

اثر تابش اشعه گاما بر وضعیت متابولیک در فرآورده‌های پلاکتی حاصل از پلاسمای غنی از پلاکت حین نگهداری

فاطمه کیانی نوده^۱، مهران قاسم‌زاده^۲، احترام‌السادات حسینی^۳

چکیده

سابقه و هدف

پروتوئابی کسانتره‌های پلاکتی جهت پیشگیری از بیماری پیوند علیه میزبان ناشی از تزریق خون انجام می‌شود. اما برخی از مطالعه‌ها حاکی از کاهش پاسخ پس از تزریق و تشدید آسیب‌های دوران نگهداری متعاقب پروتوئابی هستند. در این مطالعه، اثر تابش گاما بر وضعیت متابولیک پلاکتی در فرآورده‌های پلاکتی حاصله از پلاسمای غنی از پلاکت حین نگهداری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی با ۱۰ فرآورده پلاکت انجام شد که در هر ۵ نوبت کاری دو فرآورده هم گروه از نظر ABO و Rh مخلوط و در دو کیسه تقسیم شدند. یکی تحت تابش اشعه گاما (۳۰Gy) و دیگری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. غلظت گلوکز و فعالیت LDH به روش رنگ‌سنجی و شمارش پلاکت‌ها و pH به ترتیب با استفاده از Sysmex-K21 و pH متر اندازه‌گیری شد. Swirling پلاکتی مورد ارزیابی چشمی قرار گرفت. داده‌ها با روش آماری کروسکال-والیس و Wilcoxon matched-pairs تجزیه و تحلیل و مقادیر $p < 0/05$ معنادار تلقی شد.

یافته‌ها

حرکت گردابی در هر دو گروه حفظ شد. کاهش معنادار شمارش پلاکت‌ها و مقادیر pH در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در هر گروه بدون تفاوت معنادار مشاهده شد ($p < 0/05$). به علاوه کاهش سطح گلوکز و افزایش فعالیت LDH حین نگهداری مشاهده شد. افزایش فعالیت LDH در پلاکت‌های اشعه دیده در مقایسه با کنترل در روزهای پنجم (168 ± 722 در مقابل 135 ± 536) و هفتم (179 ± 908 در مقابل 125 ± 623) نگهداری معنادار بود (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/01$).

نتیجه‌گیری

کیفیت فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با کنترل با کمترین تغییرات متابولیک حفظ می‌شود.

کلمات کلیدی: اشعه گاما، پلاسمای غنی از پلاکت، بیماری پیوند علیه میزبان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

۱- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD بیوشیمی - فلوشیپ پلاکت و هموستاز - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

تزریق پلاکت به عنوان یک راه کار درمانی استاندارد جهت پیشگیری یا درمان خونریزی در بیماران ترومبوسیتوپنیک و افراد با نقص عملکرد پلاکتی بسیار حائز اهمیت است. اگر چه طول عمر پلاکت ها در گردش خون بین ۸-۱۱ روز است اما ماندگاری آن ها در بانک خون به دلیل افزایش خطر رشد باکتریایی حین نگهداری در دمای اتاق و مجموعه ای از تغییرات مخرب در ساختار و عملکرد پلاکت ها تحت عنوان آسیب دوران نگهداری (PSL: Platelet storage lesion) حدود ۵ روز است (۱-۳). PSL معمولاً با افزایش گلیکولیز و کاهش pH و به موجب آن سازماندهی مجدد اسکلت سلولی و تغییر شکل، اختلال در پاسخ به آگونیست های مختلف پلاکتی، ترشح و تخلیه محتویات گرانول های پلاکت و نمایان شدن شاخص های فعالیت و آپوپتوز پلاکتی شناسایی می شود (۵)، تزریق فرآورده پلاکتی با تغییرات PSL ممکن است موجب بروز واکنش در بیمار، پاکسازی سریع پلاکت ها از گردش خون بیمار، عدم افزایش مورد انتظار تعداد پلاکت (CCI: Corrected platelet count increment) و در نتیجه عدم بهبود عوارض ترومبوسیتوپنی شود که همواره یکی از مشکلات چالش برانگیز میان پزشکان و مراکز تولید فرآورده های خون می باشد (۱). علاوه بر این، مطالعه های بسیاری حاکی از بروز برخی عوارض ناخواسته از قبیل عفونت باکتریایی، مقاومت پلاکتی و بیماری پیوند علیه میزبان (TA-GVHD: Transfusion associated graft versus host disease) متعاقب تزریق پلاکت است (۴). TA-GVHD یک واکنش ایمنی تأخیری نادر اما به شدت کشنده است که به واسطه حمله ایمونولوژیک لنفوسیت های T زنده آلوژنیک متعاقب تزریق پلاکت یا هر فرآورده سلولی حاوی لکوسیت ایجاد می شود (۶). پرتوتابی فرآورده های سلولی با اشعه گاما می تواند از بروز TA-GVHD پیشگیری کند (۷). مطالعه ها حاکی از تأثیر اشعه گاما بر وضعیت متابولیک فعالیت های پلاکتی هستند. اشعه گاما با ایجاد وضعیت نسبتاً استرس زا باعث افزایش گلیکولیز در فرآورده های پلاکتی می شود که در مطالعه های متعدد به صورت کاهش بیشتر سطح گلوکز و افزایش اسیدلاکتیک و

