

بررسی آنتی ژن ها و آنتی بادی های پلاکتی در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی

محبوبه مستخدمین حسینی^۱، مژگان شایگان^۲، شهرام سمیعی^۳، سعید محمدی^۴، حسن جلالی خو^۵،
پرдіس طباطبایی پناه^۶، سارا مدرسی^۷

چکیده

سابقه و هدف

مقاومت پلاکتی ایمیون از عوارض انتقال خون در بیماران با تزریق مکرر پلاکت می باشد. در این عارضه آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های سطحی پلاکت شامل آنتی ژن های اختصاصی و آنتی ژن های سازگاری بافتی ایجاد می شوند که می توانند باعث تخریب پلاکت های تزریق شده به وسیله سلول های پیگانه خوار و ماکروفاژ گردند. در مطالعه حاضر، آنتی ژن ها و آنتی بادی های ضد آنتی ژن های اختصاصی و آنتی بادی های ضد HLA-I در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی، بررسی هم زمان آنتی ژن ها HPA-1/-2/-3-4-5-15 (به روش مولکولی PCR-SSP)، غربالگری حضور آنتی بادی های پلاکتی (به روش فلوسیتومتری) و بررسی آنتی بادی های ضد HLA-I به روش پانل راکتیو آنتی بادی در سرم ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی انجام شدند. یافته ها توسط نرم افزار فلومکس و نرم افزار محاسبه گر خودکار هاردی وینبرگ تجزیه، تحلیل شدند.

یافته ها

از ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی، ۱۸ بیمار زن و ۳۱ بیمار مرد بودند. شمارش پلاکتی در زنان $3202 \pm$ ۶۴۵۷ در محدوده (۱۰۰۰-۱۰۰۰۰) سلول در میکرولیتر) با شمارش پلاکتی در مردان 2518 ± 7283 در محدوده (۱۰۰۰-۳۰۰۰) اختلاف معنادار نداشت. هیچ موردی از HPA-4b، HPA-5b در این مطالعه دیده نشد. آنتی بادی های ضد HLA در ۶۱/۲٪ و آنتی بادی های ضد HPA در ۴٪ بیماران مورد بررسی مشاهده شدند.

نتیجه گیری

اطلاعات حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی آلل a برای ۵-۴-۳-۱-HPA و آلل b برای ۲-HPA ۱۵ در جمعیت مورد مطالعه بیشتر بود. وفور آللی و ژنوتیپی بین گروه بیمار مورد مطالعه و جمعیت اهداکنندگان ایرانی می تواند توضیح دهنده وقوع مقاومت پلاکتی در آنها باشد.

کلمات کلیدی: پلاکت ها، فلوسیتومتری، آنتی بادی ها، آنتی ژن ها

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱

تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی - واحد تهران شرق - دانشگاه آزاد اسلامی - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۳- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول های بنیادی - بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

۵- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش - تهران - ایران

۶- دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شرق - تهران - ایران

۷- پزشک عمومی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و اداره کل انتقال خون تهران - تهران - ایران

مقدمه

مقاومت پلاکتی (Platelet refractoriness, PR) عبارت است از عدم افزایش تعداد پلاکت تا حد مطلوب در صورتی که تزریق پلاکت بیش از دو بار انجام شده است، که با محاسبه CCI (Corrected Count Increment) یک ساعت و ۲۴ ساعته پس از تزریق پلاکت، می‌توان به مقاومت پلاکتی پی برد (۱، ۲). ایجاد مقاومت پلاکتی و افزایش نیافتن تعداد پلاکت، باعث خونریزی شدید و احتمالاً مرگ ناشی از خونریزی می‌شود (۳). علل ایجاد مقاومت پلاکتی، ایمون و غیر ایمون می‌باشد. از علل غیر ایمون می‌توان به تب، عفونت، اسپلنومگالی، انعقاد منتشر درون عروقی و مصرف برخی داروها نظیر هپارین اشاره کرد. در مقاومت پلاکتی ایجاد شده به یکی از دلایل فوق، میزان CCI در ۱۸-۲۴ ساعت بعد از تزریق کمتر، از $pt/\mu L$ ۴۵۰۰ خواهد شد. در مقاومت پلاکتی ایمون، آلوآنتی‌بادی علیه HLA (Human Leukocyte Antigens) ایجاد می‌گردد و در این موارد CCI یک ساعته کمتر از $pt/\mu L$ ۷۵۰۰ می‌شود (۴، ۵). در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی که آلوآنتی‌بادی دارند باید، پلاکت سازگار با سرم بیمار نظیر HLA, HPA (Human platelet Antigen) انتخاب شود. گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاکتی، نقش حیاتی در فعالیت‌های انعقادی پلاکت ایفا می‌کنند. این گلیکوپروتئین‌ها به عنوان آلوآنتی‌ژن، اتو آنتی‌ژن و یا آنتی‌ژن‌های هدف برای آنتی‌بادی‌های مختلف نیز عمل می‌کنند. مثل آلوآنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت HPA که حاصل پلی‌مورفیسم در گلیکوپروتئین‌های غشاء پلاکت می‌باشند (۶). ابتدا تصور می‌شد که این آنتی‌ژن‌ها به طور اختصاصی روی پلاکت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها قرار دارند اما اکنون مشخص شده که بسیاری از آن‌ها محدوده توزیع وسیع‌تری دارند و روی مولکول‌های چسبنده بین سلول‌ها و ماتریکس، سلول‌های T فعال و سلول‌های آندوتلیال هم دیده می‌شوند (۷، ۸). آلوایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت می‌تواند در افراد سالم به دنبال حاملگی، تزریق خون، پیوند و نسبت به آنتی‌ژن‌هایی که گیرنده فاقد آن‌ها هستند، رخ دهد و بر خلاف آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز به صورت

