

## بررسی شکنندگی گلبول‌های قرمز در موش‌های صحرائی

### هیپوتیروئید

دکتر صالح زاهدی اصل<sup>(۱)</sup>، دکتر فاطمه نبوی‌زاده رفسنجانی<sup>(۲)</sup>

#### چکیده

**مقدمه:** کم‌کاری غده تیروئید عوارض متعددی به دنبال دارد که کم‌خونی از جمله آنهاست. کم‌خونی می‌تواند علل مختلفی داشته باشد و شکننده‌تر بودن گلبول‌های قرمز از آن جمله است. در این بررسی شکنندگی گلبول‌های قرمز موش‌های صحرائی با غده تیروئید کم‌کار مورد مطالعه قرار گرفته است. مواد و روش‌ها: موش‌های نر و ماده با وزن  $246 \pm 5$  گرم با استفاده از متی‌مازول (۵۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر آب آشامیدنی برای مدت ۲۰ روز) هیپوتیروئید شدند. برای آزمون روتین شکنندگی گلبول‌های قرمز، نمونه‌های خون از ورید کاروتید موش‌ها روی EDTA گردآوری شد. سپس گلبول‌های قرمز در محیط‌هایی با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۹-۰ گرم در هزار) قرار داده شد و میزان همولیز با استفاده از رنگ سنجی تعیین گردید. برای تعیین درصد همولیز گلبول‌های قرمز در هر یک از غلظت‌ها، همولیز در لوله حاوی آب مقطر را صد درصد و به عنوان مبنا قرار داریم. یافته‌ها: بررسی هورمونی نشان داد که حیوانات هیپوتیروئید شدند و درصد همولیز گلبول‌های قرمز حیوانات هیپوتیروئید در غلظت‌های کلرید سدیم ۲/۵، ۳، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ و ۷ گرم در لیتر به طور معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) از حیوانات گروه شاهد بیشتر بود. نتیجه‌گیری: از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که گلبول‌های قرمز حیوانات هیپوتیروئید شکننده‌ترند و این اختلال می‌تواند از دلایل دیگر کم‌خونی در این حیوانات باشد.

واژگان کلیدی: آنمی، هیپوتیروئید، موش صحرائی، شکنندگی، گلبول‌های قرمز

#### مقدمه

کم‌کاری غده تیروئید عوارض متعددی را به دنبال دارد<sup>(۱)</sup>، که از جمله این عوارض کم‌خونی نسبی در این بیماران است.<sup>(۲)</sup> آنمی دلایل متعدد می‌تواند داشته باشد که از جمله

آنها می‌توان اختلال در ساخته شدن گلبول‌های قرمز،<sup>(۳)</sup> اختلال در تأمین آهن و سایر مواد غذایی<sup>(۴)</sup> و کاهش نیمه عمر گلبول‌های قرمز<sup>(۵-۷)</sup> را نام برد. کلسترول از ترکیبات اصلی غشای سلول‌ها از جمله گلبول‌های قرمز است که در سیال بودن غشای سلول نقش اساسی دارد.<sup>(۸)</sup> از طرفی فعالیت پمپ Na-K-ATPase در حفظ حجم سلول‌ها از جمله گلبول‌های قرمز نقش مهمی بازی می‌کند.<sup>(۹)</sup> با توجه به این که غلظت کلسترول در بیماران هیپوتیروئید<sup>(۱۰)</sup> و موش‌های دچار کم‌کاری تیروئید<sup>(۱۱)</sup> بالاتر از مقدار طبیعی آن است و نیز هورمون‌های تیروئید نقش عمده‌ای در فعالیت پمپ Na-K-ATPase در بافت‌های مختلف<sup>(۱۲-۱۵)</sup> و گلبول‌های قرمز<sup>(۱۶، ۱۷)</sup> بازی می‌کنند، انتظار می‌رود عملکرد گلبول‌های قرمز در کم‌کاری تیروئید متفاوت از حالت طبیعی باشد. در بیماران

(۱) مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی  
(۲) گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان  
نشانی مکاتبه: تهران، اوین، جنب دانشگاه شهید بهشتی، بیمارستان طالقانی، طبقه دوم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی.

