابقه تمایل به خون ریزی بودند به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند که ۱۲ نفر مذکر و ۸ نفر مؤنث بودند. در ضمن۳ بیمار

مبتلا به ITP نیز به عنوان نمونه برای بررسی انتخاب شدند.

همه بیماران مشکوک به سندرم برنارد سولیر دارای علائم بالینی مشتمل بر اکیموز، پورپورا، خون ریزی از بینی، لثه‌ها و مخاط بودند. افراد گروه شاهد فاقد هرگونه علامت بالینی یا سابقه تمایل به خون ریزی بودند و پلاکت‌های آنها از نظر ریخت‌شناسی و تعداد در محدوده طبیعی بود. آزمون های اگریگومتری بر روی ۱۱ بیمار مشکوک به سندرم برنارد سولیر انجام شده بود، ولی انجام این آزمون‌ها بر روی ۴ نفر به دلیل مسائل تکنیکی میسر نبود. در نهایت برای انجام تحقیق بیماران مشکوک به سندرم برنارد سولیر انتخاب شده فرا خوانده شدند و مطالعه های شمارش پلاکتی و فلوسیتومتری، مشاهده ریخت شناسی پلاکت ها و آزمون‌های اگریگومتریک بر روی پلاکت‌های آنها از نظر میزان عرضه GPIbα (CD42b) و GPIIIa (CD61) انجام شد. افراد گروه شاهد و نیز بیماران مبتلا به ITP نیز مورد بررسی مشابه قرار گرفتند.

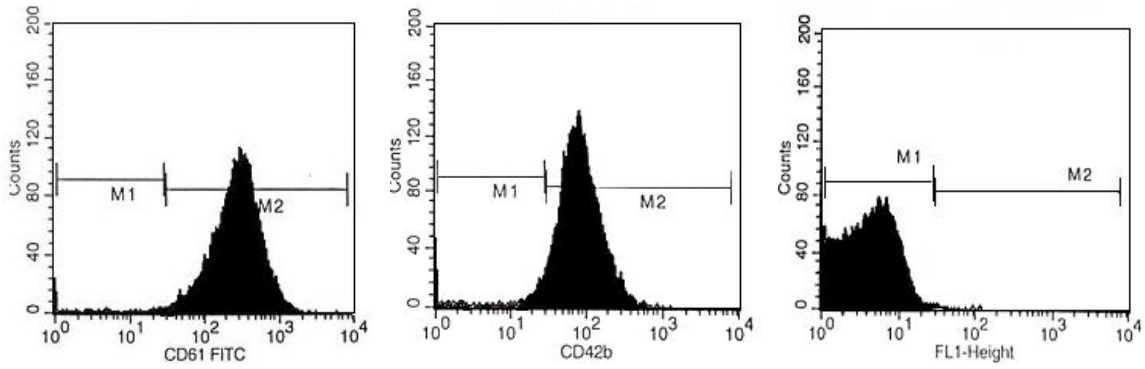
برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) از هر فرد ۵ میلی لیتر خون در ضد انعقاد اسید سیتریک دکستروز (ACD) گرفته شد و حداکثر طی یک ساعت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰g در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و با استفاده از پیپت پاستور پلاسمای غنی از پلاکت جدا و در لوله‌های فالکون ریخته شد. به PRP جدا شده به نسبت ۱به ۱ پارافرمالدئید جهت تثبیت افزوده شد و به مدت نیم ساعت در حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۳ الی۴ میلی‌لیتر بافر تریس با pH ۷/۸ به لوله افزوده و در دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از خاتمه سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد و دوباره عمل شستشو با افزودن ۵ میلی‌لیتر بافر تریس و سانتریفوژ در دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه تکرار شد. بعد از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی حذف و۱ میلی‌لیتر بافر تریس به لوله افزوده شد. سپس لوله توسط ورتکس به منظور معلق شدن پلاکت ها هم زده شد. این سوسپانسیون در عرض چند ساعت جهت جلوگیری از احتمال اختلال در انتشار GPIbα بر سطح پلاکت‌ها مورد ایمونوفنوتایپینگ قرار گرفت.

