

بررسی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران با تزریق خون مکرر

الناز ابراهیم‌زاده^۱، مستانه علائی^۲، شهرام سمیعی^۳، مژگان شایگان^۴

چکیده

سابقه و هدف

ایجاد آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HLA و آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکتی HPA به دنبال تزریق خون و فرآورده‌ها محتمل است. این امر منجر به بروز عوارضی نظیر پورپورای پس از تزریق، مقاومت پلاکتی ایمیون، ترومبوسیتوپنی و خونریزی در گیرندگان می‌گردد. در این مطالعه، آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی به طور هم‌زمان در بیماران با تزریق خون مکرر بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی به روش PCR-SSP و فلوسیتومتری PIFT در ۳۰ بیمار تالاسمی ماژور و ۳۰ بیمار هماتوانکولوژی با تزریق خون مکرر که شمارش پلاکتی یک ساعت پس از تزریق $450000-150000/\mu L$ داشتند، بررسی شدند. برای مقایسه نتایج جمعیت‌های مورد مطالعه، از SPSS ۱۹ و آزمون آماری کای‌دو استفاده شد.

یافته‌ها

در بررسی فراوانی ژنوتیپی در بیماران هماتوانکولوژی و تالاسمی، ژنوتیپ HPA-1a/1a دارای بیشترین فراوانی و ژنوتیپ‌های HPA-1a/1b و HPA-3b/3b دارای کمترین فراوانی بودند. هموزیگوت 1b/1b و 2b/2b و 5b/5b مشاهده نشدند. آلل HPA-4b در بیماران مورد بررسی یافت نشد. نتیجه فلوسیتومتری PIFT در ۱۰ بیمار هماتوانکولوژی (۳۰٪) و یک بیمار تالاسمی (۳/۳٪) مثبت شد. فراوانی موارد مثبت آنتی‌بادی‌ها در گروه بیماران هماتوانکولوژیک واضحاً بیشتر از گروه تالاسمی بود (p=۰/۰۰۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به فراوانی ۱۰۰ درصدی آلل HPA-4a و فقدان آلل HPA-4b و عدم مشاهده ژنوتیپ هموزیگوت b/b آلل‌های HPA-1/-2/-5 در بیماران این مطالعه، احتمال وقوع آلوایمیونیزاسیون پلاکتی ناشی از آنتی‌بادی‌های ضد این آنتی‌ژن‌ها در این بیماران کمتر است.

کلمات کلیدی: پلاکت‌ها، آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی‌ها، PCR

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۲۵

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
- ۳- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- دکترای ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

بیمارانی که به طور مکرر خون و فرآورده‌های خونی نظیر پلاکت دریافت می‌کنند (multitransfused)، بر ضد آلوآنتی‌ژن‌های دریافتی نظیر آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت (HPA؛ Human platelet Antigens) و آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی (HLA؛ Human Leukocyte Antigens)، آلوآنتی‌بادی تولید می‌کنند (۱). آلوایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های پلاکتی می‌تواند پس از تزریق خون، پیوند اعضا و در افراد سالم به دنبال بارداری ایجاد شود. این آنتی‌بادی‌ها بر خلاف آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز به صورت طبیعی ساخته نمی‌شوند (۲). عمده عوارضی که به دلیل ناسازگاری آنتی‌ژن‌های پلاکتی و آلوایمیونیزاسیون و متعاقب آن تولید آلوآنتی‌بادی‌ها روی می‌دهند شامل ترومبوسیتوپنی آلوایمیون نوزادان، پورپورای پس از تزریق و مقاومت پلاکتی هستند (۳). خود آنتی‌ژن‌های پلاکتی هم‌چنین جزو مولکول‌های سازگاری نسجی فرعی (mHC; Minor Histocompatibility Complex) می‌باشند (۴).

علاوه بر دریافت‌کنندگان فرآورده پلاکتی، در برخی از بیماران با تزریق خون مکرر مانند بیماران بتا تالاسمی ماژور که به طور منظم گلبول قرمز متراکم (PRBC) دریافت می‌کنند، خطر آلوایمیونیزاسیون نه تنها بر علیه آنتی‌ژن‌های RBC بلکه هم‌چنین بر ضد آنتی‌ژن‌های HPA و HLA-1 نیز وجود دارد که می‌تواند به سبب حضور تعداد اندک پلاکت و لکوسیت موجود در پلاسما کیسه‌های PRBC رخ دهد. آگاهی از این مسأله می‌تواند سبب بهبود فرآورده‌های کم لکوسیت، با به حداقل رساندن آلوایمیونیزاسیون پلاکتی و کاهش عوارض ناشی از آن شود (۵، ۶).

در بیماران هماتوانکولوژی نیز به دنبال تزریق مکرر فرآورده پلاکتی و از آن جایی که آنتی‌ژن‌های ABO گروه خونی به مقدار کمی (کمتر از RBC) روی پلاکت نیز بروز می‌کنند، تزریق فرآورده‌های پلاکتی ناسازگار از لحاظ ABO به غیر از تولید anti-A و anti-B، می‌تواند تولید سایر آلوآنتی‌بادی‌ها نظیر آنتی‌بادی ضد HLA و HPA را نیز در

بدن بیمار سبب شده و خطر آلوایمیونیزاسیون پلاکتی را افزایش دهد (۷).

وفور ایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های HLA در بیماران با تزریق خون مکرر در مطالعه‌های متعدد به میزان‌های مختلفی گزارش شده است، به طوری که در مطالعه‌های گوناگون، تا ۶۹٪ در بیماران لوسمیک، ۸۰٪ در بیماران آنمی آپلاستیک، ۳۰٪ تا ۶۰٪ در بیماران مبتلا به سایر بدخیمی‌های خونی و ۳۰٪ در بیماران بتا تالاسمی ماژور، این آنتی‌بادی‌ها را ردیابی کرده‌اند. هم‌چنین آنتی‌بادی‌های ضد HPA در ۹۰٪ از موارد پورپورای پس از انتقال خون، ۵۶٪ از مبتلایان به ترومبوسیتوپنی اتوایمیون اولیه و ۳۳٪ از مبتلایان به ترومبوسیتوپنی ایمیون ثانویه دیده می‌شوند (۹).

با این اوصاف تعیین نوع آنتی‌ژن‌های پلاکتی جهت تشخیص، مدیریت و درمان عوارض بالینی فوق‌الذکر ضروری به نظر می‌رسد. در میان روش‌های مولکولی که تاکنون برای بررسی آنتی‌ژن‌های پلاکتی استفاده شدند، Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) (specific primers) بیشترین و ساده‌ترین کاربرد را دارد (۶).

آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی HLA و HPA هم‌چنین احتمال وقوع مقاومت پلاکتی در بیماران با تزریق خون مکرر را افزایش می‌دهند و باعث عدم تاثیر تزریق پلاکت و عدم افزایش شمارش پلاکتی متعاقب تزریق در این بیماران می‌گردند. بنابراین در بیماران با تزریق خون مکرر، تزریق فرآورده پلاکتی HLA/HPA سازگار توصیه می‌شود (۱۱، ۱۰). از سوی دیگر آلوآنتی‌بادی‌های پلاکتی نه تنها بر علیه آلل a (آلل با وفور بیشتر) آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت (HPAs) بلکه بر علیه آلل b (آلل با وفور پایین‌تر) نیز ممکن است تولید شوند. از این رو تعیین ژنوتیپ آنتی‌ژن‌های پلاکتی در بیماران هماتوانکولوژیک هم در تشخیص علت ترومبوسیتوپنی آلوایمیون و هم در فراهم ساختن فرآورده پلاکتی سازگار با این آنتی‌ژن‌ها ارزش دارد. هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهند که در بیماران با ژنوتیپ هتروزیگوت a/b (که هر دو آلل وجود دارد) از نظر آنتی‌ژن‌های پلاکتی، احتمال ناسازگار بودن فرآورده تزریق شده در بیمار خیلی کم و یا نزدیک به صفر است

آنتی‌ژن‌های پلاکتی) و مقدار ۳ میلی‌لیتر از سرم در لوله‌های لخته ژل‌دار درب زرد (برای بررسی سرمی آنتی‌بادی‌های پلاکتی) از هر بیمار گرفته شد. نمونه‌ها در دمای محیط و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند و در فاصله ۳ ساعت از نمونه‌گیری، بافی‌کوت حاوی گلبول‌های سفید آن جدا شده و استخراج DNA با استفاده از ستون فیلتردار سیلیکایی در کیت کیاژن بر اساس لیز سلول‌ها و آزاد شدن ژنوم از پروتئین‌ها صورت گرفت. DNA به سیلیکا ژل غشاء ستون کیت کیاژن متصل شده و خالص‌سازی شد و سپس جذب نوری اسید نوکلئیک در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتری اندازه‌گیری شد (۱۴). بخش سرمی نمونه نیز در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی آنتی‌بادی‌ها در چند میکروتیوب تقسیم و نگهداری شد.

بررسی آنتی‌ژن‌های پلاکتی:

برای تعیین ژنوتیپ آلل‌های a و b آنتی‌ژن‌های HPA-1/-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 بیونیر 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 (Human Growth Hormone) HGH (به عنوان کنترل داخلی و کنترل مثبت واکنش PCR) و ۳/۷ میکرولیتر dH_2O بود که مقدار مصرفی هر کدام بسته به غلظت نهایی مورد نظر برای آن آغازگر داشت. مقدار آنزیم DNA تک پلی‌مراز (Units ۱۰۰۰، روش) 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 بود. غلظت نهایی $MgCl_2$ در همه واکنش‌ها ۱/۵ میکرومولار در نظر گرفته شد. واکنش PCR در ترموسایکلر بیوراد

ولی در بیمارانی که ژنوتیپ هموزیگوت aa و یا bb را برای هر آلل دارند، احتمال وقوع آلوایمونیزاسیون پس از هر تزریق وجود دارد. از این رو مطالعه و بررسی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در بیماران با عارضه ترومبوسیتوپنی ضروری است (۱۲). هم‌چنین در بین آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکتی به نظر می‌رسد آلوایمونیزاسیون علیه HPA-5b بیشترین فراوانی را در بیماران با تزریق خون مکرر دارد (۱۳). در این مطالعه به بررسی هم‌زمان آنتی‌ژن‌های پلاکتی (به روش مولکولی PCR-SSP) و آنتی‌بادی‌های پلاکتی (به روش فلوسایتومتری PIFT یا Platelet Immuno fluorescent Test) در بیماران با تزریق خون مکرر (بیماران تالاسمی ماژور و بیماران دارای اختلالات هماتولوژیک) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی در فاصله زمانی آبان ۱۳۹۷ تا آبان ۱۳۹۸ بر روی ۶۰ بیمار مولتی ترانسفیوز شامل ۳۰ بیمار تالاسمی ماژور و ۳۰ بیمار دارای اختلالات هماتولوژیک صورت گرفت. معیار ورود به این مطالعه مولتی ترانسفیوز بودن بیماران (دریافت حداقل دو نوبت فرآورده پلاکتی و/یا پک سل توسط بیماران) و عدم وجود مقاومت پلاکتی (دارا بودن شمارش پلاکتی در محدوده $450000-150000/\mu L$ یک ساعت پس از تزریق پلاکت بر اساس گزارش CBC آزمایشگاه و تایید همکاران بالینی طرح) بود. بیماران هماتولوژیک از بیمارستان شریعتی تهران (بخش هماتولوژی مرکز تحقیقات هماتولوژی/انکولوژی و پیوند مغز استخوان) و بیماران تالاسمی ماژور از مرکز تالاسمی ظفر پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی و با کد اخلاق IR.TMI.REC.1397.024 از مؤسسه عالی آموزشی پژوهشی طب انتقال خون وارد مطالعه شدند. هر دو گروه بیماران به تایید همکاران بالینی طرح فاقد عوامل مستعدکننده ایجاد مقاومت پلاکتی غیر ایمنون شامل تب، مصرف داروهایی نظیر هپارین و آمفوتریسین B، خونریزی، عفونت و بزرگی طحال بودند.

مقدار ۳ میلی‌لیتر خون کامل در لوله‌های درب بنفش حاوی ضد انعقاد EDTAK3 (برای بررسی مولکولی

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

اندازه (bp)	توالی	آنتی ژن	سیستم
۹۰	5' TCA CAG CGA GGT GAG GCC A 3'	۱a	HPA-1
	5' GGA GGT AGA GAG TCG CCA TAG 3'	Common	
۱۹۶	5' ACT TAC AGG CCC TGC CTC C 3'	۱b	HPA-1
	5' AGC CGG AGT GCA ATC CTC TG 3'	Common	
۲۵۸	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAC 3'	۲a	HPA-2
	5' GCCCCCAGGGCTCCTGAT 3'	۲b	
	5' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA 3'	Common	
۲۹۳	5' GGG GGA GGG GCT GGG GA 3'	۳a	HPA-3
	5' GGG GGA GGG GCT GGG GC 3'	۳b	
	5' GGC CCT GGG ACT GTG AAT G3'	Common	
۲۵۲	5' CTG GCC ACC CAG ATG CG 3'	۴a	HPA-4
	5' CTG GCC ACC CAG ATG CA 3'	۴b	
	5' GGT AGA AAG GAG CTA TAG TTT GGC 3'	Common	
۲۴۶	5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA G 3'	۵a	HPA-5
	5' AGA GTC TAC CTG TTT ACT ATC AAA A 3'	۵b	
	5' CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA CA 3'	Common	
۲۲۵	5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CG 3'	۱۵a	HPA-15
	5' TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT CT 3'	۱۵b	
	5' ATG AAC CTT ATG ATG ACC TAT TC 3'	Common	