E-mail: zahedi@erc-iran.com

مبتلا به کم‌کاری تیروئید کم‌خونی می‌تواند به دلیل شکننده‌تر بودن گلبول‌های قرمز نیز باشد. در این بررسی شکنندگی گلبول‌های قرمز موش‌های دچار کم‌کاری تیروئید در فشارهای اسمزی مختلف با حیوانات گروه شاهد مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه بر موش‌های نر و ماده از نوع N-MRI با وزن  $246 \pm 5$  گرم صورت گرفت که از انسیتو رازی کرج تهیه یا در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی تکثیر شده بودند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای  $22 \pm 3$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند، در حالی که به آب و غذای استاندارد دسترسی آزاد داشتند. برای متعادل کردن رژیم غذایی حیوانات هفته‌ای دوبار سبزیجات به رژیم غذایی حیوانات اضافه می‌شد. گروه‌های شاهد و آزمون به ترتیب شامل ۱۳ و ۱۲ حیوان بودند.

برای ایجاد هیپوتیروئیدی، متی‌مازول (متیل مرکاپتو ایمیدازول، شرکت دارویی لقمان) به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر برای مدت ۲۰ روز به آب آشامیدنی اضافه می‌شد.<sup>۱۸</sup> در پایان این مدت حیوانات با استفاده از نسدونال (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و نمونه خون از ورید گردن تهیه شد. نمونه خون برای آزمون تحمل فشار اسمزی<sup>۱</sup> روی EDTA گردآوری گردید. برای اندازه‌گیری کلسترول و هورمون‌ها، سرم نمونه پس از سانتریفوژ جدا و تا زمان اندازه‌گیری در  $-20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

برای تعیین شکنندگی گلبول‌های قرمز از آزمون روتین با اندکی تغییر و با استفاده از غلظت‌های مختلف کلرور سدیم استفاده شد.<sup>۱۹</sup> به طور خلاصه پس از سه بار شسته شدن گلبول‌های قرمز با سرم فیزیولوژی با استفاده از کلرید سدیم ۹ در هزار، نمونه خون به حجم اولیه رسانیده شد و ۲۵ میکرولیتر از آن در غلظت‌های مختلف از کلرید سدیم (۹-۰ در هزار) به مدت ۱۰ دقیقه و در  $37$  درجه سانتی‌گراد (به روش بن ماری) قرار داده شد. لوله‌ها سپس با دور سه هزار و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و دانسیته اoptیک محلول

بالایی<sup>ii</sup> با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Busch & Lam) و طول موج ۵۴۰ خوانده شد. با استاندارد قرار دادن مقدار دانسیته اoptیک لوله صفر هر نمونه خون به عنوان صد درصد همولیز، درصد همولیز بقیه لوله‌ها محاسبه گردید. کلسترول با استفاده از روش اسیدسولفوریک و کلریدفریک<sup>۲۰</sup> و مقدار هورمون‌های سرم با روش رادیوایمونواسی و با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت کاوشیار (ایران) اندازه‌گیری شد. هموگلوبین با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین، با روش اسپکتروفوتومتری و طول موج ۵۴۰ انجام شد.

نتایج بررسی به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار (Mean $\pm$ SE) بیان شد و مقایسه نتایج با روش آماری آزمون t صورت گرفت. رقم‌های p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار تلقی شده است.