کاهش pH متعاقب آن گزارش شده است (۸-۱۱). هر چند مطالعه های اولیه حاکی از تغییر وضعیت متابولیک و عدم تغییر شاخص های کمی و کیفی کنترل کیفی (شامل شمارش پلاکت، تغییرات pH و حرکت گردابی یا سوارلینگ) در فرآورده های پلاکتی اشعه دیده است اما این مطالعه ها اغلب در فرآورده های پلاکتی تهیه شده به روش آفرزیس و پلاکت اهداکننده رندوم (RDP-PC: Random donor platelet) صورت گرفته است (۸-۱۲). لذا در این مطالعه سعی بر این است به بررسی اثر اشعه گاما بر وضعیت متابولیک در کنسانتره های پلاکتی حاصله از پلاسما غنی از پلاکت (RPR-PC: Platelet-rich plasma-platelet concentrate) حین نگهداری پرداخته شود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، با توجه به تعریف حجم مورد نظر جهت انجام مطالعه های علوم پایه، جمعاً ۱۰ کیسه PRP-PC حاصل از فرآورده خون کامل اهداکنندگان مستمر مورد استفاده قرار گرفت. نمونه گیری از جمعیت طبیعی (اهداکنندگان مستمر با معیارهای پذیرش اهدای خون شامل سن، وزن و فشار خون مناسب و آزمایش های غربالگری منفی) و به صورت تصادفی ساده (Simple Random) انجام شد. در هر نوبت کاری، دو کیسه فرآورده پلاکتی هم گروه مورد استفاده قرار گرفت. قبل از پرتوتابی، دو کیسه پلاکتی با استفاده از دستگاه جوش اتوماتیک (ترمواسترل - ژاپن) مخلوط و پولد گردید. در گام بعدی، فرآورده پولد شده با استفاده از توزین در دو کیسه اولیه به طور مساوی تقسیم شد (سارتوریوس - آلمان) و سپس با استفاده از سیلر اتوماتیک از هم جدا شدند. یکی از دو کیسه پلاکتی، به صورت تصادفی در بخش اشعه پایگاه انتقال خون تهران تحت تابش سزیوم ۱۳۷ (به عنوان منبع اشعه گاما با دوز ۳۰ Gy به مدت تقریباً ۶ دقیقه در دستگاه بایوبیم ۸۰۰۰) قرار گرفت و کیسه دیگر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در نهایت هر دو کیسه اشعه دیده و اشعه ندیده (کنترل) در آریتا تور ۵۰-۴۰ دور در دقیقه و دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. این فرآورده های پلاکتی در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵ و ۷ نگهداری،

از نظر شمارش پلاکت، سطح pH، حرکت گردابی پلاکت‌ها، سطح گلوکز و فعالیت LDH مورد مطالعه قرار گرفتند. این عمل در ۵ نوبت کاری مختلف تکرار شد.

معیار ورود و خروج از مطالعه:

کیسه‌های پلاکتی در روز صفر اهدا و هم‌چنین روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ نگهداری قبل از انجام آزمایش‌ها از نظر Clump، Swirling و تجمعات کوچک پلاکتی (Micro-aggregates) مورد ارزیابی چشمی قرار گرفت. کنسانتره‌های پلاکتی دارای حرکت گردابی مناسب و عدم مشاهده clump و micro-aggregates وارد مطالعه و کیسه‌های دارای حرکت گردابی نامناسب و تجمعات کوچک و بزرگ پلاکتی از مطالعه خارج شد. لازم به ذکر است کیسه‌های پلاکتی در روز صفر از نظر شمارش پلاکت، ارزیابی شد و کیسه‌های دارای شمارش قابل قبول یعنی 5×10^9 /Bag وارد مطالعه شد. هم‌چنین، در صورت مثبت شدن نتیجه رنگ‌آمیزی گرم در روز هفتم نگهداری نتایج تجزیه و تحلیل آن کیسه از مطالعه حذف می‌شد.

بررسی شاخص‌های کمی و کیفی کنترل کیفیت فرآورده‌های پلاکتی:

جهت بررسی اثر تابش اشعه گاما بر پارامترهای کنترل کیفی از شمارش پلاکت، pH و پدیده حرکت گردابی فرآورده‌های پلاکتی استفاده گردید. شمارش پلاکت‌ها با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی sysmex-K21 مورد ارزیابی قرار گرفت. pH با استفاده از دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. حرکت دورانی و گردابی پلاکت‌ها (Swirling پلاکتی) به صورت چشمی در مقابل نور مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس سیستم امتیازدهی Singh به صورت زیر نمره‌دهی شد.