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 HGH که به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش لحاظ شدند، طوری محاسبه گردید که کمتر از آغازگرهای اصلی باشند و در هنگام تکثیر رقابتی ایجاد نکنند و در نتیجه وجود باند کنترل داخلی مؤید صحت روند آزمایش و مواد مورد استفاده بود. باندهای مربوط به آللها با استفاده از سایز مارکر و مقایسه آن با باند موجود در هر ردیف تشخیص داده شدند (جدول ۱). نتایج حاصله یادداشت شده و سپس وفور موارد مشاهده شده با موارد قابل انتظار با قانون هاردی وینبرگ و با استفاده از آزمون آماری کای دو 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 آلی

(TC135) انجام گرفت. چرخه انجام PCR برای تکثیر به شرح زیر بود:

پس از یک دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد برای فعال شدن، چرخه آمپلیفیکاسیون در ۳ مرحله در نظر گرفته شد. مرحله اول ۵ چرخه شامل: ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم ۲۰ چرخه شامل: ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم ۱۵ چرخه شامل: ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. واکنش در پایان با مرحله الونگیشن (Elongation) شامل ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی گراد 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 شده و باندهای حاصله با

موارد هموزیگوت و هتروزیگوت در محاسبه‌گر خودکار هاردی وینبرگ (بر اساس معادله $a^2 + b^2 + 2ab = 1$)، و فور 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 SPSS ۱۹ استفاده شد. $p < 0/05$ بیانگر تفاوت معنادار بود. در صورت فقدان باند تنها در حالتی جواب را منفی و به عنوان عدم حضور آل‌تلقی کردیم که تکثیر ژن کنترل (HGH) صورت گرفته و بانندی به اندازه ۴۲۹ bp در الکتروفورز مشاهده شد.

بررسی آنتی‌بادی‌های پلاکتی:

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 (لورن) گروه‌بندی گردید. این لوله با نیروی ۲۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ خون کامل به سه قسمت تبدیل شد. قسمت ته لوله حاوی RBC، قسمت میانی بافی‌کوت و قسمت رویی حاوی پلاسما و پلاکت بود که به آن پلاسما غنی از پلاکت (Platelet Rich Plasma، PRP) گفته می‌شود. در این مرحله با سمپلر و به آرامی PRP را از لوله جدا کرده و در یک لوله مجزا ریخته شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از آن با دستگاه سل کانتار شمارش گردید و در نهایت تعداد کل پلاکت در هر میلی‌لیتر از PRP مورد نظر محاسبه گردید و به نحوی رقیق‌سازی انجام شد که سوسپانسیون پلاکتی با تعداد 10×10^5 pL/mL از افراد با گروه خون O تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از Pooled PRP مذکور را در لوله فلوسیتومتری ریخته و ۵۰ میکرولیتر از سرم بیمار را به آن افزودیم. در لوله کنترل فقط سوسپانسیون و بافر به جای سرم بیمار در لوله جداگانه اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از طی زمان انکوباسیون، سوسپانسیون ۳ مرتبه با (PBS; phos) (phate buffered saline) (نیروی ۲۰۰۰g و زمان ۱۰ دقیقه) شست و شو داده شد. پس از آخرین مرحله شست و شو، به رسوب زیرین از آنتی‌هیومن گلوبولین کونژوگه با

FITC (داکو) اضافه گردید. آنتی‌سرم مذکور در غلظت نهایی ۱/۳۰ با PBS رقیق شده و به لوله واکنش ۵۰ میکرولیتر اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در محیط آزمایشگاه انکوبه گردید. سپس یک بار با محلول شستشو PBS، ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و مابقی برای تجزیه و تحلیل به دستگاه فلوسیتومتری داده شد و تا ۱۰۰۰۰ event قرائت شد (۱۵). روش فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه-partec cyFlow انجام شد و توسط نرم‌افزار فلومکس تجزیه و تحلیل گردید. در روش فلوسیتومتری در هر ران کاری یک نمونه کنترل مثبت (حاوی Daco Anti-HLA Positive Contorol + پولد پلاکتی) و یک نمونه کنترل منفی (حاوی PBS + پولد پلاکتی) و ایزوتایپ کنترل (حاوی Daco Isotype Control + پولد پلاکتی) به عنوان کنترل استفاده شدند. برای تنظیم نمودارها و ولتاژ دستگاه و شروع خوانش، ابتدا لوله حاوی ایزوتایپ کنترل به دستگاه فلوسیتومتری داده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی در ۶۰ بیمار در دو گروه شامل ۳۰ نفر در گروه بیماران دارای اختلالات هماتوانکولوژیک (بدون مقاومت پلاکتی) و ۳۰ نفر در گروه بیماران تالاسمی ماژور به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

در گروه بیماران هماتوانکولوژیک از ۳۰ بیمار با تزریق خون مکرر (مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی تهران) با میانگین سنی $4/1 \pm 30/10$ سال و محدوده سنی ۴۷-۱۰ سال، شامل ۱۶ (۵۳/۳٪) زن و ۱۴ (۴۶/۶٪) مرد و با شمارش پلاکتی یک ساعت پس از تزریق در محدوده $150,000 - 450,000/\mu L$ ، ۲۵ نفر (۸۳/۴٪) مبتلا به AML، ۳ نفر (۱۰٪) مبتلا به ALL، ۱ نفر (۳/۳٪) مبتلا به سندرم میلودیسپلازی و انفر (۳/۳٪) نیز مبتلا به هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه بودند. در این بیماران فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و وفور آللی آنتی‌ژن‌های پلاکتی به دست آمد (جدول ۲).

ارزش p محاسبه شده برای وفور ژنوتیپی آنتی‌ژن‌های

نتیجه مثبت و اگر کمتر از ۱۰/۴٪ بود منفی تلقی شدند. در کل نتایج PIFT برای ۹ نفر (۳۰٪) شامل ۴ زن و ۵ مرد در این گروه مثبت (بالای ۱۰/۴٪) شدند که ۵ نفر از این بیماران دچار AML؛ ۳ نفر از این بیماران دچار ALL؛ و یک نفر نیز مبتلا به PNH بودند.

در گروه بیماران تالاسمی نیز تعداد ۳۰ بیمار با میانگین سنی ۱۰/۴ ± ۳۶/۴ سال و محدوده سنی ۶۸-۲۱ سال شامل ۱۷ (۵۶/۶٪) زن و ۱۳ (۴۳/۳٪) مرد از مراجعین مرکز تالاسمی ظفر با مشارکت همکار طرح انتخاب شده و مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران منتخب سابقه عوارض همولیتیک تزریق خون نداشتند. این بیماران سال‌ها فرآورده گلبول قرمز متراکم (و در سال‌های اخیر از نوع کم لکوسیت عمدتاً prestorage) دریافت کرده بودند. فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و فراوانی آلی آنتی‌ژن‌های مختلف پلاکتی در این بیماران به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و فراوانی آلی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور

فراوانی آلی	HPA Alleles	درصد	تعداد	HPA Genotypes
۰/۹۷	HPA-1a	۹۳/۳	۲۸	HPA-1a/1a
۰/۰۳	HPA-1b	۶/۷	۲	HPA-1a/1b
		-	-	HPA-1b/1b
۰/۸۵	HPA-2a	۷۰	۲۱	HPA-2a/2a
۰/۱۵	HPA-2b	۳۰	۹	HPA-2a/2b
		-	-	HPA-2b/2b
۰/۶۳	HPA-3a	۳۶/۷	۱۱	HPA-3a/3a
۰/۳۷	HPA-3b	۵۳/۳	۱۶	HPA-3a/3b
		۱۰	۳	HPA-3b/3b
۱	HPA-4a	۱۰۰	۳۰	HPA-4a/4a
۰	HPA-4b	-	-	HPA-4a/4b
		-	-	HPA-4b/4b
۱	HPA-5a	۸۰	۲۴	HPA-5a/5a
۰	HPA-5b	۲۰	۶	HPA-5a/5ba
		-	-	HPA-5b/5b
۰/۴۸	HPA-15a	۲۳/۳	۷	HPA-15a/15a
۰/۵۲	HPA-15b	۵۰	۱۵	HPA-15a/15b
		۲۶/۷	۸	HPA-15b/15b

جدول ۲: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپی و فراوانی آلی آنتی ژن‌های پلاکتی در بیماران با اختلال هماتولوژیک (بدون مقاومت پلاکتی)

فراوانی آلی	آل‌های HPA	درصد	تعداد	ژنوتیپ‌های HPA
۰/۹۵	HPA-1a	۹۰	۲۷	HPA-1a/1a
۰/۰۵	HPA-1b	۱۰	۳	HPA-1a/1b
		-	-	HPA-1b/1b
۰/۸۷	HPA-2a	۷۳/۳	۲۲	HPA-2a/2a
۰/۱۳	HPA-2b	۲۶/۷	۸	HPA-2a/2b
		-	-	HPA-2b/2b
۰/۵۲	HPA-3a	۲۳/۳	۷	HPA-3a/3a
۰/۴۸	HPA-3b	۵۶/۷	۱۷	HPA-3a/3b
		۲۰	۶	HPA-3b/3b
۱	HPA-4a	۱۰۰	۳۰	HPA-4a/4a
۰	HPA-4b	-	-	HPA-4a/4b
		-	-	HPA-4b/4b
۰/۹۲	HPA-5a	۸۳/۳	۲۵	HPA-5a/5a
۰/۰۸	HPA-5b	۲۶/۷	۵	HPA-5a/5ba
		-	-	HPA-5b/5b
۰/۵۵	HPA-15a	۲۶/۷	۸	HPA-15a/15a
۰/۴۵	HPA-15b	۷/۵۶	۱۷	HPA-15a/15b
		۱۶/۶	۵	HPA-15b/15b

مختلف در محدوده $p > 0/98$ نشان داد که فراوانی آلی در این بیماران مطابق قانون هاردی واینبرگ قابل محاسبه است که در ستون اول جدول ۲ از سمت راست نمایش داده شده است. در این گروه وفور آلل a برای آنتی‌ژن‌های 15-، 5-، 4-، 3-، 2-، 1- HPA از وفور آلل b، بیشتر به دست آمد. هم‌چنین موردی از آلل HPA-4b و نیز موردی از هموزیگوت bb برای آنتی‌ژن‌های 15-، 2-، 1- HPA در این گروه مشاهده نشد.

در بررسی آنتی‌بادی‌های پلاکتی به روش PIFT در بیماران این گروه، شدت فلورسنت قرائت شده در روش فلوسیتومتری برای ۳۰ نمونه، در محدوده ۴۶/۳۰-۰/۱٪ متغیر بود که برای آن میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. برای تعیین cut off اگر درصد قرائت شده شدت فلورسنت برای فرد از $M + 2SD$ شدت فلورسنت (MF) قرائت شده (عدد ۱۰/۴٪ به دست آمده در مطالعه ما)، بزرگتر شد،

جدول ۴: وفور ژنوتیپی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در دو گروه بیماران مورد بررسی

p value	بیماران بتا تالاسمی		بیماران هماتوانکولوژیک		HPA Genotypes
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۰/۴	۹۰	۲۷	۹۳/۳	۲۸	HPA-1a/1a
۰/۴	۱۰	۳	۶/۷	۲	HPA-1a/1b
-	-	-	-	-	HPA-1b/1b
۰/۷۷	۷۰	۲۱	۷۳/۳	۲۲	HPA-2a/2a
۰/۷۷	۳۰	۹	۲۶/۷	۸	HPA-2a/2b
-	-	-	-	-	HPA-2b/2b
۰/۲۶	۳۶/۷	۱۱	۲۳/۳	۷	HPA-3a/3a
۰/۷۹	۵۳/۳	۱۶	۵۶/۷	۱۷	HPA-3a/3b
۰/۲۸	۱۰	۳	۲۰	۶	HPA-3b/3b
-	۱۰۰	۳۰	۱۰۰	۳۰	HPA-4a/4a
-	-	-	-	-	HPA-4a/4b
-	-	-	-	-	HPA-4b/4b
۰/۵۵	۸۰	۲۴	۸۳/۳	۲۵	HPA-5a/5a
۰/۵۵	۲۰	۶	۱۶/۷	۵	HPA-5a/5b
-	-	-	-	-	HPA-5b/5b
۰/۷۴	۲۳/۳	۷	۲۶/۷	۸	HPA-15a/15a
۰/۶	۵۰	۱۵	۵۶/۷	۱۷	HPA-15a/15b
۰/۳۵	۲۶/۷	۸	۱۶/۶	۵	HPA-15b/15b

آلی برای HPAs در این بیماران مطابق قانون هاردی واینبرگ قابل محاسبه است که در ستون اول از سمت راست جدول ۳ نمایش داده شده است.

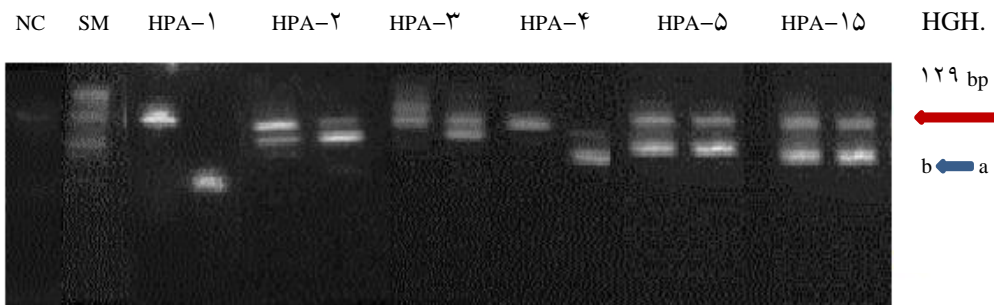
در بررسی آنتی‌بادی‌های پلاکتی به روش PIFT در این گروه شدت فلورسنت قرائت شده در روش فلوسیتومتری برای ۳۰ نمونه بیمار مبتلا به تالاسمی مورد بررسی در این مطالعه، در ۲۹ نمونه در محدوده ۳/۶۰-۱۰/۱٪ متغیر و منفی بود و فقط در یک مورد (۳/۳٪) بیمار خانم ۵۷/۸۵٪ قرائت شد که با توجه به این که بیش از ۱۰/۴٪ بود، مثبت در نظر گرفته شد.