## یافته‌ها

نتایج بررسی نشان می‌دهد که هموگلوبین گروه آزمون ( $11/3 \pm 0/4$ ) گرم در صد میلی‌لیتر (به طور معنی‌دار ( $p < 0/002$ ) از هموگلوبین حیوانات گروه شاهد ( $16/4 \pm 0/7$ ) گرم درصد میلی‌لیتر) کمتر است. جدول ۱ غلظت هموگلوبین، کلسترول، تیروکسین و هورمون محرک تیروئیدی (TSH) حیوانات گروه شاهد و آزمون را نشان می‌دهد. غلظت هورمون تیروکسین در حیوانات گروه آزمون به طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) از گروه شاهد کمتر و غلظت هورمون محرک تیروئیدی به طور معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) از گروه شاهد بیشتر بوده است. غلظت کلسترول حیوانات گروه آزمون تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ندارد.

نتایج بررسی مشخص می‌کند که شکنندگی گلبول‌های قرمز در حیوانات هیپوتیروئید بیشتر از حیوانات گروه شاهد بوده است (نمودار ۱). درصد همولیز گلبول‌های قرمز حیوانات هیپوتیروئید در غلظت‌های ۲/۵، ۳، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ و ۷ گرم در هزار در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بوده است ( $p < 0/05$ ).

ii- Supernatent

i- Osmotic fragility test

جدول ۱- هموگلوبین، تیروکسین، هورمون محرک تیروئیدی و کلسترول موش‌های گروه شاهد و هیپوتیروئید

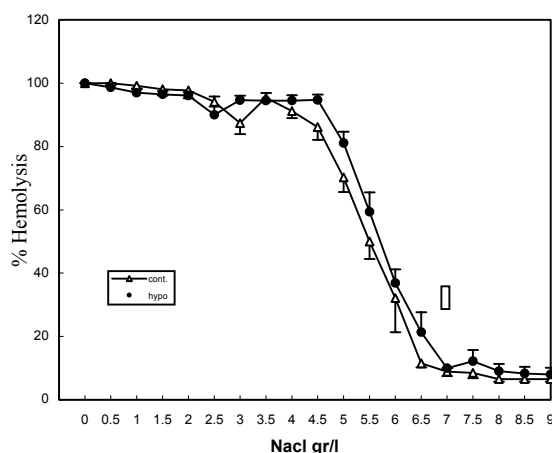
کلسترول	هورمون محرک تیروئیدی	تیروکسین	هموگلوبین	
(میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	(میکرونیوت در میلی‌لیتر)	(میکروگرم در صد میلی‌لیتر)	(گرم در صد میلی‌لیتر)	
۱۱۸±۶/۲	۰/۱۹±۰/۴	۲±۰/۶	۱۶/۴±۰/۷*	گروه شاهد
۱۲۴±۶/۲	۱/۱۹±۰/۴	۰/۰۲±۰/۰۱	۱۱/۳±۰/۴	گروه هیپوتیروئید
معنی‌دار نیست	p < /	p < /	۰/۰۰۲	مقدار p

\* اعداد نشان‌دهنده میانگین ± خطای معیار هستند (Mean±SE)

## بحث

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که گلبول‌های قرمز حیواناتی که با استفاده از متی‌مازول هیپوتیروئید شده‌اند، در مقابل فشارهای اسمزی پایین تحمل کمتری داشته‌اند (نمودار ۱).

در شکنندگی گلبول‌های قرمز محتویات ساختمان غشا،<sup>۲۱</sup> محتویات داخل سلول<sup>۲۲</sup> و فعالیت پمپ Na-K-ATPase<sup>۱۶</sup> می‌توانند نقش داشته باشند. مشخص شده که بیماران هیپوتیروئید<sup>۱۱</sup> و حیواناتی که به طور تجربی هیپوتیروئید شده‌اند،<sup>۱۲</sup> غلظت بالایی از کلسترول در سرم دارند. در بررسی فعلی، غلظت کلسترول حیوانات هیپوتیروئید با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشته است (جدول ۱) و بدین ترتیب علت شکننده‌تر بودن گلبول‌های قرمز نمی‌تواند افزایش مقدار کلسترول در ساختمان غشا باشد. مضافاً این که مقدار کلسترول در غشای اریتروسیت‌ها در موش‌های هیپوتیروئید کاهش دارد.<sup>۱۲</sup> دلیل عدم تغییر غلظت کلسترول پلاسما ممکن



