

# שיטה חדשה להערכת תהליך ההתחרמשות (Sickling) ופולימריזציה של המוגלובין S בתאים אדומים של חולי אנמיה חרמשית

שרי פרץ<sup>1,3</sup>, לאוניד ליבשיץ<sup>1,4</sup>, מורן קלברט-אברהם<sup>2</sup>, הראל איתם<sup>2</sup>, אריאל קורן<sup>1</sup>, קרינה לוי<sup>1,3</sup>.

1- היחידה להמטולוגיה פדיאטרית ומעבדת המחקר, מרכז רפואי העמק, עפולה, ישראל.  
2- המעבדה להמטולוגיה, מרכז רפואי העמק, עפולה, ישראל.  
3- הפקולטה לרפואה ע"ש רפפורט, הטכניון- מכון טכנולוגי לישראל, חיפה, ישראל.  
4- הקבוצה לחקר תאים אדומים, מכון לפיזיולוגיה וטרינרית, אוניברסיטת ציריך, ציריך, שווייץ.

## הכנס השנתי החמישי לאיכות ומצוינות מקצועית במעבדות המערך הארצי בכללית

### רקע

מחלת האנמיה החרמשית (SCD) הינה מחלה המטולוגית מסכנת חיים, והשכיחה ביותר מבין המחלות המועברת בתורשה. מאפייני המחלה כוללים אנמיה, משברי כאב חדים, דלקת כרונית ומחלות נלוות נוספות ארוכות טווח. הפתופיזיולוגיה של אנמיה חרמשית נובעת בשל מוטציה נקודתית- בקודון מס' 6 בגן לביתא גלובין ושינוי של חומצה אמינית חומצה גלוטמית לחומצה אמינית ולין. מוטציה זו גורמת ליצירת המוגלובין S אשר עובר פולימריזציה בתוך התאים האדומים (RBC) ולתופעת ההתחרמשות (Sickling). שינוי זה פוגע ביכולת הגמישות של התאים האדומים וגורם להרס מוקדם שלהם. סטנדרט הטיפול כולל טיפול סימפטומטי, עירוי דם, מתן Hydroxycarbamide ותרופות חדשות, והשתלת מח עצם כטיפול מרפא. למרות ההתקדמות בטיפול במחלה, נדרשות שיטות חדשות לחקור את השפעות תרופות על Sickle-RBC ובכך לייעל את התגובות של מטופלים לרפואה מותאמת אישית.

### מטרות

1. לחקור את תהליך ההתחרמשות (Sickling) של תאים אדומים בחולי אנמיה חרמשית ולהעריך את תגובת התאים האדומים לתרופות נגד התחרמשות.
2. למצוא שיטה מעבדתית פרקטית שתבחן את תהליך ההתחרמשות בעקבות פולימריזציה של המוגלובין S בתאים אדומים ואת מצב ההידרציה של התאים האדומים.