طبیعی ساخته نمی‌شوند (۹). پنج عارضه به دلیل آلوایمیونیزاسیون و به دنبال ناسازگاری آنتی‌ژن‌های پلاکتی روی می‌دهند نظیر ترومبوسیتوپنی آلوایمیون نوزادان (Neonatal Allo Immune, NAITP)، پورپورای پس از تزریق (PTP) و (Post Transfusion Purpura)، مقاومت پلاکتی (PTR)، ترومبوسیتوپنی آلوایمیون (Passive Alloimmune, PAT)، ترومبوسیتوپنی آلوایمیون (Thrombocytopenia)، ترومبوسیتوپنی آلوایمیون بعد از پیوند (Tranplantation-Associated Alloimmune) TAT (۱۰). آنتی‌ژن‌های پلاکتی جزو مولکول‌های سازگاری نسجی فرعی (MHC Minor Histocompatibility Complex) هم شمرده شده‌اند و در بروز واکنش GVHD (Graft Versus Host Disease) بعد از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز نیز نقش دارند (۱۱). مقاومت پلاکتی اصولاً در افرادی که مصرف دائمی پلاکت، به صورت درمانی و یا به صورت پیشگیری دارند، به وجود می‌آید که در ۶۰-۲۰ درصد موارد به دلیل حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HLA-I (A,B) می‌باشد. در ۱۰٪ از این افراد هم‌زمان آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های پلاکتی هم قابل تشخیص است (۱۲). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۳ در سازمان انتقال خون ایران انجام شد، آنتی‌بادی‌های پلاکتی با یکی از دستورالعمل‌های موجود به روش فلوسیتومتری (با حذف HLA-I) در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی، آنمی آپلاستیک و IPT (Immune Thrombocytopenic Purpura) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که ۵۳/۷٪ از این بیماران دارای آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HLA-I و ۴۳/۹٪ دارای آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی بودند و ۳۱/۷٪ هر دو نوع آنتی‌بادی را داشتند (۱۱).

مهم‌ترین آلوآنتی‌ژن‌های پلاکتی درگیر در مقاومت پلاکتی، 2b، -5b، HPA-1a قید شده‌اند (۱۲). با توجه به اطلاعاتی که در زمینه مولکولی در مورد سیستم HPA شناخته شده و لزوم تشخیص سریع و صحیح آلوایمیونیزاسیون پلاکتی و هم‌چنین نیاز به داشتن پلاکت‌های سازگار از نظر آنتی‌ژن‌های پلاکتی برای درمان

بررسی مولکولی آنتی ژن های پلاکتی:

برای تعیین ژنوتیپ آلل های a و b آنتی ژن های HPA-1/2-3/4-5/15 از روش PCR-SSP استفاده گردید. برای هر آلل لوله جداگانه و در نهایت برای هر نمونه DNA، واکنش در ۱۲ لوله جداگانه انجام شد. توالی آغازگرها (محصول بایونیر کره) که از طریق شرکت تکاپو زیست تهیه شدند در جدول آمده است (جدول ۱). حجم کلی محتوای واکنش ۲۰ میکرولیتر (شامل ۴ میکرولیتر نمونه DNA، ۱۰/۳ میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۵/۷ میکرولیتر از مخلوط آغازگرها) در هر لوله بود. مخلوط آغازگرها خود شامل یک میکرولیتر از هر یک از آغازگر مخصوص آلل (allele specific primer)، آغازگر مشترک دو آلل (common primer)، یک جفت آغازگر بتا اکتین (به عنوان کنترل داخلی و کنترل مثبت واکنش) PCR و ۳/۷ میکرولیتر dH₂O بود که مقدار مصرفی هر کدام بسته به غلظت نهایی مورد نظر برای آن آغازگر داشت.

مقدار آنزیم DNA تک پلی مرز (۱۰۰۰ Units، ژوش) برای هر واکنش ۰/۳ میکرولیتر بود که به مخلوط واکنش اضافه شد. مخلوط واکنش شامل: ۱۰ میکرولیتر از 2x Master Mix برای هر لوله واکنش می باشد. غلظت نهایی MgCl₂ در همه واکنش ها ۱/۵ میلی مول در نظر گرفته شد. واکنش PCR در ترموسایکلر بیوراد (TC135) انجام گرفت. چرخه انجام PCR برای تکثیر به شرح زیر بود:

پس از یک دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۶°C برای فعال شدن، چرخه آمپلیفیکاسیون در ۳ مرحله در نظر گرفته شد. مرحله اول ۵ چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۸°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم ۲۰ چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۱°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم ۱۵ چرخه شامل: ۹۶°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۱°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش در پایان با مرحله Elongation شامل ۱ چرخه در ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه، تکمیل شد. پس از انجام مراحل تکثیر، برای الکتروفورز در روی ژل آگاروز ۲٪، محصولات PCR به نسبت ۱ به ۴ با ماده رنگی سایبرگرین مخلوط

مؤثر بیماران و در نتیجه آن نیاز به تعیین آلوانتی ژن های پلاکتی در دهنده و گیرنده پلاکت، بررسی آنتی ژن ها و آنتی بادی های پلاکتی دارای اهمیت هستند (۱۴، ۱۳). هم چنین طی یک مطالعه آنتی ژن های پلاکتی به روش مولکولی نیز برای اهداکنندگان خون در استان تهران بررسی گردید (۱۵). لذا با توجه به تجارب عملی برای روش مولکولی، در مطالعه حاضر هم زمان آنتی ژن های پلاکتی (به روش مولکولی) و آنتی بادی های پلاکتی (به روش فلوسیتومتری) و بررسی آنتی بادی های ضد HLA-I (به روش panel reactive antibody) در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی بررسی شدند.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. ۴۹ فرد بیمار دریافت کننده مکرر فرآورده حاوی پلاکت با CCI یک هفته کمتر از ۷۵۰۰ pt/μL با تشخیص مقاومت ایمیون و فاقد سابقه تب، مصرف هپارین و آمفوتریسین B، خونریزی منتشر، عفونت های مختلف، بزرگی کبد و طحال و پیوند سلول های بنیادی خونساز، از بیمارستان شریعتی و بیمارستان ۵۰۱ ارتش پس از دریافت رضایت نامه با کد (TMI.REC.1396.001) در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۵ الی بهمن ۱۳۹۶ وارد مطالعه شدند. بیماری های زمینه ای در بیماران وارد شده به این مطالعه لوکمای حاد لنفوبیدی (۳۲/۶٪) و میلوبیدی (۴۱٪)، مالتیپل میلوما (۲۴/۴٪) و ۱ نفر نوروبلاستوما (۲٪) بودند. پس از نمونه گیری از اهداکنندگان، لوله ها در دمای محیط سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. در فاصله ۳ ساعت از نمونه گیری، بافی کوت حاوی گلبول های سفید آن جدا شده و استخراج DNA با استفاده از ستون فیلتردار سیلیکایی در کیت کیاژن بر اساس لیز سلول ها و آزاد شدن ژنوم از پروتئین ها DNA به سیلیکا ژل غشاء ستون کیت کیاژن متصل می شود. سپس جذب نوری اسید نوکلئیک در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتری اندازه گیری شد (۱۶). بخش سرمی نمونه نیز در دمای ۷۰°C تا زمان بررسی آنتی بادی ها به روش فلوسیتومتری در چند میکروتیوب تقسیم و نگهداری شد.