در مقایسه وفور ژنوتیپی آنتی‌ژن‌ها و فراوانی آنتی‌بادی‌ها در دو گروه بیماران مورد بررسی در این مطالعه دیده شد که وفور ژنوتیپی همه آنتی‌ژن‌های پلاکتی بین بیماران تالاسمی و بیماران هماتوانکولوژیک یکسان است و این دو گروه از این لحاظ اختلاف معناداری ندارند. همچنین آلل HPA-4b در هیچ یک از بیماران در مطالعه مشاهده نشد (جدول ۴).

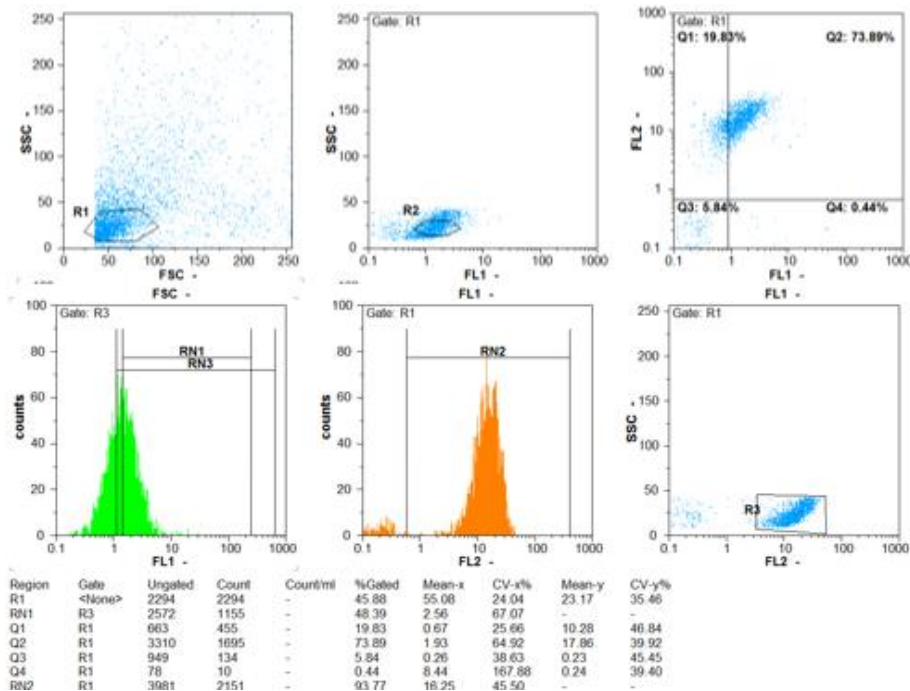
نتیجه PIFT در ۱۰ نفر از کل بیماران شامل ۴ زن و ۵ مرد از بیماران با اختلالات هماتوانکولوژی و یک زن مبتلا به تالاسمی مثبت شد. فراوانی موارد مثبت این آنتی‌بادی‌ها بین گروه بیماران هماتوانکولوژیک آشکارا و به طور معناداری بیشتر از گروه تالاسمی بود (p=۰/۰۰۶).

نتایج قرائت شده ژل الکتروفورز PCR یک بیمار و یک نمونه نمودار سیتوگرام مثبت فلوسیتومتری نیز نشان داده شد (شکل‌های ۱ و ۲).

ارزش p محاسبه شده برای وفور ژنوتیپی آنتی‌ژن‌های مختلف در محدوده ۰/۰۹۲ < p < ۰/۸۳ نشان داد که فراوانی



شکل ۱: باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن‌های مختلف HPAs در یکی از بیماران. در این شکل طول باند HPA-1:90 bp / HPA-2:258 bp / HPA-3: 367 bp / HPA-4:126 bp / HPA-5:250 bp / HPA-15:225 bp است و NC در چاهک اول کنترل منفی می‌باشد.



شکل ۲: نمودار سینتوگرام یک بیمار مثبت از نظر وجود آنتی‌بادی‌های پلاکتی توسط آزمایش PIFT. نمودار SSC/FSC (R1 gate) میزان سلول‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. نمودار count/FL2 (RN2 gate) میزان سلول‌های CD41 مثبت (پلاکت‌ها) و نمودار count/FL1 (RN1 gate) میزان پلاکت‌های مثبت از نظر آنتی‌بادی‌های پلاکتی را نشان می‌دهد، (RN1 = ۴۸/۳۹ می‌باشد).

بحث

به دست آمد.

هیچ موردی از HPA-4b در این مطالعه دیده نشد. در مقایسه وفور آلی آنتی‌ژن‌های پلاکتی بین این دو گروه، اختلاف معناداری بین وفور ژنوتیپی و آلی آنتی‌ژن‌های HPA-1,2,3,4,5,15 آن‌ها مشاهده نشد. طبق نتایج حاصله در بررسی فراوانی آنتی‌ژن‌های پلاکتی بین این دو گروه بیمار، به نظر می‌رسد بیشترین میزان هموزیگوسیتی به ترتیب مربوط به آنتی‌ژن‌های HPA-4a/4a با فراوانی ۱۰۰٪ و HPA-1a/1a با فراوانی ۹۷٪ و HPA-5a/5a با فراوانی ۹۲٪ باشد. در مقابل کمترین میزان هموزیگوسیتی در HPA-4b/4b و HPA-1b/1b و به ترتیب با فراوانی صفر و ۳٪ مشاهده شد. از سوی دیگر بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به آنتی‌ژن HPA-3 با میزان ۵۶٪ و سپس آنتی‌ژن HPA-15 با فراوانی ۵۰٪ و کمترین میزان هتروزیگوسیتی در این بیماران مربوط به آنتی‌ژن HPA-2 با درصد فراوانی ۳۶٪ بود.

در این مطالعه آنتی‌ژن‌های پلاکتی به روش مولکولی PCR-SSP و آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های پلاکتی به روش فلو PIFT در ۶۰ بیمار با تزریق خون مکرر شامل ۳۰ بیمار هماتوانکولوژی بدون مقاومت پلاکتی و ۳۰ تالاسمی ماژور بررسی شدند. وفور آلی آنتی‌ژن‌های پلاکتی در بیماران دارای اختلالات هماتوانکولوژی بدون مقاومت پلاکتی به صورت: HPA-2a (۰/۸۷)، HPA-1b (۰/۰۵)، HPA-1a (۰/۹۵)، HPA-3b (۰/۴۸)، HPA-3a (۰/۵۲)، HPA-2b (۰/۱۳)، HPA-5b (۰/۰۸)، HPA-5a (۰/۹۲)، HPA-4a (۱/۰)، HPA-15b (۰/۴۵) و HPA-15a (۰/۵۵) و در بیماران تالاسمی ماژور به صورت: HPA-2a (۰/۸۵)، HPA-1b (۰/۰۳)، HPA-1a (۰/۹۷)، HPA-3b (۰/۳۷)، HPA-3a (۰/۶۳)، HPA-2b (۰/۱۵)، HPA-4a (۱/۰)، HPA-5a (۰/۴۸)، HPA-15a (۰/۴۸) و HPA-15b (۰/۵۲)

وفور آلی آنتی‌ژن‌های مختلف به دست آمده برای آلل a مربوط به HPA-1 در هر دو گروه تالاسمی و بیماران هماتوانکولوژیک فاقد مقاومت پلاکتی گرچه اندکی بیش از این محدوده است اما با وفور آلل‌های آن در اهداکنندگان خون در ایران تفاوت معناداری ندارد. وفور سایر آلل‌ها برای این دو گروه کما بیش در محدوده وفور آلی برای جمعیت اهداکنندگان کشورهای مختلف قرار دارد. گرچه اختلافات فوق با محدوده‌های کلی در جمعیت اهداکنندگان مختلف مشاهده شدند اما این موارد معنادار نبودند. در جمعیت‌های مختلف وفور آلل b برای HPA-15 در مقایسه با آلل a این آنتی‌ژن بیشتر است که در مورد مطالعه ما نیز چنین بود (۲۰).

