گزارش یک مورد نقص کامل آنزیم میلوپراکسیداز نوتروفیل با استفاده از دستگاه هماتولوژی H_1

دکتر اکبر محسنی موحد[1] - علی پاکنژاد

خلاصه:

آنزیم میلوپراکسیداز نوتروفیلها یکی از آنزیمهایی است که در گرانولهای آزوروفیلیک نوتروفیلها وجود دارد. ژن سازنده آن روی کروموزوم شماره ۱۷ قرار دارد و نحوهٔ توارث این نقص آنزیمی به صورت اتوزمال مغلوب است.

نقص آنزیمی مشکل خاصی برای فرد مبتلا بوجود نمی‌آورد تنها بیماران دیابتی با نقص این آنزیم شانس بالاتری برای ابتلاء به کاندیدیازیس شدید دارند، لذا پیشنهاد می‌شود بیماران دیابتی با کاندیدیازیس شدید از نظر نقص این آنزیم مورد بررسی قرار گیرند. در مقاله همچنین نحوهٔ شمارش افتراقی گلبولهای سفید توسط دستگاه هماتولوژی H_1 مورد بررسی قرار گرفته است. نقص آنزیمی فوق در پسربچه‌ای ۹ ساله که به بخش هماتولوژی آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی اراک مراجعه نموده بود با استفاده از دستگاه هماتولوژی H_1 مورد شناسایی قرار گرفت.

مقدمه:

گرانولهای اولیهٔ نوتروفیلها

اولین گرانولهایی که در طی مراحل بلوغ نوتروفیلها در داخل سیتوپلاسم آنها به وجود می‌آید گرانولهای اولیه یا آزوروفیلیک نامیده می‌شوند. در حدود یک سوم از گرانولهای نوتروفیلهای بالغ را گرانولهای آزوروفیلیک تشکیل می‌دهند گرانولهای آزوروفیلیک همانند لیزوزمها دارای آنزیمهای مختلفی هستند که عمل آنها محدود به داخل سلولها است و با اتصال به فاگوزوم آنزیمهای خود را به داخل فاگوزوم رها می‌کنند این آنزیمها در کشتن و از بین بردن میکروارگانیسم‌ها نقش دارند.

آنزیم میلوپراکسیداز نوتروفیل:

این آنزیم در داخل گرانولهای آزوروفیلیک نوتروفیل موجود است ژن آن بر روی کروموزوم شماره ۱۷ قرار دارد و ساختمان یک گلیکو پروتئین اولیه با وزن ملکولی ۸۹ کیلو دالتون راکد می‌کند در مرحله بعد این گلیکوپروتئین شکسته شده و تبدیل به یک زنجیره سنگین با وزن ملکولی ۵۹کیلو دالتون و یک زنجیره سبک با وزن ملکولی ۱۳/۵ کیلو دالتون می‌شود. ساختمان کامل آنزیم دارای دو زنجیره آلفا و دو زنجیره بتا می‌باشد.

۱- دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی

Scanned with CamScanner

از گرانولهای آزوروفیلیک افراد طبیعی علاوه بر زنجیره ۸۹ کیلو دالتونی زنجیره‌های آلفا و بتا بدست می‌آید در صورتی که در افرادی که دچار نقص آنزیم میلوپراکسیدازنوتروفیل هستند گرانولهای آزوروفیلیک نوتروفیل آنها تنها حاوی گلیکو پروتئین ۸۹ کیلو دالتونی می‌باشد و این نشان می‌دهد که مشکل اصلی افراد مبتلا تبدیل گلیکو پروتئین اولیه به زنجیره‌های آلفا و بتا می‌باشد.