جدول ۱: توالی آغازگرها، اندازه، غلظت نهایی و اندازه مورد انتظار برای محصولات تکثیری در هر آنتی‌ژن

سیستم	آنتی‌ژن	توالی آغازگر	اندازه (bp)
HPA-1	1a	5' TCA CAG CGA GGT GAG GCC A 3' 5' GGA GGT AGA GAG TCG CCA TAG 3'	۹۰
	1b	5' ACT TAC AGG CCC TGC CTC C 3' 5' AGC CGG AGT GCA ATC CTC TG 3'	۱۹۶
HPA-2	2a	5' GGG GGA GGG GCT GGG GA 3'	۲۵۸
	2b	5' GGG GGA GGG GCT GGG GC 3'	
HPA-3	3a	5' GGC CCT GGG ACT GTG AAT G3'	۲۹۳
	3b	5' GGC CCT GGG ACT GTG AAT G3'	
HPA-4	4a	5' CTG GCC ACC CAG ATG CG 3'	۲۵۲
	4b	5' CTG GCC ACC CAG ATG CA 3'	
HPA-5	5a	5' GGT AGA AAG GAG CTA TAG TTT GGC 3'	۲۴۶
	5b	5' GGT AGA AAG GAG CTA TAG TTT GGC 3'	
HPA-15	15a	5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA G 3'	۲۲۵
	15b	5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA A 3'	
β Actin	جلوبرنده	5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CG 3'	۴۵۰
	معکوس	5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CT 3'	

خودکار هاردی وینبرگ (بر اساس معادله $a^2 + b^2 + 2ab = 1$)، وفور آل‌های a و b برای آنتی‌ژن‌های پلاکتی محاسبه شدند. برای مقایسه فراوانی نسبی ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف نیز از مقایسه نسبت‌ها با آزمون کای‌دو و نرم‌افزار SPSS۱۹ استفاده شد.

مقدار $p < 0/05$ بیانگر تفاوت معنادار می‌باشد. در صورت فقدان باند، تنها در حالتی جواب را منفی و به عنوان عدم حضور آل تلقی می‌کنیم که تکثیر ژن کنترل (ژن بتا اکتین) صورت گرفته و باندی به اندازه ۴۵۰ bp در الکتروفورز مشاهده شود.

بررسی آنتی‌بادی‌های پلاکتی به روش فلوسیتومتری:

ابتدا Pooled پلاکتی از گروه خون O تهیه شد. نمونه‌های خون کامل که از ۵ فرد سالم در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شده بود، توسط آنتی‌سرم گروه‌بندی ABO (LORNE) گروه‌بندی گردید. این لوله با نیروی ۲۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، خون کامل به سه قسمت تبدیل گردید. قسمت ته لوله حاوی RBC، قسمت میانی باقی‌کوت و قسمت رویی حاوی پلاسما و پلاکت بود که به آن

شده و باندهای حاصله با ترانس ایلومیناتور UV در طول موج ۳۲۰ نانومتر مشاهده و با استفاده از Gel DOC عکس‌برداری صورت گرفت و در نهایت عکس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

تفسیر نتایج روش PCR:

غلظت آغازگرهای بتا اکتین که به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش لحاظ شده‌اند طوری محاسبه گردیده که کمتر از آغازگرهای اصلی باشند و در هنگام تکثیر، رقابتی ایجاد نکنند و در نتیجه وجود باند کنترل داخل مؤید صحت روند آزمایش و مواد مورد استفاده می‌باشد. باندهای مربوط به آل‌ها با استفاده از سایز مارکر و مقایسه آن با باند موجود در هر ردیف تشخیص داده شدند (جدول ۱). نتایج قرائت شده، یادداشت گردیدند و سپس وفور موارد مشاهده شده با موارد قابل انتظار طبق قانون هاردی وینبرگ و با استفاده از آزمون آماری کای‌دو مقایسه گردید. در صورت عدم اختلاف یعنی موارد مشاهده شده با موارد قابل انتظار طبق قانون هاردی وینبرگ مطابقت دارد و با وارد کردن فراوانی آللی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت در نرم‌افزار محاسبه‌گر

نمونه خون کامل در لوله ژل دار از افراد دریافت گردید و سپس با سانتریفوژ لوله ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه، نمونه سرم جدا شده و در دمای 70°C تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. به طور خلاصه ابتدا لئوسیت های افراد ظاهرا سالم را جدا و به تعداد $10^6 \times 3 \text{ cells/mL}$ سوسپانسیون نموده و سپس به حجم یک میکرولیتر به چاهک های پلیت ترازکی اضافه شدند. برای هر نمونه در این مطالعه سلول های جدا شده از ۴۰ فرد مختلف به ۴۰ حفره پلیت ترازکی اضافه و سپس به میزان یک میکرولیتر از سرم مورد بررسی نیز اضافه شد. ۳۰ دقیقه در 37°C قرار داده و سپس ۵ میکرولیتر کمپلمان خرگوش (محصول شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون) به چاهک ها اضافه شد. یک ساعت و نیم در 37°C قرار داده و سپس به محتویات هر چاهک ۲ میکرولیتر رنگ ائوزین ۷ اضافه و پس از یک تا دو دقیقه ۱۰ میکرولیتر فرمالین ۷۳٪ به چاهک ها اضافه شد. وقوع یا عدم وقوع واکنش لیز یا سمیت سلولی با میکروسکوپ معکوس (درشت نمایی ۱۰X) به صورت مثبت یا منفی یادداشت شدند (دستورالعمل 99.OT.021.SOP/01 = سازمان انتقال خون ایران). برای تفسیر نتایج مثبت برای واکنش PRA، حداقل ۱۰٪ (و بیشتر) از سلول های مورد بررسی مبنای گزارش مثبت قرار گرفته به صورت درصد گزارش شدند (۱۹-۱۸). تعداد موارد مثبت در بین زنان و مردان ثبت و درصد واکنش های مشاهده شده به عنوان شدت واکنش یادداشت گردیدند.