### תהליך

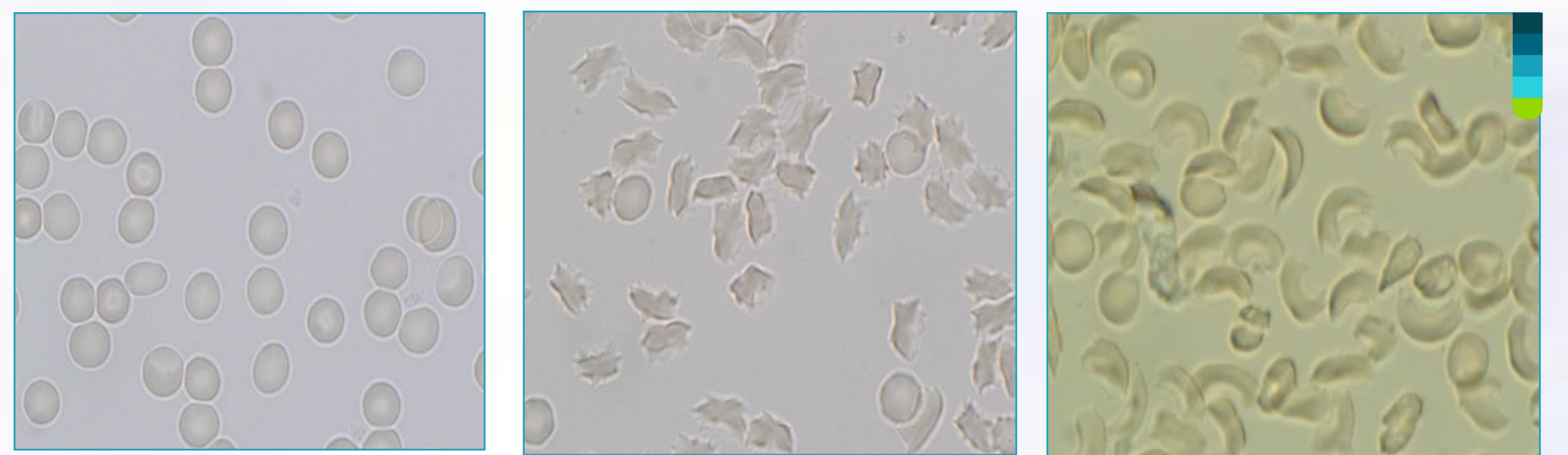
הבדיקה להתחרמשות RBC נערכה באמצעות Flow- Cytometry (FC) (Beckman Coulter, USA) ע"י חישוב חציון FSC ו SSC במקביל למיקרוסקופ אור ומיקרוסקופ אלקטרוני סורק (Cryo-SEM), ובנוסף נבדקו מאפייני התאים האדומים *in vitro* לאחר הדגרה עם התרופה ממנטין (אשר חוסמת תעלות סידן בממברנת התאים האדומים) כתרופה אפשרית נגד התחרמשות. דגימות הדם נלקחו מחולי אנמיה חרמשית המטופלים ביחידה להמטולוגיה פדיאטרית במרכז הרפואי העמק, עפולה. המחקר אושר ע"י ועדת הסיכונים מקומית. נבדקו דגימות דם ממבחנת EDTA של 7 חולי אנמיה חרמשית (SCD), 6 נשאים לאנמיה חרמשית (S-trait) ו 7 אנשים בריאים (Normal). בוצעה ספירת דם, ובדיקת sickling ע"י הדגרה על גבי זכוכית נושאת של דם מלא (10µM) עם החומר Sodium metabisulfite (2%) הגורם לפולימריזציה של Hb.S ביחס של 1:1 כאשר הנוזל כוסה כולו בזכוכית מכסה על מנת למנוע כניסת חמצן. תהליך ההתחרמשות נבדק ע"י לקיחת 1µl של דם לתוך 0.5 מ"ל PBS כל 15 דקות למשך שעתיים באמצעות FC ובמקביל נלקחו תמונות מיקרוסקופ אור. הבדיקה בוצעה גם ל 4 מהדגימות של חולי SCD לאחר אינקובציה ראשונית עם ממנטין (100µM).