نقص آنزیم میلوپراکسیداز:

نقص عمل این آنزیم بصورت اولیه و ثانویه گزارش شده است نوع اولیه آن بصورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسد و شایع‌ترین نقص آنزیمی گرانولهای نوتروفیل می‌باشد که میزان شیوع آن را ۱ در ۴۰۰۰ ذکر می‌کنند. نقص عمل این آنزیم با بیماری شدید همراه نیست و تنها ۶ نفر از افرادیکه تاکنون با نقص این آنزیم شناسایی شده‌اند مبتلا به عفونتهای شدید بوده‌اند که ۴ نفر آنها کاندیدیازیس سیستمیک داشته‌اند و هر چهار نفر مبتلا به دیابت نیز بوده‌اند. این یافته نشان می‌دهد که افراد دیابتی با عفونتهای کاندیدیایی شدید بایستی از نظر نقص آنزیم میلوپراکسیداز اسکرینینگ (غربالگری یا بررسی) شوند. و برعکس در اشخاص مبتلا به نقص آنزیم میلوپراکسیداز که از آنتی بیوتیکهای وسیع‌الطیف استفاده می‌کنند خطر ابتلاء به عفونهای قارچی ثانویه افزایش می‌یابد.

نقص ثانویه این آنزیم در برخی از بیماریهای میلوپرولیفراتیو و مخصوصاً در لوسمی میلوئید حاد (AML) گزارش شده که در طی مراحل لوسمی نقص عمل این آنزیم با افزایش خطر ابتلاء به عفونت همراه است.

روش شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون در دستگاه هماتولوژی H_1:

برای شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون دستگاه H_1 از دو خاصیت سلولها استفاده می‌کند.

الف: رنگ آمیزی سیتوشیمیایی سلولها با استفاده از آنزیم میلوپراکسیداز یا اصطلاحاً کانال پراکسیداز.

ب: تعیین تعداد لوبهای هسته و تراکم کرماتین یا اصطلاحاً کانال بازوفیل لوبولاریتی.

الف) کانال پراکسیداز:

گرانولهای اولیه ردهٔ میلوئید و منوسیت‌ها حاوی آنزیم میلوپراکسیداز هستند ولی مقدار این آنزیم در هر یک از رده‌های سلولی متفاوت است در بین سلولها بیشترین مقدار آنزیم در داخل ائوزینوفیلها وجود دارد و پس از آن نوتروفیلها و بعد منوسیت‌ها قرار می‌گیرند لنفوسیتها و سلولهای اجدادی آنها فاقد این آنزیم هستند.

در دستگاه H_1 یک محلول رنگزا همراه با H_2O_2 بعنوان سوبسترا به گلبولهای سفید اضافه می‌شود و در $37^{\circ}C$ قرار می‌گیرد تا آنزیم پراکسیداز بتواند مادهٔ رنگزا را اکسیده نموده و به یک ماده تیره رنگ تبدیل نماید و سپس گلبولهای سفید از مقابل یک نمایانگر (Detector) عبور داده می‌شوند که براساس اندازه سلولی و میزان رنگ‌پذیری به گروههای مختلف تقسیم می‌گردند. سپس دستگاه سیتوگرام حاصله را رسم می‌کند که هر دسته از نقاط روی سیتوگرام مبین یک دسته از سلولها است که محل قرار گرفتن آنها بر روی سیتوگرام در شکل (۱) مشخص گردیده است.

Scanned with CamScanner

شکل ۱- سیتوگرام حاصل از کانال پراکسیداز
در افراد طبیعی

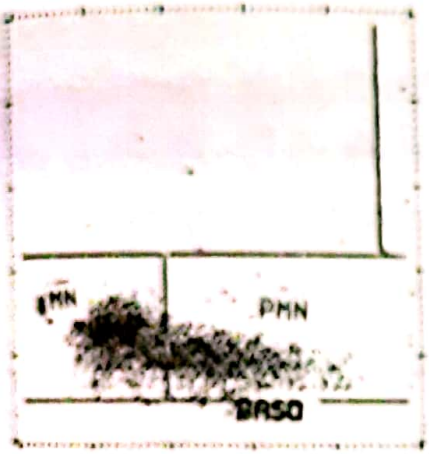
در کانال پراکسیداز میانگین فعالیت پراکسیدازی نوتروفیلها نیز محاسبه و تحت عنوان MPXI گزارش می‌گردد. (MPXI = Mean Peroxidse Index) که مقدار آن در افراد طبیعی بین ۰/۱۰ تا ۱۰- در نوسان است.