یافته ها

۱۹ بیمار (۳۸/۸٪) زن و ۳۱ بیمار (۶۱/۲٪) مرد بودند. میانگین سنی در گروه زنان $24/5 \pm 34/507$ سال و در محدوده سنی ۸۳-۲ سال و در مردان $21/7 \pm 41/01$ سال با محدوده سنی ۸۰-۴ سال بود که اختلاف معناداری نداشت. شمارش پلاکتی در زنان 3202 ± 6457 در محدوده (۱۰۰۰-۱۰۰۰۰) با شمارش پلاکتی در مردان 2518 ± 7283 در محدوده (۱۰۰۰-۳۰۰۰) اختلاف معناداری نداشت (جدول ۲). نتایج PRA در ۱۹ نفر (۳۸/۸٪ شامل ۹ مرد و ۱۰ زن) منفی یا کمتر از ۱۰٪

پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet Rich Plasma ، PRP) گفته می شود. در این مرحله با سمپلر و به آرامی PRP از لوله جدا و در یک لوله مجزا ریخته شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از آن با دستگاه سل کانتر شمارش و تعداد کل پلاکت در PRP مورد نظر محاسبه گردید. زیرا جهت انجام آزمایش های بعدی نیاز به تعداد $10^5 \times 10 \text{ mL}$ پلاکت افراد با گروه خون O بود. ۵۰ میکرولیتر از Pooled PRP را در لوله فلوسیتومتری ریخته و ۵۰ میکرولیتر از سرم بیمار را به آن می افزاییم. در لوله کنترل فقط سوسپانسیون و بافر به جای سرم بیمار در لوله جداگانه اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی گراد انکوبه شد. تا واکنش مناسب بین آنتی ژن و آنتی بادی صورت گیرد و پس از طی زمان انکوباسیون، سوسپانسیون ۳ مرتبه با PBS (نیروی 2000g و زمان ۱۰ دقیقه) شست و شو داده شد. پس از آخرین مرحله شست و شو، به رسوب زیرین از آنتی هیومن گلوبولین کونژوگه با FITC (محصول داکو) اضافه گردید. آنتی سرم مذکور در غلظت نهایی ۱/۳۰ با PBS رقیق شده و به لوله $\pm$ واکنش، ۵۰ میکرولیتر اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در محیط آزمایشگاه انکوبه شد. سپس یک بار با محلول شستشو PBS، ۱۰ دقیقه در دور 200g سانتریفوژ گردید. مایع رویی را دور ریخته برای آنالیز به دستگاه فلوسیتومتری داده شد و تا event 10000 قرائت شد (۱۷). روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه partec-cyFlow انجام شد و توسط نرم افزار فلومکس آنالیز گردید. در روش فلوسیتومتری در هر ران کاری یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه سرم منفی و کنترل ایزوتایپ هم جهت کنترل استفاده شدند. برای تنظیم نمودارها و ولتاژ دستگاه و شروع خوانش، ابتدا لوله حاوی ایزوتایپ کنترل به دستگاه فلوسیتومتری داده می شود.

بررسی آنتی بادی های ضد انجام آزمایش (PRA) Panel Reactive antibody

بررسی آنتی بادی های ضد گلبول های سفید با استفاده از آزمایش PRA به روش لئوسایتو توکسی سیتی با کمپلمان (CDC) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۴ میلی لیتر

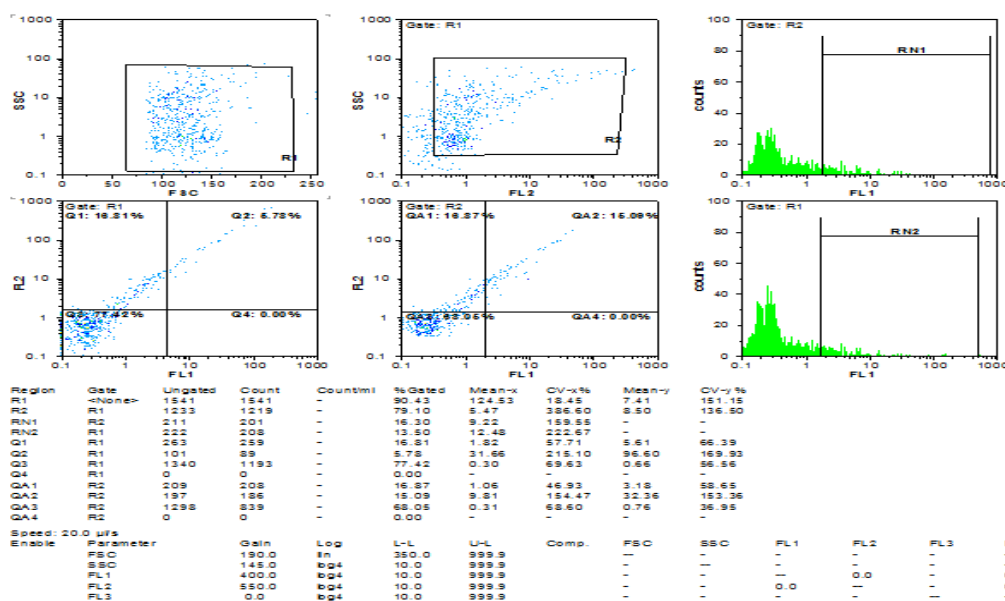
جدول ۲: مقایسه نتایج PRA در زنان و مردان مورد مطالعه

درصد پاسخ PRA	زنان	مردان	مجموع
کمتر از ۱۰٪	۱۰	۹	۱۹
۱۰٪	۲	۵	۷
۱۵٪	۳	۵	۸
۲۰٪	۱	۲	۳
۲۵٪	—	۱	۱
۳۰٪	—	۲	۲
۳۵٪	۱	—	۱
۵۰٪	۱	۵	۶
۵۵٪	—	۱	۱
۶۵٪	—	۱	۱
مجموع	۱۸	۳۱	۴۹

جنسیت نیز در مردان و در زنان ارتباط معناداری مشاهده نشد. به عبارتی در این مطالعه پاسخ مثبت PRA با تعداد فرآورده مصرفی ارتباطی نداشت.