### תוצאות

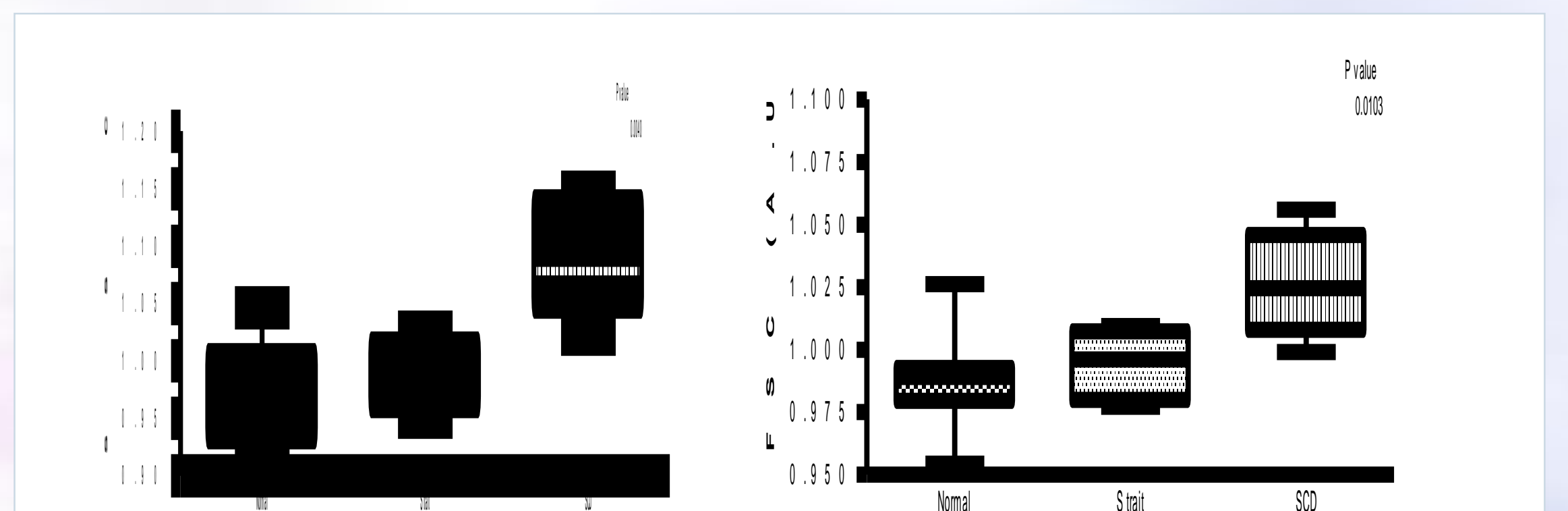
ספירת הדם בקבוצת הבריאים והנשאים הייתה תקינה לעומת חולי SCD (טבלה 1). תגובת sickling של התאים האדומים נצפתה לאורך שעתיים במיקרוסקופ אור (איור 1) וגם ב FC כאשר נצפתה עלייה מובהקת לאחר 120 דקות בדגימות של SCD ב SSC וב FSC (9.2% ו 2.5% בהתאמה) בהשוואה לאותה הדגימה בטיפול של PBS ולעומת זאת לא נצפה עלייה בדגימות Normal ו S- trait (איור 2). תהליך ה sickling צולם גם ב Cryo- SEM (איור 3). בנוסף, הדגרה עם ממנטין גרמה למגמת ירידה ב sickling כפי שנצפה ב FC לאורך 120 דקות (איור 4).

	Normal n=7	S- trait n=6	SCD n=7
RBC (M/µl)	4.42± 0.39	4.62± 0.24	3.22± 0.68
HB (g/dL)	13.07± 1.05	12.72± 1.12	9.7± 1.32
HCT (%)	39.22± 3.65	37.8± 3.09	29.35± 3.03
MCV (fL)	88.75± 5.86	81.76± 5.13	94.05± 17.76
MCH (pg)	29.55± 0.85	27.54± 2.04	31.08± 6.41
RDW (%)	14.71± 2.85	13.56± 0.88	20.88± 4.36
HbS (%)	0	36.36± 3.35	58.77± 9.22

טבלה 1: תוצאות ספירת הדם בקבוצת הבריאים, הנשאים וחולי אנמיה חרמשית.