ب) کانال بازوفیل لوبیفاریتی:

در این کانال ابتدا گلبولهای سفید در داخل محلول مس‌نکلتات با pH بالا قرار می‌گیرند که در این محلول غشاء سیتوپلاسمی نوتروفیلها، اوزینوفیلها، لنفوسیتها و مونوسیتها جدا شده و از گلبولهای سفید تنها هستهٔ آنها باقی می‌ماند و فقط بازوفیلها هستند که در این محلول غشاء خود را حفظ می‌کنند. سپس هستهٔ سلولها از مقابل نمایانگر (Detector) عبور داده می‌شوند و براساس فشردگی کروماتین و تعداد لوبهای هسته (Lobularity) تقسیم می‌گردند که در شکل ۲ نحوهٔ قرار گرفتن آنها نشان داده شده است همچنین در این کانال بازوفیلها شمارش می‌شوند.

بیمار و یافته‌های خونی در آزمایش CBC

بیمار پسربچه‌ای است ۹ ساله که دارای سه برادر بزرگتر از خود می‌باشد سابقهٔ بیماری خاصی نداشته و تنها به علت درد پهلو به پزشک مراجعه نموده است و پزشک جهت آزمایش‌های CBC و مدفوع از نظر وجود انگل بیمار را به آزمایشگاه معرفی نموده است در آزمایش CBC بیمار تعداد گلبولهای سفید و قرمز و پلاکتها در محدودهٔ مورد انتظار قرار داشت همچنین مقدار هموگلوبین و هماتوکریت همراه با اندکسهای گلبولهای قرمز در حد طبیعی بودند (شکل ۳).



شکل (۲) سیتوگرام حاصل از کانال بازوفیل
در افراد طبیعی

بحث:

در CBC بیمار چهار نکته قابل توجه وجود داشت:

۱- تعداد نوتروفیلها در کانال پراکسیداز ۶ درصد گزارش شده بود و در سیتوگرام رسم شده نیز محل قرار گرفتن نوتروفیلها خالی بود (شکل ۵).

۲- میزان LUC در کانال پراکسیداز افزایش بارزی نشان

MN - هسته‌هایی که به شکل یک توده هستند. (Mono nuclear)

PMN - هسته‌هایی که دارای چند قسمت هستند. (Polymorphonuclear)

Scanned with CamScanner

می‌دهد (شکل ۴).

LUC سلولهای بزرگی هستند که در کانال پراکسیداز رنگ نمی‌گیرند ولی از نظر اندازه بزرگتر از لنفوسیتهای معمولی هستند. (Luc = Large unstained cells)

شکل شماره (۳) شمارش سلولهای خونی بیمار و اندکس‌های گلبولهای قرمز و پلاکتها

SEQ#	0000002 ( )	
TIME	16:19 74/09/21	
SYS#	629	
ID	3481	
	CBC	
6.82	x10³/µL	WBC
4.88	x10⁶/µL	RBC
14.1	g/dL	HGB
40.1	%	HCT
82.0	fL	MCV
29.0	pg	MCH
35.3	g/dL	MCHC
13.5	%	RDW
2.44	g/dL	HDW
215	x10³/µL	PLT
9.3	fL	MPV
44.3	%	PDW
.20	%	PCT
RBC FLAGS		0000

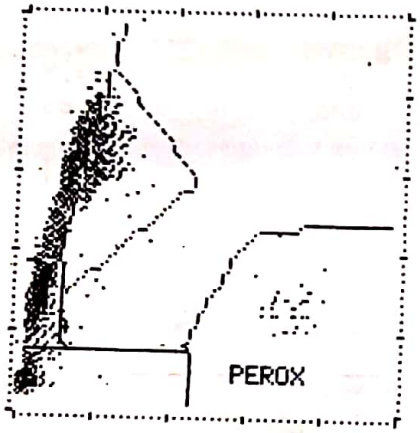
۳- میزان MPXI بسیار پائین و برابر با ۵۸/۶- گزارش شده بود (شکل ۴).

۴- تعداد PMN در کانال بازوفیل لوبولاریتی ۳۴/۷ درصد گزارش شده که تفاوت قابل ملاحظه‌ای با شمارش نوتروفیلها در کانال پراکسیداز دارد (شکل ۵).