بین پاسخ مثبت PRA با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق گرچه همبستگی ضعیف و معکوسی وجود داشت. اما این ارتباط معنادار نبود. رابطه بین پاسخ مثبت PRA با شمارش پلاکتی ۲۴ ساعته بعد از تزریق نیز معنادار نشد. شدت فلورسنت قرائت شده در روش فلوسیتومتری برای ۴۹ نمونه مورد بررسی در محدوده ۱۶/۹۱٪-۱/۳۳٪ بود که میانگین و انحراف استاندارد برای آن‌ها محاسبه شد. برای تعیین cut off اگر درصد قرائت شده شدت فلورسنت برای فرد از $M+2SD$ شدت فلورسنت (MF) قرائت شده، بزرگتر شد، نتیجه مثبت و اگر کمتر بود منفی تلقی شدند (۱۷). مقدار مذکور در مطالعه ما ۱۰/۸٪ حاصل شد. در کل ۲ نفر از نظر آنتی‌بادی ضد HPA مثبت شدند. در یک خانم با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق ۵۰۰۰ میکرولیتر، نتیجه فلوسیتومتری (۱۶/۳۰٪) برای آنتی‌بادی‌های ضد HPA و نتیجه $PRA=35\%$ مثبت برای آنتی‌بادی‌های HLA، برای هر دو آنتی‌بادی مثبت قلمداد شد (نمودار ۱).

بود. ۳۰ نفر (۶۱/۲٪)، شامل ۲۲ مرد و ۸ زن) این آنتی‌بادی‌ها را ($PRA \geq 10\%$) در سرم خود داشتند. پاسخ مثبت PRA در زنان و مردان با یکدیگر تفاوتی نداشت. در بیماران گرچه بین پاسخ مثبت PRA و تعداد فرآورده پلاکتی مصرفی ارتباط معکوسی مشاهده شد، اما این ارتباط معنادار نبود. بین این دو متغیر به تفکیک



نمودار ۱: سیتوگرام نمونه مثبت آنتی‌بادی‌های ضد HPA در این مطالعه (RNA1 = ۱۶/۳٪) به روش فلوسیتومتری

جدول ۳: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و فراوانی آللی (ژنی) آنتی‌ژن‌های مختلف پلاکتی در بیماران مورد مطالعه

HPA Alleles	درصد	تعداد	HPA Genotypes
HPA-1a	۳۴	۱۶	HPA-1a/1a
HPA-1b	۵۷/۵	۲۷	HPA-1a/1b
	۸/۵	۴	HPA-1b/1b
HPA-2a	۸/۲	۴	HPA-2a/2a
HPA-2b	۷۷/۶	۳۸	HPA-2a/2b
	۱۴/۲	۷	HPA-2b/2b
HPA-3a	۵۹/۲	۲۹	HPA-3a/3a
HPA-3b	۱۶/۳	۸	HPA-3a/3b
	۲۴/۵	۱۲	HPA-3b/3b
HPA-4a	۱۰۰	۴۹	HPA-4a/4a
HPA-4b	۰	۰	HPA-4a/4b
	۰	۰	HPA-4b/4b
HPA-5a	۱۰۰	۴۹	HPA-5a/5a
HPA-5b	۰	۰	HPA-5a/5b
	۰	۰	HPA-5b/5b
HPA-15a	۱۶/۳	۸	HPA-15a/15a
HPA-15b	۲۸/۶	۱۴	HPA-15a/15b
	۵۵/۱	۲۷	HPA-15b/15b

HPA-1a/1b HPA-2a/2b HPA-3a/3b HPA-4a/4b HPA-5a/5b HPA-15a/15b S.M B-actin



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژن‌های مختلف HPAs: از سمت چپ به راست: ستون اول و دوم مربوط به آلل‌های HPA-1a/1b، ستون‌های سوم و چهارم مربوط به آلل‌های HPA-2a/2b، ستون‌های ۵ و ۶ مربوط به آلل‌های HPA-3a/3b، ستون‌های ۷ و ۸ مربوط به آلل‌های HPA-4a/4b، ستون‌های ۹ و ۱۰ مربوط به آلل‌های HPA-5a/5b و ستون‌های ۱۱ و ۱۲ مربوط به آلل‌های HPA-15a/15b، ستون اول از سمت چپ مربوط به بتا‌اکتین (کنترل داخلی) و ستون دوم از چپ سایز مارکر ۵۰ bp می‌باشند.
نتیجه قرائت به شرح زیر بود:

HPA-1a⁺/1b⁻ HPA-2a⁺/2b⁺ HPA-3a⁺/3b⁺ / HPA-4a⁺/4b⁻ / HPA-5a⁺/5b⁻ / HPA-15a⁺/15b⁺

ژنوتیپ وی: HPA-1a/1a ، HPA-2a/2a ، HPA-3a/3b ، HPA-4a/4a ، HPA-5a/5a و HPA-15a/15b بود. نمونه دوم مربوط به یک آقا با شمارش پلاکتی یک ساعت بعد از تزریق ۵۰۰۰ میکرولیتر، با نتیجه فلو‌سیتومتری ۱۱/۴۸٪ مثبت برای آنتی‌بادی‌های ضد HPA و PRA منفی برای آنتی‌بادی‌های HLA و ژنوتیپ: HPA-1a/1b ، HPA-2a/2b ، HPA-3a/3b ، HPA-4a/4a ، HPA-5a/5a و HPA-15a/15b بود. در کل ۱۸ بیمار علی‌رغم نقص در CCI یک ساعته (ابتلا به مقاومت پلاکتی ایمن) در این طرح فاقد هر گونه آنتی‌بادی ضد HLA و ضد HPA به روش‌های به کار رفته، بودند.

یافته‌های آزمایش PCR-SSP:

در الکتروفورز ژل برای HPA-1 برای دو نمونه، نتایج مناسبی حاصل نشد و محاسبات وفور آلل‌های a و b آن بر مبنای ۴۷ نفر انجام گرفت. در سایر موارد نتایج برای ۴۹ نفر کامل شدند. در این مطالعه هیچ یک از افراد آلل b برای HPA-4، -5 نداشتند. وفور آلل a برای آنتی‌ژن‌های HPA-1، -2، -3 بیشتر از آلل b به دست آمد اما وفور HPA-15b از آلل HPA-15a در این مطالعه بیشتر شد (جدول ۳) (شکل ۱).