جهت ایمونوفنوتایپینگ، PRP تهیه شده به خوبی معلق شده و محتوای آن در سه لوله فالکون به اندازه ۷۵× ۱۲۰ میلی متر به ترتیب به عنوان لوله کنترل منفی، لوله مربوط به CD61(gpIIIa) و لوله مربوط به CD42b(gpIb) به طور مساوی تقسیم شد. سه لوله کنترل منفی، CD61 و CD42b به ترتیب با غلظت اشباع کننده‌ای از آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی IgG متصل به FITC، آنتی‌بادی مونوکلونال کونژگه با FITC ساخت شرکت DAKO دانمارک کد F802 از کلون AN51 (آنتی CD61) و آنتی‌بادی مونوکلونال کونژگه با FITC ساخت شرکت DAKO دانمارک کد F803 از کلون Y25 (آنتی CD42b) برای مدت ۲۰ دقیقه در۴ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون به هر لوله ۳ الی ۴ میلی لیتر بافر اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در ۴ درجه سانتریفوژ و سپس محلول رویی حذف شد. بعد از یک بار دیگر تکرار مرحله شستشو با همین شرایط، ۱ میلی‌لیتر بافر تریس به هر لوله افزوده و به خوبی با ورتکس معلق شد. سپس این لوله‌ها با دستگاه فلوسیتومتر FAKSCalibur آنالیز شدند. به منظور فلوسیتومتری، جمعیت پلاکت ها درFSC (Forward Side Scatter) به طور مشترک برای هر سه نمونه انتخاب و میزان فلورسانس برای این جمعیت در پراکنش کناری۹۰ درجهSSC (SidScatter) اندازه‌گیری شد. حداقل تعداد وقوع فلورسانس برای هر نمونه ۵۰۰۰ در نظر گرفته شد که عدم وجود

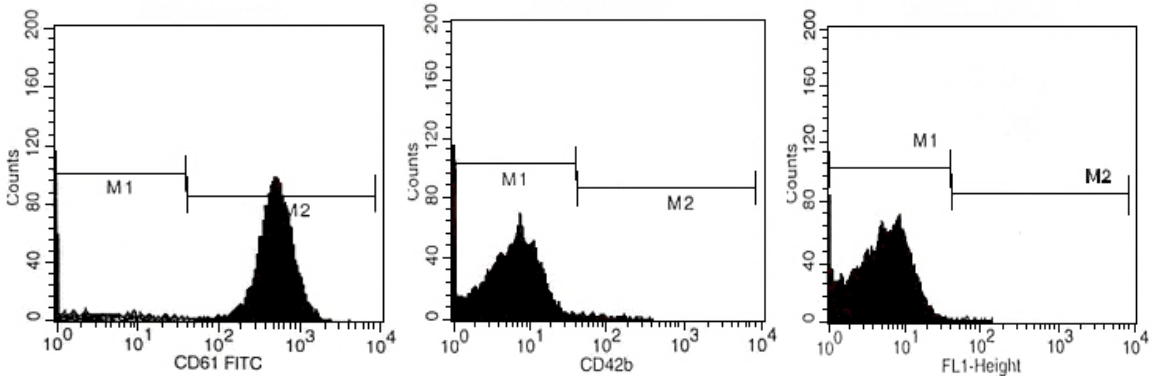
فلورسانس در لوله مربوط به CD42b نشانگر عدم حضور این گلیکوپروتئین بود.

*** یافته‌ها:**

تمام ۱۵ بیمار مشکوک به بیماری برنارد سولیر دارای علائم بالینی مشتمل بر اکیموز، پورپورا، خون‌ریزی از بینی، لثه‌ها و مخاط بودند. میانگین سنی این بیماران در زمان تشخیص۱۴ سال بود. ۸ نفر مذکر و ۷ نفر مؤنث بودند و والدین ۱۳ نفر از این بیماران با یکدیگر رابطه خویشاوندی داشتند. در آنالیزهای فلوسیتومتریک میزان عرضه CD42b و CD61 در افراد گروه شاهد به ترتیب با میانگین۸۵/۵ و ۹۲/۳ درصد طبیعی بود(شکل شماره ۱). در سه بیمار مبتلا به ITP نیز میزان عرضه این دو گلیکوپروتئین طبیعی بود. در ارزیابی بیماران مشکوک به برنارد سولیر نقص در عرضه CD42b با میانگین عرضه۰/۰۵ درصد مشاهده شد. میزان عرضه CD61 در تمام افراد این گروه با میانگین ۸۸/۷۶ طبیعی بود(شکل شماره ۲).