وفور ژنوتیپی و آلی بین دو گروه بیماران مورد بررسی در این مطالعه با اهداکنندگان خون ایرانی در مطالعه مدنی و همکاران مقایسه شد (۱۷) (جدول ۵).

در مقایسه وفور آلی آنتی‌ژن‌های مختلف پلاکتی بین بیماران مبتلا به تالاسمی با اهداکنندگان خون در ایران (با $p=0/002$) و بیماران هماتوانکولوژی بدون مقاومت پلاکتی با اهداکنندگان (با $p=0/001$)، مشخص شد که فقط وفور آلل‌های a و b برای HPA-2 در هر دو گروه با اهداکنندگان تفاوت معناداری دارند و در سایر موارد بین این بیماران و اهداکنندگان ایرانی خون، مشابهت وجود دارد. به بیان دیگر وفور آلی برای HPA-2a/2b بین اهداکنندگان برای آلل‌های 2a و 2b به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶ و در بیماران تالاسمی ۰/۸۵ و ۰/۱۵ و در بیماران فاقد مقاومت پلاکتی ۰/۸۷ و ۰/۱۳، بیانگر وفور بیشتر آلل b در بین اهداکنندگان و وفور کمتر آن در بیماران این مطالعه می‌باشد و این امر شاید بتواند مطرح‌کننده احتمال آلوایمونیزاسیون بیشتر علیه این آلل باشد که اثبات آن البته نیاز به بررسی‌ها و مطالعه‌های بیشتر دارد.

از سوی دیگر نتایج این تحقیق، حضور آنتی‌بادی‌های ضد HPA در بیماران تالاسمی ماژور و بیماران هماتوانکولوژیک بدون مقاومت پلاکتی که در طی درمان فرآورده گلبول قرمز متراکم و یا پلاکت دریافت نموده بودند را به ترتیب در ۳۳٪ (۱ نفر) و ۳۰٪ (۹ نفر) بیماران

میزان فراوانی ژنی HPA-1 در این مطالعه با مطالعه نوذری در سال ۲۰۱۹ و مدنی در سال ۲۰۰۷ که هر دو بر روی اهداکنندگان خون انجام شده مشابهت داشته و بین این دو مطالعه و مطالعه حاضر اختلاف معناداری مشاهده نشد (۱۷، ۱۶). در مطالعه مستخدمین که در سال ۲۰۱۹ بر روی بیماران هماتوانکولوژی دارای مقاومت پلاکتی صورت گرفت، فراوانی آلل a برای HPA-1,3,4,5 و آلل b برای HPA-2,15 در جمعیت مورد مطالعه بیشتر به دست آمد که این یافته‌ها به جز در مورد HPA-2، با مطالعه حاضر مشابهت داشتند. هم‌چنین در مطالعه مستخدمین هیچ موردی از HPA-4b و HPA-5b در بیماران دیده نشد که در خصوص HPA-4b با مطالعه ما مشابهت دارد. از سوی دیگر آنتی‌بادی ضد HPA در ۴٪ بیماران مقاومت پلاکتی ردیابی شد (۱۸)، در حالی که در مطالعه حاضر در ۳۳٪ بیماران تالاسمی و ۳۰٪ بیماران هماتوانکولوژی بدون مقاومت پلاکتی موفق به ردیابی این آنتی‌بادی‌ها شدیم.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۵ توسط هالی در آفریقای مرکزی انجام گرفته بود، درصد فراوانی آنتی‌ژن HPA-1a ۱۰۰٪ گزارش شده و هیچ موردی از آنتی‌ژن 1b یافت نشده که این تفاوت اندک با نتایج حاصل از فراوانی این آنتی‌ژن در مطالعه ما احتمالاً به دلیل حجم کم نمونه در این مطالعه است و اختلاف معناداری با هم ندارند (۱۹).

مدنی در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ فراوانی آنتی‌ژن‌های پلاکتی و وفور آلی و محدوده وفور آنتی‌ژن‌های پلاکتی در اهداکنندگان خون (افراد سالم) در کشورهای مختلف شامل انگلستان، چین، ژاپن، بحرین، اسپانیا، فنلاند، اتریش، کره، آمریکا، عربستان، تایلند و هم‌چنین ایران را بررسی کرد (۱۷).

در مقایسه وفور آلی بیماران مطالعه حاضر با محدوده‌های وفور آلل‌های آنتی‌ژن‌های پلاکتی در جمعیت‌های مختلف اهداکنندگان (افراد سالم) در جهان، مشخص شد که فراوانی به دست آمده در بیماران این مطالعه برای آلل a مربوط به HPA-2, 15، اندکی کمتر از محدوده فوق و وفور آلل HLA-15b اندکی بیشتر از محدوده فوق است اما این اختلاف‌ها معنادار نمی‌باشند.

جدول ۵: مقایسه وفور ژنوتیپی و آلی بین بیماران این مطالعه با اهداکنندگان خون در ایران (۲۱)

فرآوانی نسبی ژنوتیپ در اهداکنندگان خون (n= ۱۰۰)	فرآوانی نسبی آلی در مطالعه حاضر	فرآوانی نسبی ژنوتیپ در بیماران بدون مقاومت پلاکتی	فرآوانی نسبی ژنوتیپ در بیماران تالاسمی	فرآوانی نسبی		HPA Genotypes
				فرآوانی آلی اهداکنندگان خون	فرآوانی آلی بیماران بدون مقاومت پلاکتی	
۹۶	HPA-1a	۰/۸	۰/۹۸	۹۰	۰/۹۵	1a/HPA-1a
۴	HPA-1b	۰/۲	۰/۰۲	۱۰	۰/۰۵	HPA-1a/1b
۰				-		HPA-1b/1b
۸	HPA-2a	۰/۶۸	۰/۵۴	۷۰	۰/۸۷	HPA-2a/2a
۹۲	HP-2b	۰/۳۲	۰/۴۶	۳۰	۰/۱۳	HPA-2a/2b
۰				-		HPA-2b/2b
۱۹	HPA-3a	۰/۶۲	۰/۴۸	۳۶/۷	۰/۵۲	HPA-3a/3a
۵۹	HPA-3b	۰/۳۸	۰/۵۲	۵۳/۳	۰/۴۸	HPA-3a/3b
۲۲				۱۰		HPA-3b/3b
۱۰۰	HPA-4a	۱	۱	۱۰۰	۱	HPA-4a/4a
۰	HPA-4b	۰	۰	-	۰	HPA-4a/4b
۰				-		HPA-4b/4b
۹۸	HPA-5a	۰/۹۵	۰/۹۹	۸۰	۰/۹۲	HPA-5a/5a
۰	HPA-5b	۰/۰۵	۰/۰۱	۲۰	۰/۰۸	HPA-5a/5ba
۲				-		HPA-5b/5b
۱۴	HPA-15a	۰/۴۲	۰/۴۷	۲۳/۳	۰/۵۵	HPA-15a/15a
۱۹	HPA-15b	۰/۵۸	۰/۵۳	۵۰	۰/۴۵	HPA-15a/15b
۶۷				۲۶/۷		HPA-15b/15b