بحث

این مطالعه بر روی ۴۹ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمن انجام شد. وفور آلل‌های آنتی‌ژن‌های پلاکتی HPA-1a و HPA-1b به ترتیب ۰/۶ و ۰/۴ ، HPA-2a و HPA-2b به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۵۳ ، HPA-3a و HPA-3b به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۲۵ ، HPA-4a دارای فراوانی ژنی ۱ (یا ۱۰۰٪)، HPA-5a نیز دارای فراوانی ۱ (یا ۱۰۰٪) و HPA-15a و HPA-15b به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۶۹ بود. HPA-4b و HPA-5b در هیچ یک از افراد مشاهده نشد. فراوان‌ترین میزان هموزیگوسیتی در بین افراد مورد بررسی مربوط به HPA-5a/5a و HPA-4a/4a با ۱۰۰٪ و سپس HPA-3a/3a با وفور ۵۵/۱٪ بود. کمترین میزان هموزیگوسیتی مربوط به HPA-1a/1a (با وفور ۸/۵٪) و HPA-2a/2a (با وفور ۸/۲٪) است. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به HPA-

2a/1b (با وفور ۷۷/۶٪) و HPA-1a/1b (با وفور ۵۷/۵٪) و کمترین میزان هموزیگوسیتی مربوط به HPA-3a/3b (با وفور ۱۶/۳٪) است.

۳۰ نفر (۶۱/۲٪) از بیماران، آنتی‌بادی ضد HLA داشتند و ۱۹ نفر فاقد این آنتی‌بادی‌ها بودند. دو نفر (۴/۱٪) دارای آنتی‌بادی ضد HPA بودند که یک نفر از آن‌ها دارای آنتی‌بادی ضد HLA نیز بود. وفور گزارش شده برای آنتی‌بادی‌های ضد HLA و ضد HPA در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکت به ترتیب ۶۰٪-۲۰٪ و ۲۵٪-۸٪ می‌باشد که در بسیاری موارد با آنتی‌بادی‌های ضد HLA همراهند (۲۰، ۱۲). در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۳ در سازمان انتقال خون ایران، در مورد آنتی‌بادی‌ها در بیماران مبتلا به اختلالات خونی مانند لوسمی حاد و آنمی آپلاستیک که به درمان با پلاکت پاسخ مناسب نداده بودند، مشخص شد وفور آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های HLA-I برابر ۵۳/۷٪ و وفور آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی ۴۳/۹٪ بود که ۳۱/۷٪ افراد دارای هر دو نوع آنتی‌بادی بودند (۱۱). در مطالعه‌ای در مورد بررسی و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد HPA در ۲۰۴ بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی (به روش الایزا) در آلمان و چین، مشخص شد که ۱۱۴ نفر (۵۵/۸۸٪) آن‌ها دارای این آنتی‌بادی‌ها هستند و از این ۱۱۴ نفر، تعداد ۱۱۰ (۹۶/۵٪) نفر فقط آنتی‌بادی ضد HLA، ۲ نفر فقط آنتی‌بادی ضد پلاکتی و ۲ نفر هر دو آنتی‌بادی را داشتند (۲۱). وفور این آنتی‌بادی‌ها در بیماران این مطالعه در محدوده مطالعه‌های مشابه قبلی قرار می‌گیرند.

در سرم ۱۸ نفر از افراد مطالعه حاضر که CCI یک ساعته آن‌ها کمتر از ۷۵۰۰ pt/μL بود (بیانگر ابتلا به مقاومت پلاکتی ایمن)، آنتی‌بادی ضد HLA دیده نشد. علت این امر این است که آنتی‌بادی ضد HLA در این تحقیق با روش سمیت سلولی وابسته به کمپلمان بررسی شدند. سمیت سلولی وابسته به کمپلمان از سال ۱۹۶۰ و تا سال‌ها بعد به عنوان معیار استاندارد برای بررسی آنتی‌بادی‌های ضد HLA به کار گرفته شد. اما این روش قادر به ردیابی برخی آنتی‌بادی‌هایی که از نظر بالینی مهم هستند، دارا نمی‌باشد (۲۲).

هم چنین مطرح شده است گرچه سال‌ها آنتی‌بادی‌ها تنها روش حذف ایمونولوژیک پلاکت‌ها شناخته شدند اما مطالعه‌ها، حذف ایمونولوژیک پلاکت در غیاب آنتی‌بادی‌ها را مطرح کرده‌اند.

تخریب پلاکت‌ها در غیاب آنتی‌بادی به عوامل غیر ایمونولوژیک نسبت داده شده اما در برخی بیماران فاقد آنتی‌بادی، عوامل غیر ایمونولوژیک نیز در تخریب پلاکت‌ها مطرح نیستند و در این رابطه به نقش سلول‌های TCD8⁺ در پاکسازی پلاکت‌ها در غیاب آنتی‌بادی اشاره شده‌اند و مطرح گردیده این مکانیسم در بیماران مقاومت پلاکتی نیز قابل استناد است (۲۳).

فراوانی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در اهداکنندگان خون در کشورهای مختلف از جمله در ایران بررسی شده است. وفور ژنی یا آللی آنتی‌ژن‌ها در اهداکنندگان خون در کشورهای مختلف شامل انگلستان، چین، ژاپن، بحرین، اسپانیا، فنلاند، اتریش، کره، آمریکا، عربستان، تایلند و هم چنین ایران در محدوده‌های زیر به دست آمده‌اند: ۰/۹۹-

۰/۷۵ : HPA-1a ، ۰/۲۵ - ۰/۰۱ : HPA-1b ، ۰/۹۶ - ۰/۵۴ : HPA-2a ، ۰/۴۶ - ۰/۰۴ : HPA-2b ، ۰/۹۵ - ۰/۴۸ : HPA-3a ، ۰/۵۲ - ۰/۰۵ : HPA-3b ، ۰/۹۳ - ۰/۰۱ : HPA-4a ، ۰/۱۴ - ۰/۰۱ : HPA-4b ، ۰/۹۹ - ۰/۷۹ : HPA-5a ، ۰/۵۴ - ۰/۴۷ : HPA-15a ، ۰/۵۳ - ۰/۴۷ : HPA-15b (۱۵).

در بررسی وفور ژنی محاسبه شده برای بیماران در مطالعه حاضر با محدوده‌های وفور ژن‌های پلاکتی در جمعیت‌های مختلف افراد ظاهراً سالم، مشخص شد که فراوانی به دست آمده برای آلل a برای ژن‌های HPA-1، b 15-2 کمتر از محدوده فوق است در حالی که وفور آلل b برای همین آنتی‌ژن‌ها بیشتر از محدوده فوق می‌باشد (شاید به علت این که در مطالعه ما بیماران بررسی شده‌اند) و وفور آللی سایر آلل‌ها در مطالعه ما در محدوده مطالعه‌های قبلی است. وفور ژنوتیپی و آللی بین این بیماران (ایرانی) با اهداکنندگان خون (ایرانی) در مطالعه مدنی و همکاران در جدول مقایسه شده است (۱۶) (جدول ۴).