نمودار ۱- مقایسه شکنندگی گلبول‌های قرمز موش‌های هیپوتیروئید (●) با گروه شاهد (△)

است کوتاه بودن مدت زمان استفاده از متی‌مازول، دوز و روش تجویز آن باشد. کلسترول در عین حال که به غشا استحکام می‌دهد، سبب سیالیت آن نیز می‌شود.<sup>۹،۱۱</sup> بنابراین کاهش مقدار کلسترول در غشا می‌تواند منجر به تغییر در سیالیت و یا قابلیت انعطاف آن شود. انعطاف‌پذیری غشا در شرایط خاصی بر شکنندگی گلبول مؤثر است: شرایطی که گلبول «نیاز به انعطاف‌پذیری» داشته باشد مانند عبور از مویرگ‌های باریک طحال. با توجه به نوع آزمایشی که در این بررسی از آن استفاده شد، به نظر می‌رسد که اولاً مقدار کلسترول غشا تغییر نکرده باشد (با توجه به عدم تغییر مقدار کلسترول پلاسما)، ثانیاً محیط هیپواسمولار که گلبول‌های قرمز در آن همولیز می‌شدند، استرسی نظیر عبور این عناصر سلولی از مویرگ را فراهم نمی‌کند.

فعالیت پمپ Na-K-ATPase و تعداد این پمپ در غشای سلول‌ها<sup>۱۳-۱۵</sup> از جمله گلبول‌های قرمز<sup>۱۶-۱۷</sup> تحت تأثیر غلظت هورمون‌های تیروئید است. نشان داده شده است که در بیماران مبتلا به گریوز که غلظت هورمون‌های تیروئید بیشتر از مقدار طبیعی است، فعالیت پمپ Na-K-ATPase در گلبول‌های قرمز کاهش پیدا می‌کند و پس از درمان بیماری مجدداً به حالت طبیعی بر می‌گردد.<sup>۱۶</sup> باید توجه داشت که حجم گلبول‌های قرمز در محیط‌های حاوی کلرید سدیم هم می‌تواند بی‌تغییر بماند چون در صورت ورود احتمالی یون‌های سدیم به درون سلول، به میزان معادل، یون‌های پتاسیم از سلول خارج می‌شوند. از آن گذشته اگرچه در مورد فعالیت پمپ Na-K-ATPase در گلبول‌های قرمز موش و ارتباط آن با فعالیت تیروئید بررسی صورت نگرفته است، اگر گلبول‌های قرمز این حیوان از این نظر مانند گلبول‌های قرمز انسان رفتار کند انتظار می‌رود که فعالیت این پمپ زیاد شده یا حداقل تغییری نکرده باشد. بنابراین عدم تحمل محیط

قرمز باشد و احتمال دارد در بیماران هیپوتیروئید نیز این عناصر خونی شکننده‌تر باشند که در این صورت به کم‌خونی در این بیماران کمک خواهد کرد. بررسی شکنندگی گلبول‌های قرمز در این بیماران پیشنهاد می‌شود.