شکل ۱- هیستوگرام میزان فلورسانس جمعیت پلاکت های مجاور شده با آنتی بادی های متصل به FITC در فرد متعلق به گروه شاهد (به ترتیب از چپ به راست پلاکت های انکوبه شده با آنتیIgG متصل به FITC به عنوان کنترل، پلاکت های انکوبه شده با آنتیCD42b متصل به FITC و پلاکت های انکوبه شده با آنتیCD61 متصل به FITC)



شکل ۲- هیستوگرام میزان فلورسانس جمعیت پلاکت های مجاور شده با آنتی بادی های متصل به FITC در بیمار سولیر (به ترتیب از چپ به راست پلاکت های انکوبه شده با آنتیIgG متصل به FITC به عنوان کنترل، پلاکت های انکوبه شده با آنتیCD42b متصل به FITC و پلاکت های انکوبه شده با آنتیCD61 متصل به FITC)

پاسخ آزمون‌های اگریگومتریک در تمام افراد گروه شاهد و بیماران مبتلا به ITP طبیعی بود، اما در ۱۱ بیمار مبتلا به برنارد سولیر که امکان انجام آزمایش های اگریگومتریک میسر شد نقص در تجمع در پاسخ به آنتی بیوتیک ریستوستین مشاهده شد. تجمع پلاکت‌های افراد گروه مورد در پاسخ به سایر محرک‌ها طبیعی بود. در ۴ تن از افراد گروه مورد به دلیل مسائل تکنیکی امکان انجام آزمایش های اگریگومتریک میسر نبود.

در شمارش خونی پلاکت‌های گروه مورد با استفاده از دستگاه شمارشگر خودکار، تعداد پلاکت ها از ۱۳۰۰۰ تا ۸۶۰۰۰ در میکرولیتر متغیر بود که این شمارش‌ها با شمارش دستی مطابقت نداشت. در گسترهٔ خون محیطی تمام این بیماران پلاکت های با اندازه بسیار بزرگ مشاهده شد که ۴۶ تا ۸۳ درصد پلاکت‌ها را تشکیل می‌دادند. حجم متوسط پلاکتی اندازه گیری شده با دستگاه شمارشگر خودکار بین ۸/۶ تا ۱۴/۲ فمتولیتر متغییر بود. در گلبول‌های سرخ و لکوسیت‌های خونی این بیماران هیچ گونه ناهنجاری ریخت شناسی یافت نشد.

* بحث و نتیجه گیری :

در این مطالعه با استفاده از فلوسیتومتری جداگانه با آنتی بادی های مونوکلونال متصل به FITC علیه CD42b و CD61، عدم حضور گلیکوپروتئین Ib و حضور طبیعی گلیکوپروتئین IIIa در بیماران برنارد سولیر نشان داده شد که این یافته ها مؤید نتایج به دست آمده توسط تومر و گروه ریچارد کوهن بود که ارزیابی گلیکوپروتئین های پلاکتی را در بیماران برنارد سولیر با استفاده از فلوسیتومتری همزمان دورنگی انجام داده بودند.[۲و۷]

در گروه شاهد حضور طبیعی این گلیکوپروتئین ها مشاهده شد که این یافته ها با نتایج گروه ادلمن و نیز الن میچلسون که از فلوسیتومتری دورنگی همزمان برای این مطالعه ها استفاده کرده بودند مطابقت داشت.[۵و۶] به نظر می رسد با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از فلوسیتومتری جداگانه گلیکوپروتئین CD42b به تنهایی برای تشخیص بیماری برنارد سولیر امکان پذیر است و به ارزیابی همزمان گلیکوپروتئین ها با روش فلوسیتومتری دورنگی نیازی نیست.