جدول ۴: وفور ژنوتیپی و آللی بین بیماران این مطالعه با اهداکنندگان خون (۱۵)

HPA Genotypes	فراوانی نسبی ژنوتیپ در مطالعه حاضر	فراوانی ژنوتیپ در اهداکنندگان خون	فراوانی ژن در مطالعه حاضر	فراوانی ژن در مطالعه مدنی (۱۵)
HPA-1a/1a	۳۴	۹۶	۰/۶	۰/۹۸
HPA-1a/1b	۵۷/۵	۴	۰/۴	۰/۰۲
HPA-1b/1b	۸/۵	۰		
HPA-2a/2a	۸/۲	۸	۰/۴۷	۰/۵۴
HPA-2a/2b	۷۷/۶	۹۲	۰/۵۳	۰/۴۶
HPA-2b/2b	۱۴/۲	۰		
HPA-3a/3a	۵۹/۲	۱۹	۰/۷۵	۰/۴۸
HPA-3a/3b	۱۶/۳	۵۹	۰/۲۵	۰/۵۲
HPA-3b/3b	۲۴/۵	۲۲		
HPA-4a/4a	۱۰۰	۱۰۰	۱	۱
HPA-4a/4b	۰	۰	۰	۰
HPA-4b/4b	۰	۰		
HPA-5a/5a	۱۰۰	۹۸	۱	۰/۹۹
HPA-5a/5ba	۰	۰	۰	۰/۰۱
HPA-5b/5b	۰	۲		
HPA-15a/15a	۱۶/۳	۱۴	۰/۳۱	۰/۴۷
HPA-15a/15b	۲۸/۶	۱۹	۰/۶۹	۰/۵۳
HPA-15b/15b	۵۵/۱	۶۷		

که با وفور آلل‌های HPA-4/-5/-15 در مطالعه ما شباهت وجود داشت (۲۵).

نتیجه‌گیری

اطلاعات حاصل از مطالعه ما نشان داد که فراوانی آلل a برای 4/-5/-15/3- HPA-1 و آلل b برای 15/-2 HPA-2 در جمعیت مورد مطالعه بیشتر بود. وفور آللی و ژنوتیپی بین گروه بیمار مورد مطالعه و جمعیت اهداکنندگان ایرانی می‌تواند توضیح‌دهنده وقوع مقاومت پلاکتی در آن‌ها باشد. گرچه اظهار نظر دقیق در این مورد نیاز به بررسی بیشتر اهداکنندگانی دارد که فرآورده‌های خون و پلاکت آن‌ها به این گروه بیماران تزریق شده است. تعیین ژنوتیپ آنتی‌ژن‌های پلاکتی راهکار عملی مناسبی برای بررسی علت آلوایمونیزاسیون در بیماران مبتلا به مقاومت پلاکتی و سایر موارد ترومبوسیتوپنی و کمک به مدیریت درمان آن‌ها است و امکان انتخاب اهداکننده سازگار از نظر این آنتی‌ژن‌ها را برای بیماران مربوطه مقدور می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از یافته‌های طرح مصوب در شورای پژوهش مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران (۷۹۶/خ مورخ ۲۷ خرداد ۱۳۹۶) با تقبل پرداخت همه هزینه‌ها توسط این مرکز می‌باشد که به عنوان پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شرق ارائه شد. نویسندگان مقاله به این وسیله از خانم‌ها: زهرا عطایی، مونا تجریشی، الهام سلطان‌آبادی، شیرین عبدی‌زاده، دکتر مهین نیکوگفتار و آقایان دکتر محمد نوروزی عقیده و مجتبی شاکرمی که در جمع‌آوری نمونه‌های مختلف برای راه‌اندازی و انجام آزمایش‌ها کمک کرده‌اند، تشکر می‌نمایند.

مقایسه آماری وفور ژنوتیپی برای HPA-1b/1b ، HPA-1a/1a ، HPA-2a/2b ، HPA-3a/3b و HPA-3b/3b و هم چنین وفور آلل‌های a و b برای آنتی‌ژن‌های 3-، HPA-1، در بیماران مورد مطالعه با اهداکنندگان خون هم نژاد ایرانی تفاوت معناداری دارند ($p < 0.0001$) (۱۶). در بیماران، هموزیگوسیتی برای آلل b مربوط به HPA-1،-2 مشاهده شد در حالی که اهداکنندگان فاقد آن هستند. این تفاوت وقوع احتمالی در بیماران طی دریافت پلاکت از اهداکنندگان خون هتروزیگوت ab برای این آنتی‌ژن‌ها را مطرح می‌کند. اثبات این امر احتیاج به تعیین نوع آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران دارد. در جمعیت‌های مختلف وفور آلل b برای HPA-15 در مقایسه با آلل این آنتی‌ژن بیشتر است که در مطالعه ما نیز چنین بود (۱۶). اما وفور ژنوتیپی و آللی برای سایر آنتی‌ژن‌ها تفاوت معناداری بین این دو جمعیت نشان نداد (ارزش p در محدوده ۰/۸۵-۰/۱). مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی بیماران این مطالعه با تحقیقی که بر روی بیماران انکوهماتولوژیک با ترومبوسیتوپنی کمتر از ۲۰۰۰۰ میکرولیتر و مصرف‌کننده فرآورده متراکم پلاکتی در برزیل انجام شده نیز نشان داد که فقط در آلل‌های هموزیگوت a برای 15-، HPA-3 و b برای HPA-1 با هم شبیهند و وفور ژنوتیپی و آللی سایر آنتی‌ژن‌های پلاکتی بین این دو گروه بیماران تفاوت معناداری ندارند که شاید به دلایل تفاوت نژادی باشد (۲۴). در مطالعه بررسی HPAs در ۱۵۰ بیمار (۶۵ مرد و ۸۵ زن) مبتلا به بدخیمی‌های خونی همراه با ترومبوسیتوپنی در محدوده سنی ۱۸ الی ۳۰ سال در برزیل به روش SSP-PCR وفور آللی به شرح زیر حاصل شد:

HPA-1a: 0.837; HPA-1b: 0.163; HPA-2a: 0.830; HPA-2b: 0.170; HPA-3a: 0.700; HPA-3b: 0.300; HPA-4a: 1; HPA-4b: 0; HPA-5a: 0.887; HPA-5b: 0.113; HPA-15a: 0.457 و HPA-15b: 0.543