باتوجه به نکات بالا از خون محیطی بیمار اسمیر تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی در شمارش افتراقی گلبولهای سفید ۳۸ درصد سلولها را نوتروفیل تشکیل می‌داد که تمامی آنها از نظر شکل کاملاً طبیعی بودند و هیچگونه گرانول غیرطبیعی در آنها مشاهده نشد. باتوجه به این یافته‌ها بر روی اسمیر خون محیطی بیمار رنگ‌آمیزی اختصاصی پراکسیداز انجام شد که این رنگ‌آمیزی نیز فقدان کامل آنزیم میلوپراکسیداز را نشان داد.

باتوجه به فقدان آنزیم میلوپراکسیداز نکاتی در (شکل ۴) سیتوگرام کانال پراکسیداز و شمارش افتراقی گلبولهای سفید بیمار در کانال پراکسیداز

	%	DIFF	x10³/µL
* L	.6*	NEUT L	.04*
H	49.7*	LYMP	3.39*
H	12.6*	MONO	.86*
	1.5*	EOS	.10*
	.4*	BASO	.03*
H	35.2*	LUC H	2.40*
	LI	L	1.80
	MPXI	L	-58.6
WBC FLAGS			1044



گزارش CBC توسط دستگاه H_1 وجود داشت که به نحو زیر قابل توجیه است.

الف) عدم شناسایی نوتروفیل‌ها در گزارش دستگاه H_1 به علت فقدان آنزیم میلوپراکسیداز نوتروفیل است.

ب) نوتروفیل‌هایی که رنگ نشده‌اند به طور کاذب جزو سلولهای LUC قرار گرفته‌اند و درصد آنها افزایش یافته است.

ج) کاهش شدید MPXI با فقدان کامل آنزیم میلوپراکسیداز مطابقت دارد.

Scanned with CamScanner

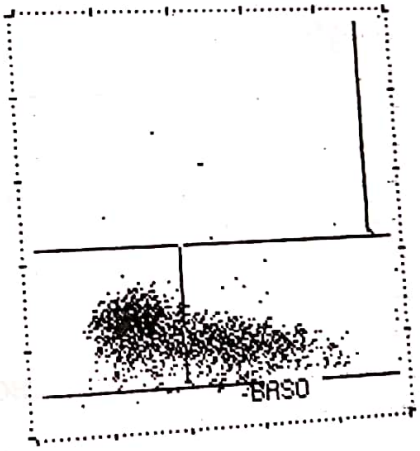
SUMMARY:

Hereditary myeloperoxidase deficiency present in the homazygous form in about 1,9000 individuals. Heterozygotes showing a quantitative decrease in neutrophil MPO concentration are common. Although there is some debate , MPO deficiency does appear , by itself , to predispose to increased infection. However MPO deficient subjects with an underlying chronic disease such as diabetes , have a significant increase in the incidence of candida infections. Acquired myeloperoxidase deficiency which must be distinguished from the hereditary form is associated with leukemias and thrombotic disease. We found this case in 9 years old boy by using H_1 Hematology system.

بمنظور اطمینان از نتایج حاصله CBC بیمار بعد از سه روز مجدداً تکرار شد که نتایج آن با نتایج نوبت اول کاملاً مطابق بود همچنین باتوجه به نحوهٔ توارث این نقص آنزیمی از سه فرزند دیگر خانواده نیز آزمایش CBC توسط دستگاه H_1 بعمل آمد ولی آنها مبتلا به نقص آنزیمی فوق نبودند.

شکل (۵) سیتوگرام کانال بازوفیل لوبولاریتی و درصد تک‌هسته‌ایها در نمونهٔ بیمار

BASO	
WBCB	6.82
VALID CELLS	5488
PHA TOTAL	5437
PHA CELLS	5391
PMNx	22.5
MNx	12.5
MNy	12.5
%OTHER	.1
%BLASTS	1.3
%NOISE	.8
* %PMN	34.7
%MN	64.7
d/D	.68



References:

1- Parry M.F , Root R.K , Metacalf J.A , Delaney K.K.Kaplow "Myeloperoxidase deficiency". Ann.Int.Med , 95 : 293 - 304 (1981)

2- Kitahara M. , Eyre H.J , Simonian X.etal: "Hereditary Myeloperoxidase deficiency" Blood 57:888-893. (1981)

Scanned with CamScanner