باشد که متعاقب تزریق گلبول قرمز متراکم در بیماران تالاسمی، علاوه بر آلوایمونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز، آلوایمونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت و HPAs و HLA-I هم به دلیل مقادیر مختصر پلاکت و گلبول سفید موجود در کیسه‌های خون متراکم روی می‌دهد.

در مطالعه شایگان که در سال ۲۰۰۴ بر روی ۸۲ بیمار هماتوانکولوژی با روش فلوسیتومتری صورت گرفت، ۵۳/۲٪ از بیماران دارای آنتی‌بادی ضد HLA-1 و ۴۳/۹٪

نشان داد که نشان‌دهنده میزان بالای حضور آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران هماتوانکولوژیک نسبت به بیماران تالاسمی بود (p= ۰/۰۰۶). با توجه به این که بیماران هماتوانکولوژیک در روند درمان بیشتر فرآورده پلاکتی و بیماران تالاسمی بیشتر فرآورده گلبول قرمز متراکم دریافت می‌کنند، بیشتر بودن فرآوانی آنتی‌بادی‌های پلاکتی در گروه هماتوانکولوژی قابل قبول است. از سویی پیدا شدن آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران تالاسمی که غالباً فرآورده پلاکتی دریافت نمی‌کنند، احتمالاً می‌تواند ناشی از این

موجود در کیسه‌های خون متراکم روی می‌دهد. در مطالعه کومار، بیشترین وفور آنتی‌بادی‌ها مربوط به آنتی‌بادی‌های علیه 5b-، 2b-، 1b- HPA بوده است (۵). از سوی دیگر آنتی‌ژن‌های گروه فرعی (Bennet-Goodspeed (Bg antigen) در سطح گلبول‌های قرمز، از نظر ساختاری با HLA-1 شباهت دارند، لذا خود گلبول قرمز می‌تواند متهم اولیه برای آلوایمونیزاسیون علیه این آنتی‌ژن‌ها محسوب شود. این آنتی‌بادی‌ها با کاهش بقای گلبول‌های قرمز و همولیز گلبول‌های تزریقی، می‌توانند واکنش‌های همولیتیک تأخیری را ایجاد نمایند (۲۳). در مطالعه‌ای که تازاری در سال ۲۰۰۸ انجام داد و حضور آنتی‌بادی‌های ضد HPAs را در ۱۰ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور به روش (monoclonal antibody immobilized platelet antigen (MAIPA) بررسی کرد، حضور آنتی‌بادی بر ضد آل‌های a و b مربوط به HPA-2 در ۲ بیمار تالاسمی مشخص شد که نتیجه از لحاظ ردیابی آنتی‌بادی‌ها با نتایج مطالعه حاضر دارای مشابهت است. فرضیه احتمالی دیگری که برای تولید آنتی‌بادی در مطالعه تازاری مطرح شده آن است که HPA-2 (که بر روی CD2 قرار دارد) در این گروه بیماران احتمالاً ایمنوژن‌تر از HPA-1،-3 (که بر روی کمپلکس CD41/61 قرار دارد) می‌باشد (۲۳).

نتیجه‌گیری

در مقایسه وفور آللی کل بیماران در مطالعه حاضر با محدوده‌های وفور آل‌های آنتی‌ژن‌های پلاکتی در جمعیت‌های مختلف اهداکنندگان در جهان، مشخص شد که فراوانی به دست آمده در کل بیماران برای آل a مربوط به 15-، HPA-2 اندکی کمتر از محدوده فوق و وفور آل HLA-15b اندکی بیشتر از محدوده فوق است اما این اختلافات معنادار نیستند.

با توجه به فراوانی ۱۰۰ درصدی آل HPA-4a و فقدان آل HPA-4b و عدم مشاهده ژنوتیپ هموزیگوت b/b آل‌های HPA-1/-2/-5 در بیماران این مطالعه، احتمال وقوع آلوایمونیزاسیون پلاکتی ناشی از آنتی‌بادی‌های ضد این آنتی‌ژن‌ها در بیماران با تزریق خون مکرر کمتر است. البته انجام مطالعه‌های بیشتر با حجم نمونه بیشتر بر روی

دارای آنتی‌بادی ضد HPA بودند که همانند مطالعه ما نشان از وفور بالای آلوایمونیزاسیون پلاکتی در این بیماران دارد (۴).

در مطالعه فریرا از برزیل در سال ۲۰۱۱ در ۱۶ بیمار هماتولوژی بالاتر از ۱۸ سال (شامل ۹ زن و ۷ مرد)، آنتی‌بادی‌های ضد پلاکتی را به روش PIFT و آنتی‌بادی‌های HLA-I را به روش پانل راکتیو با کیت آماده به روش فلوسیتومتتری بررسی کردند. ۵ بیمار مبتلا به AML، ۲ نفر مبتلا به ALL، ۴ نفر مبتلا به هوچکین و ۲ نفر نیز مبتلا به CLL بودند که ۱۱ نفرشان سابقه تزریق خون و فرآورده‌های آن را داشتند. آن‌ها دریافتند ۹ بیمار (۵۶٪) دارای آلوآنتی‌بادی بودند. ۸ نفر (۵۰٪) از بیماران PIFT مثبت شده که ۳ نفرشان (۱۹٪) نیز پانل راکتیو مثبت شدند. اما فقط ۳ نفر از ۹ بیماری که دارای آلوآنتی‌بادی بودند (۳۰٪)، مقاومت پلاکتی داشتند و ۶ نفر از افراد آلوایمونیزه (۷۰٪) فاقد مقاومت پلاکتی بودند (۲۱). به عبارتی حضور آنتی‌بادی‌های پلاکتی الزاماً به معنای مقاومت پلاکتی نمی‌باشد زیرا این آنتی‌بادی‌ها در ۳۰٪ موارد در غیاب علایم بالینی مقاومت پلاکتی، در بیماران وجود دارند (۲۲). یافته‌های این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر که در ۹ بیمار از ۳۰ بیمار هماتولوژی (۳۰٪) که فاقد مقاومت پلاکتی بودند، آنتی‌بادی‌های پلاکتی را پیدا کردند، مشابهت داشت.