References:

- 1- Heal JM, Masel D, Rowe JM, Blumberg N. Circulating immune complexes involving the ABO system after platelet transfusion. *Br J Haematol* 1993; 85(3): 566-72.
- 2- Bub CB, Martinelli BM, Avelino TM, Gonçalves AC, Barjas-Castro Mde L, Castro V. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35(4): 252-5.
- 3- Petz LD, Garratty G, Calhoun L, Clark BD, Terasaki PI, Gresens C, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. *Transfusion* 2000; 40(12): 1446-56.
- 4- Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 2008; 142(3): 348-60.
- 5- Apelseth TO, Hervig T, Bruserud O. Current practice and future directions for optimization of platelet transfusions in patients with severe therapy-induced cytopenia. *Blood Rev* 2011; 25(3): 113-22.
- 6- Kickler T. Platelet Immunology Thrombokinetics. In: Anderson KC, Ness PM. *Scientific basis of Transfusion Medicine*. 2nd ed. USA: Saunders; 2000. p. 227-36.
- 7- Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99(5): 1692-8.
- 8- Mohanty D, Kulkarni B, Ghosh K, Nair S, Khare A. Human Platelet Specific Antigens and their Importance. *Indian Pediatr* 2004; 41: 797-805.
- 9- Weibert K, Chan H, Smith JW, Heddle N, Kelton J. Red cell Platelet and White cell Antigens. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM. *Wintrob's Clinical Hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 808-17.
- 10- Kupatawintu P, Nathalang O, Charoen RO, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. *Immunohematology* 2005; 21(1): 5-9.
- 11- Shaiegan M, Amiri F, Derakhti Gonbad MH, Aghaeipour M, Maghsudlu M, Tabatabaian A, et al. Flowcytometric evaluation of antibodies against histocompatibility antigens and platelet-specific antigens in patients with hematological disorders following the transfusion of platelets concentrates. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2005; 1(2): 27-36. [Article in Farsi]
- 12- Koutsogianni P. Nomenclature of human platelet antigens and clinical condition. *Haematology* 2004; 7: S82-8.
- 13- Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med* 1997; 7(1): 41-5.
- 14- Ficko T, Galvani V, Ruprecht R, Dovc T, Rozman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. *Transfus Med* 2004; 14(6): 425-32.
- 15- Madani T, Samiee Sh, Attaei Z, Kavari M, Mostkadehin M, Shaiegan M. Platelet antigens frequency in blood donors: comparison of molecular detection with ELISA method (for HPA-1a). *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2007; 4(3): 165-74. [Article in Farsi]
- 16- Zimmermann R, Wittmann G, Zingsem J, Blasczyk R, Weisbach V, Eckstein R. Antibodies to private and public HLA class I epitopes in platelet recipients. *Transfusion* 1999; 39(7): 772-80.
- 17- Carolina B, Beatriz M, Avelino TM, Gonçalves A C, de Lourdes M, Barjas-Castro, et al. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35(4): 252-5.
- 18- Kuda E, Al-Wahadneh A. Comparison of Flow Panel Reactive Assay (PRA)TM Specific Test with Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) to Define the HLA Antibodies Specificity: A Preliminary Study. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2001; 12(1): 21-7.
- 19- Monteiro F, Rodrigues H, Kalil J, Castro MC, Panajotopoulos N, Paredes M, et al. Pre- and Posttransplant Monitoring of Alloantibodies by Complement-Dependent Cytotoxicity and Luminex Methodologies in Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2012; 44(8): 2411-2.
- 20- Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness-practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol* 2015; 171(3): 297-305.
- 21- Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. *Transfus Med* 2018; 28(1): 40-6.
- 22- İnal A, Özçelik Ü, Ogan Uyanık E, Külâh E, Demirağ A. Analysis of Panel Reactive Antibodies in Renal Transplant Recipients Detected by Luminex: A Single-Center Experience. *Exp Clin Transplant* 2016; 14(4): 401-4.
- 23- Arthur CM, Patel SR, Sullivan HC, Winkler AM, Tormey CA, Hendrickson JE, et al. CD8+ T cells mediate antibody-independent platelet clearance in mice. *Blood* 2016; 127(14): 1823-7.
- 24- Bianchi JV, de Azevedo MR, Jens E, Nukui Y, Chamone DA. Frequency of human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012; 34(3): 202-5.

Original Article

Evaluation of platelet antigens and antibodies in patients with platelet refractoriness

Mostakhdemin Hosseini M.¹, Shaiegan M.², Samiee Sh.², Mohammadi S.³,
Jalaei-Kho H.⁴, Tabatabai Panah P.¹, Modarresi S.^{2,5}

¹East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Tehran, Iran

⁴School of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Tehran Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Immune platelet refractoriness is a complication of blood transfusion in patients with multiple platelet transfusions. Antibodies against surface antigens, including human platelet antigens (HPAs) and human leukocyte antigens (HLAs), can be produced which can cause the degradation of transfused platelets by macrophages. In this study, the frequency of platelet antigens and antibodies against both HPAs and HLAs is evaluated in patients with platelet refractoriness.

Materials and Methods

In this descriptive study, the simultaneous analyses of antigens of HPA-1/ -2/ -3/ -4/ -5/ -15 by molecular method (PCR-SSP), screening of platelet antibodies by flow cytometry, and anti-HLA-I antibodies by panel reactive antibody (PRA) assay were evaluated in 49 patients with platelet refractoriness.

Results

Out of 49 patients (including 18 females and 31 males) with platelet refractoriness, the platelet count in women was 6400 ± 3202 (range of 1000-10000 cells/ μ l) and in men 7283 ± 2518 cell/ μ l (range of 3000-10000) showing no significance ($p = 0.055$). No case of HPA-4b, HPA-5b was found in this study. Anti-HLA antibodies and anti-HPA antibodies were detected in 61.2% and 4% of the patients, respectively.

Conclusions

The data from our study showed that the frequencies of the allele a for HPA-1 / -3 / -4 / -5 and the allele b for HPA-2 / -15 were higher in the studied population. The frequencies of alleles and genotypes between the studied group and Iranian blood donors were different and can explain the occurrence of platelet resistance among the patients.

Key words: Platelets, Flow Cytometry, Antibodies, Antigens

Received: 23 Oct 2018

Accepted: 12 May 2019

Correspondence: Shaiegan M., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 1157-14665 Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599 ; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: mojganshaiegan@yahoo.com