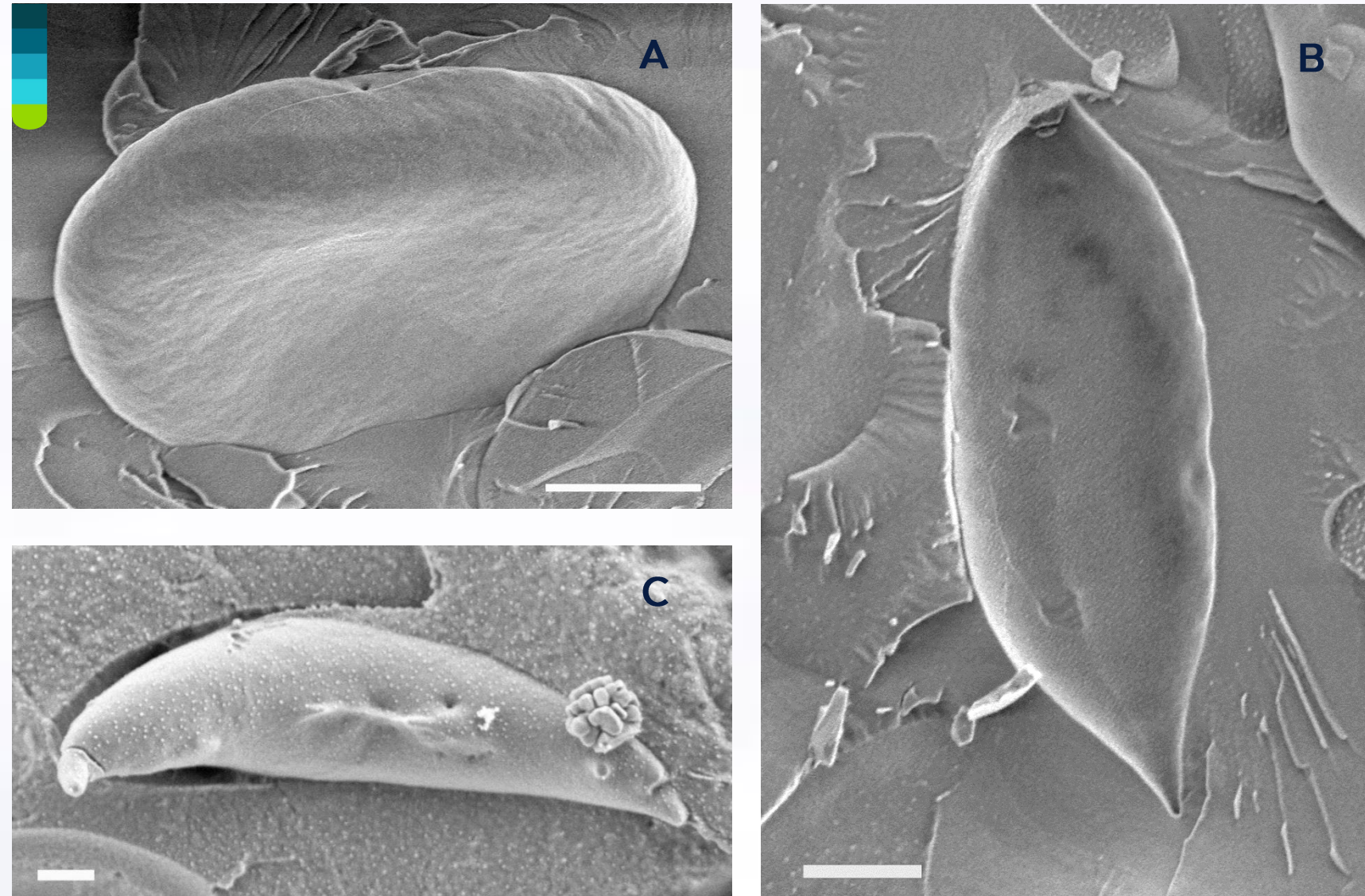


איור 1: תמונות מיקרוסקופ אור (Olympus) של דגימה תקינה, נשא וחולה לאחר אינקובציה של 120 דקות עם Sodium metabisulfite 2%.