در مطالعه کومار در سال ۲۰۱۴ بر روی ۸۰ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور با تزریق خون مکرر، آنتی‌بادی‌های ضد HPAs و HLA به روش الیزا بررسی شدند و مشخص شد که آلوایمونیزاسیون علیه HPAs در ۹ بیمار (۱۱/۲۵٪) و علیه HLA-I در ۲۳ بیمار (۳۰٪) روی داده است و ۵۹٪ بیماران فاقد آلوایمونیزاسیون بودند (۵). در مطالعه حاضر نیز در ۱۱ (۳/۳٪) بیمار تالاسمی ماژور، علی‌رغم عدم دریافت فرآورده پلاکتی، آنتی‌بادی ضد HPA ردیابی شد. توجه این موارد آلوایمونیزاسیون نیز احتمالاً این است که متعاقب تزریق گلبول قرمز متراکم در بیماران تالاسمی علاوه بر آلوایمونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز، آلوایمونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی پلاکت HPAs و HLA-1 هم به دلیل مقادیر مختصر پلاکت و گلبول سفید

فراوانی این آنتی‌ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران در مقطع کارشناسی ارشد و با کد اخلاق IR.TMI.REC.1397.024 مصوب کمیته اخلاق در پژوهش مؤسسه و بخشی از یافته‌های طرح پژوهشی "بررسی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی در بیماران مبتلا

به مقاومت پلاکتی و بیماران با تزریق مکرر خون و فرآورده‌ها" می‌باشد. بدین‌وسیله از آقای دکتر اسمردیس حاجتی مسئول محترم بخش فلوسیتومتری به دلیل کمک‌های بی‌دریغ‌شان در انجام و تنظیم و خوانش نتایج فلوسیتومتری و خانم دکتر آزیتا آذر کیوان و دکتر سعید محمدی و خانم سلطان‌آبادی که در جمع‌آوری نمونه‌های مورد نیاز این پژوهش همکاری صمیمانه‌ای داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

- 1- Brouk H, Bertrand G, Zitouni S, Djenouni A, Martageix C, Griffi F, *et al.* HPA antibodies in Algerian multitransfused patients: Prevalence and involvement in platelet refractoriness. *Transfus Apher Sci* 2015; 52(3): 295-9.
- 2- Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 808-17.
- 3- 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.
- 4- 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]
- 5- Philip J, Kumar S, Chatterjee T, Mallhi RS. Prevalence of Alloimmunization to Human Platelet Antigen Glycoproteins and Human Leucocyte Antigen Class I in beta Thalassemia Major Patients in Western India. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2014; 30(4): 309-12.
- 6- 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.
- 7- Carr R, Hutton JL, Jenkins JA, Lucas GF, Amphlett NW. Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. *Br J Haematol* 1990; 75: 408-13.
- 8- Rosenfeld CS, Bodensteiner DC. Detection of Platelet alloantibodies by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 207-12.
- 9- Fabris F, Soini B, Sartori R, Randi ML, Luzzatto G, Girolami A. Clinical and laboratory factors that effect the post transfusion platelet increment. *Transfus Sci* 2000; 23(1): 63-8.
- 10- Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, Bayo K, Jaeger G, Anani L, *et al.* HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 2005; 65(3): 295-8.
- 11- Sarkar RS, Philip J, Jain N. Detection and Identification of Platelet-Associated Alloantibodies by a Solid-Phase Modified Antigen Capture Elisa (MACE) technique and its correlation to platelet refractoriness in multi platelet concentrate transfused patients. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015; 31(1): 77-84.
- 12- Bianchi J, Azevedo M, Jens E, Nukui Y, Chamone D. 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.
- 13- Kiefel V, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 2001; 41: 766-70.
- 14- 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.
- 15- Bub CB, Martinelli BM, Avelino TM, Gonzalez 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.
- 16- Nozari M, Zadsar M, Shaiegan M, Samiee S. Iranian Turkmen blood donors determining the HPA-1 gene frequency in 1397. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2019; 17(1): 12-9. [Article in Farsi]
- 17- Madani T, Samiee Sh, Attaei Z, Kavari M, Mostkadem 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]
- 18- Mostakhdemin Hosseini M, Samiee S, Shaiegan M,

- Mohammadi S, Jalaiekhoo H, Tabatabaiepanah P, *et al.* Evaluation of platelet antigens and antibodies in patients with platelet refractoriness. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ 2019; 16(2): 91-102. [Article in Farsi]
- 19- Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, Bayo K, Jaeger G, Anani L, *et al.* HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. Tissue Antigens 2005; 65(3): 295-8.
- 20- Kulkarni B, Mohanty D, Ghosh K. Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population. Transfus Med 2005; 15(2): 119-24.
- 21- Ferreira AA, Zulli R, Soares S, Castro Vd, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. Clinics (Sao Paulo) 2011; 66(1): 35-40.
- 22- McPherson ME, Anderson AR, Castillejo MI, Hillyer CD, Bray RA, Gebel HM, *et al.* HLA alloimmunization is associated with RBC antibodies in multiply transfused patients with sickle cell disease. Pediatr Blood Cancer 2010; 54(4): 552-8.
- 23- Tazzari PL, Ricci F, Tassi C, Bontadini A, Fruet F, Conte R. Alloimmunization against human platelet antigen 2 (HPA2) in a series of multi-transfused beta-thalassemia patients. Haematologica 1998; 83(8): 765-6.

Original Article

Platelet antigens and antibodies in multitransfused patients

Ebrahimzadeh E.¹, Alaei M.¹, Samiee Sh.¹, Shaiegan M.¹

¹*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Following incompatible blood transfusions, anti-HLA and anti- HPA antibodies may develop and cause various disorders such as post-transfusion purpura, platelet refractoriness, and thrombocytopenia leading to bleeding. The aim of this study was to investigate platelet antigens and antibodies in multi-transfused patients.

Materials and Methods

In this descriptive study, platelet antigens and presence of platelet antibodies were tested by PCR-SSP and PIFT flowcytometry in 30 Thalassemia major and 30 oncohematologic patients with one hour post transfusion platelet counts in the range of 150000-450000/ μ l. χ^2 test was employed for comparing the results of the study.

Results

Molecular genotyping of HPA-1in thalassemia major patients and patients with oncohematologic disorder in this study revealed that HPA-1a/1a was the most and HPA-1a/1b and HPA-3b/3b were the least frequent genotypes. No homozygous cases of 1b/1b, 2b/2b and 5b/5b were detected. HPA-4b allele was not detected in any patient. Flow PIFT results revealed platelet antibodies in 10(30%) patients with hematologic disorders and 1(3.3%) thalassemia major patients.

Conclusions

According to %100 frequency of HPA-4a and total absence of HPA-4b allele and absence of homozygous b/b genotype for HPA-1/-2/-5 alleles in the patient population of this study, the prevalence of platelet alloimmunization due to antibodies against these antigens seems to be low. Although further studies in the field are necessary.

Key words: Platelets, Antigens, Antibodies, PCR

Received: 7 Oct 2020

Accepted: 15 Dec 2020

Correspondence: Alaei M., MD. Pathologist. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052234; Fax: (+9821) 88628741

E-mail: alaeimastaneh@hotmail.com