## سپاسگزاری

این بررسی در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز صورت گرفته و هزینه آن توسط دانشکده پزشکی تأمین شده است. از زحمات خانم حکیمه نظری در تایپ مقاله و از همکاری خانم ملازمانی در انجام آزمایش‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

## Reference

1. Utiger RD. Hypothyroidism. In: De Groot LJ, Besser GM, Cahill GF, Marshal JC, Nelson DH, Odell WD; et al. 2nd edition, Philadelphia: WB Saunders Company; 1989; p.703-732.
2. Das KC, Mukherjee M, Sarkar TK, Dash RJ, Rastogi GK. Erythropoiesis and erythropoietin in hypo- and hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975; 40:211-20.
3. Wickramasinghe SN Nutritional anaemias. *Clin Lab Haematol.* 1988; 10:117-34.
4. Thorley-Lawson DA. Basic virological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Semin Hematol.* 1988; 25:247-60.
5. Lande WM, Mentzer WC. Haemolytic anaemia associated with increased cation permeability. *Clin Haematol.* 1985; 14:89-103.
6. Morse EE. Toxic effects of drugs on erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci.* 1988; 18:13-8.
7. Schwartz E, Cohen A, Surrey S. Overview of the beta thalassemias: genetic and clinical aspects. *Hemoglobin* 1988; 12:551-64.
8. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell.* 3rd ed. London: Garland Pub; 1994.
9. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 3rd ed. New York: Freeman & Company; 1998; p.298
10. Macknight ADC. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol Biochem* 1988; 3-5: 114-141.
11. Klein I, Levey GS. Unusual manifestations of hypothyroidism. *Arch Intern Med.* 1984; 144:123-8.
12. Ruggiero FM, Gnoni GV, Quagliariello E. Effect of hypothyroidism on the lipid composition of rat plasma and erythrocyte membranes. *Lipids.* 1987; 22:148-51.

هیپواسمولار توسط گلبول‌های قرمز حیوانات هیپوتیروئید (شکننده‌تر بودن) احتمالاً در نتیجه اختلال در فعالیت پمپ نیست.

شاید بتوان پیشنهاد کرد که هیپوتیروئیدی تغییراتی را در ساختمان غشای گلبول‌های قرمز حیوان ایجاد می‌کند که این تغییرات از طریق کلاسترول، فسفولیپید و پمپ Na-K-ATPase عمل نمی‌کند و منجر به کاهش مقاومت گلبول در مقابل افزایش حجم سلولی می‌گردد. محیط هیپواسمولار سبب انتشار آب به داخل سلول و در نتیجه افزایش حجم گلبول‌های قرمز می‌شود. اثبات این پیشنهاد نیازمند بررسی است.

نتایج این بررسی نشان می‌دهد کم خون بودن موش‌های هیپوتیروئید ممکن است به دلیل شکننده‌تر بودن گلبول‌های

13. Bajpai M, Chaudhury S. Transcriptional and post-transcriptional regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha isoforms by thyroid hormone in the developing rat brain. *Neuroreport.* 1999; 10:2325-8.
14. Shao Y, Pressley TA, Ismail-Beigi F. Na,K-ATPase mRNA beta 1 expression in rat myocardium--effect of thyroid status. *Eur J Biochem.* 1999; 260:1-8.
15. Harrison AP, Clausen T. Thyroid hormone-induced upregulation of Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> pumps: implications for contractility. *Am J Physiol.* 1998; 274:R864-7.
16. De Riva C, Vircici F. Impaired Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase activity in red blood cells in euthyroid women treated with levothyroxine after total thyroidectomy for Graves disease. *Metabolism.* 1988; 47: 1194-1198.
17. Ogasawara H, Nishikawa M. Evaluation of peripheral metabolic status by determination of Na-K ATPase pump activity in circulating erythrocytes in patients with thyroid diseases and nonthyroidal illnesses. *Endocr J.* 1993; 40:27-33.
18. Rondeel JM, de Greef WJ, Klootwijk W, Visser TJ. Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology.* 1992; 130:651-6.
19. Nelson DA, Davey FR. Erythrocytic disorders. In: Henry JB, editor. *Clinical Diagnosis & managment by laboratory methods.* 18th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991. P.644.
20. Tietz N, *Fundamentals of clinical chemistry.* Philadelphia: WB. Saunders Company; 1982. P.506-514.
21. Palek J, Lux SE. Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin Hematol.* 1983; 20:189-224.