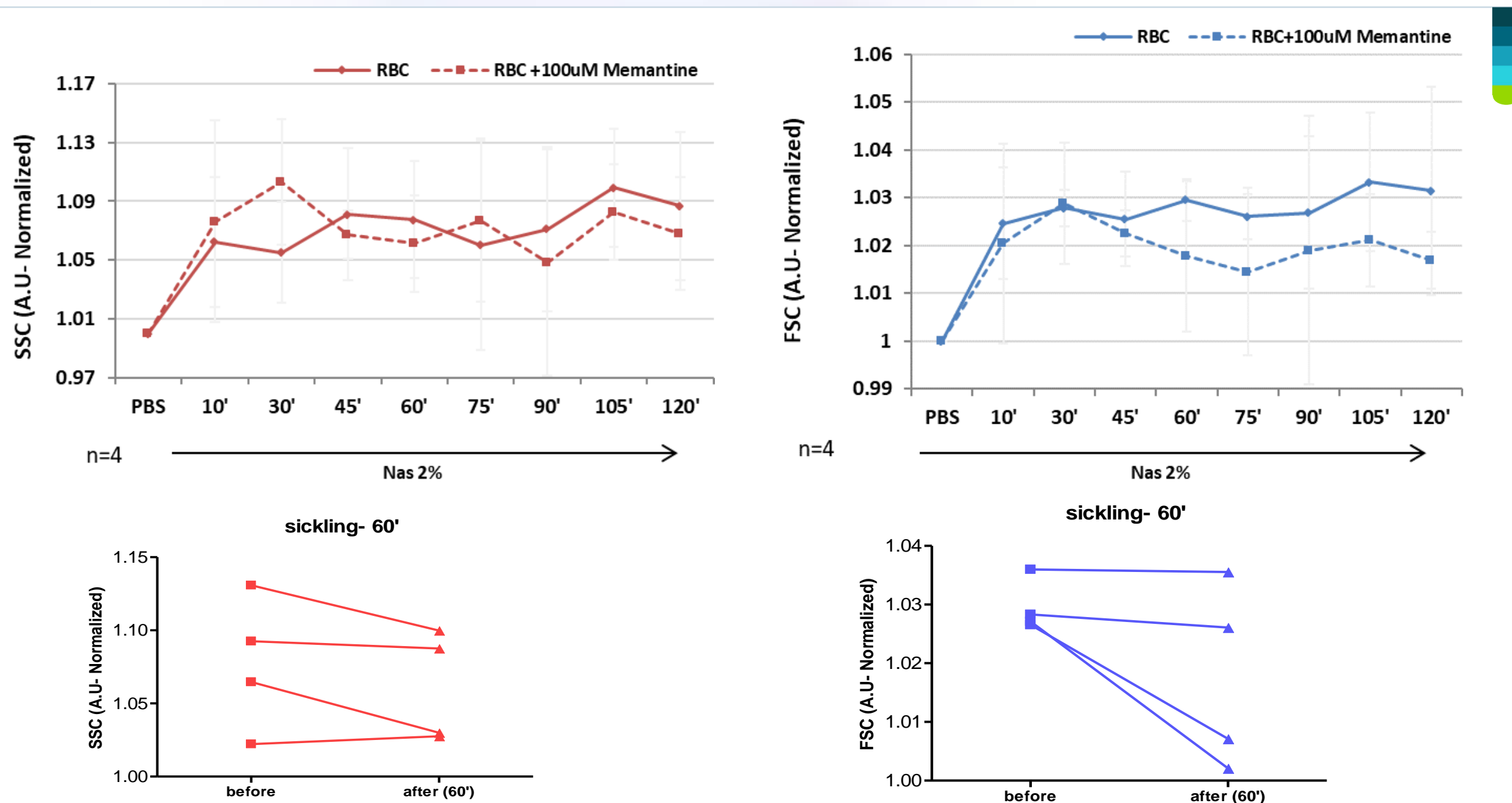


איור 2: תוצאות FC של דגימות תקינות, נשא וחולה אנמיה חרמשית לאחר 120 דקות אינקובציה עם Sodium metabisulfite 2%, התוצאות מוצגות כחציון לאחר נימול כל דגימה לתוצאה של אותה דגימה באינקובציה עם PBS. P value 0.016

איור 3:  
תמונות Cryo-SEM של תא אדום בריא (A), תא אדום של חולי SCD לאחר אינקובציה של 45 דקות עם Sodium metabisulfite 2% (B), תא אדום של חולי SCD לאחר אינקובציה של 24 שעות עם Sodium metabisulfite 2% (C).  
Scale bar- 2µm



בוצע באמצעות high-pressure freezing system and imaged using Zeiss Ultra Plus HR SEM ע"י ארינה דוידוביץ' ממעבדתו של פרופ' ישעיהו (איש) טלמון מהפקולטה להנדסה כימית ומכון לננוטכנולוגיות ע"ש רסל ברי, הטכניון, חיפה, ישראל.



איור 4: תוצאות תהליך ההתחרמשות בתאים אדומים של חולי SCD באמצעות FC לפני ואחרי טיפול בממנטין 100µM

### סיכום ומסקנות

נמצאה התאמה רבה בין תוצאות ה sickling בשיטת FC ובין איתור תאי חרמש במיקרוסקופ אור. שיטת FC יכולה לפטט ולהקל את ההערכה של פולימריזציה המוגלובין S ותגובת מטופלים לטיפול. בנוסף, השיטה יכולה לשמש לבדיקת תרופות anti-sickling פוטנציאליות. התרופה ממנטין נראית כאפשרות טיפולית טובה ויעילה כתרופה anti-sickle בחולי SCD אך ניסויים נוספים נדרשים על מנת לחזק את התוצאות.