در حال حاضر تشخیص بیماری برنارد سولیر منوط به اثبات ناهنجاری در چسبندگی پلاکتی در پاسخ به آنتی بیوتیک ریستوستین است. برای انجام این آزمون به تهیه PRP با شمارش $۱۰^{۹}\times$ ۲۰۰تا۴۰۰ از نمونه خون بیمار نیاز است و سایر روش های تشخیص بیماری برنارد سولیر نیز مستلزم تهیه PRP با شمارش بالای پلاکتی است.[۸و۹] تهیه PRP در بیماران برنارد سولیر به دلیل ترمبوسیتوپنی و نیز اندازه بزرگ پلاکت ها به مقدار زیادی خون جهت نمونه نیاز دارد و گاهی غیر ممکن است.[۳و۹] در حالی که فلوسیتومتری به دلیل آشکارسازی مستقیم حضور گلیکوپروتئین های سطحی پلاکت، روشی حساس است؛ در مقایسه با روش تجمع سنجی و سایر روش ها به مقادیر کمتری نمونه خون نیاز دارد و زمان لازم برای انجام آزمایش بسیار کوتاه تر است.

در این مطالعه به دلایل فنی در ۴ نفر از بیماران مشکوک به برنارد سولیر امکان تشخیص قطعی بیماری برنارد سولیر با استفاده از روش تجمع سنجی میسر نبود، در حالی که با استفاده از روش فلوسیتومتری ناهنجاری گلیکوپروتئین Ib به وضوح در این گروه اثبات و تشخیص بیماری برنارد سولیر قطعی شد که این مسأله خود مؤید کارایی روش فلوسیتومتری در تشخیص بیماری برنارد سولیر است.

یافته دیگر این مطالعه، عدم همخوانی شمارش خودکار و دستی پلاکت در بیماران برنارد سولیر بود که این یافته نیز با مطالعه های گذشته همخوانی داشت.[۸] دستگاه های شمارشگر خودکار، به علت طراحی خاص، پلاکت های با حجم بیش تر از ۲۰ فمتولیتر را به صورت کاذب به عنوان سلول های سرخ یا سفید گزارش می کنند.[۱۰] لذا به نظر می رسد شمارش دستی پلاکت ها در بیمارانی که در خون آنها پلاکت های با

اندازه بسیار بزرگ وجود دارد روش مطمئن تری نسبت به روش شمارش دستگاهی است.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که به دلیل مزایایی نظیر سرعت، دقت و نیاز به نمونه خون کمتر، روش فلوسیتومتری در تشخیص بیماری برنارد سولیر از کارآمدی بالایی برخوردار است و می توان از اندازه گیری گلیکوپروتئین Ib (CD42b) به روش فلوسیتومتری به تنهایی در حضور نمونه کنترل بیمار برای تشخیص قطعی بیماری برنارد سولیر استفاده کرد. همچنین پیشنهاد می شود امکان استفاده از این روش در سایر بیماری های خون ریزی دهنده با نقص در گلیکوپروتئین های سطحی پلاکت نظیر ترومبستانی گلانزمن مورد مطالعه قرار گیرد.

*** مراجع :**

1. Schultz Beardsly D. Platelet abnormalities in the infancy and childhood. In: Nathan D, Oski F, (eds). Hematology of infancy and childhood. 4th ed, Philadelphia: WB Saunders, 1993, 1561-604

2. Cohn Richard J. Flowcytometric analysis of platelet surface glycoproteins in the diagnosis of Bernard-Souliar syndrome. Ped Hem Oncol 1997; 14: 43-50

3. Lupez Jose A et al. Bernard-Souliar syndrome. Blood 1998; 4397

4. Wright SD et al. Double hetrozygosity for mutations in platelet glycoprotine IX gene in three sibling with Bernard-Souliar syndrome. Blood 1993; 81: 2339

5. Michelson Alan D. Floecytometric analysis of platelet surface glycoproteins. J Lab Cl1987 Jun; 110: 346

6. Adelman B, Michelson AD, Handin RI. Evaluation of platelet glycoprotein Ib by fluorescence flowcytometry. Blood 1985; 66: 423-7

7. Tomer A et al. Bernard-Souliar syndrome: qualitative characterization of megakaryocytes and platelets by flowcytometric and kinetic measurment. Eur Hematol 1994; 52: 193

8. Dacie JV, Lewis SM. Investigation of bleeding tendency, practical hematology. 7th ed, Edinburgh, Churchill Livingston, 1991, 293-318

9. Nichols WL, Kaese SE, Gasineau DA. Bernard Souliar syndrome: whole blood diagnostic assays of platelet. Mayo Clin Proc 1989; 64: 522

10. Gulati GL, Hyan BH. The automated CBC, a current perspective. Hematol Onco Clin North Am 1994; 8: 593-603