۰: مشاهده کدورت یکنواخت و هموژن که با فشار دست تغییر نمی‌کند.

۱: مشاهده حرکت گردابی یکنواخت تنها در برخی از بخش‌های کیسه مشاهده که واضح نیست.

۲: مشاهده حرکت گردابی یکنواخت در تمام بخش‌های

فرآورده پلاکتی

۳: مشاهده حرکت گردابی بسیار واضح در تمام بخش‌های فرآورده پلاکتی (۱۳)

بررسی وضعیت متابولیک به واسطه اندازه‌گیری مقادیر گلوکز و لاکتات دهیدروژناز:

تغییرات متابولیک به واسطه اندازه‌گیری سطح گلوکز و لاکتات دهیدروژناز با استفاده از اتوآنالیزور بیوشیمی Mindray (BS-300) براساس دستورالعمل‌های سازنده کیت ارزیابی شد. در اندازه‌گیری گلوکز با افزودن معرف گلوکز اکسیداز، گلوکز به اسیدگلوکونیک اکسید شده و H_2O_2 شکل می‌گیرد. در ادامه H_2O_2 در حضور کروموژن ۴-آمینوفناتیازون (4-AP: 4-aminophenazone) و پراکسیداز به کوئینون (Quinone) تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت گلوکز در نمونه بوده و در طول موج ۵۴۶ نانومتر خوانده می‌شود. آنزیم LDH، پیرووات را به لاکتات تبدیل می‌کند که در این واکنش $NADH$ به NAD^+ اکسید می‌شود. سرعت کاهش $NADH$ مستقیماً با فعالیت LDH متناسب است و به وسیله تغییر جذب نوری در طول موج ۳۴۰nm در نتیجه تبدیل $NADH$ به NAD^+ سنجیده می‌شود.



برای اندازه‌گیری سطح گلوکز (روش گلوکواکسیداز) و فعالیت لاکتات دهیدروژناز (روش پیرووات-لاکتات)، ابتدا پلاکت‌های هر دو گروه در شرایط کاملاً استریل به میزان ۱/۵ mL جمع‌آوری شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز و نگهداری شد. برای انجام آزمایش، ابتدا نمونه‌ها دفریز و سپس حجم مشخصی از نمونه‌های هر دو گروه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با معرف موجود در کیت در داخل دستگاه اتوآنالیزور Mindray-BS3000 مجاور شد و سپس میزان جذب نوری به ترتیب در طول موج ۵۴۶ (گلوکز) و ۳۴۰ نانومتر (LDH) خوانده شد.

یافته‌ها

اثر تابش اشعه گاما بر پارامترهای کمی و کیفی کنترل کیفی (شمارش پلاکت، pH و حرکت گردابی):

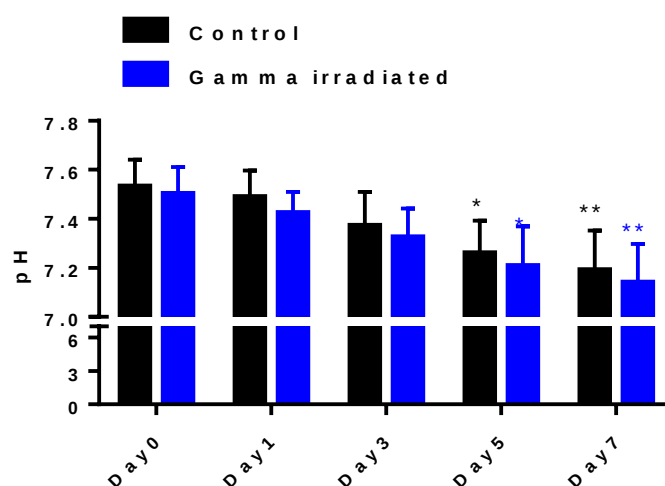
جهت بررسی اثر اشعه گاما بر شمارش پلاکت حین نگهداری، سلول‌های هر دو گروه اشعه دیده و ندیده در شرایط کاملاً استریل جمع‌آوری شد و شمارش توسط دستگاه خودکار شمارشگر سلولی انجام گرفت. شمارش پلاکت‌ها در هر دو گروه فرآورده پلاکتی اشعه دیده و ندیده (کنترل) حین نگهداری به تدریج کاهش یافته است (جدول ۱). کاهش تعداد پلاکت در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در مقایسه با روز صفر در هر دو گروه معنادار

بود ($p < 0.05$) اما تفاوت معناداری بین دو گروه قابل مشاهده نبود و شمارش پلاکت در محدوده الزامات کنترل کیفی فرآورده‌های پلاکتی سازمان انتقال خون ایران بود (حداقل 5×10^9 /bag به ازای هر واحد) (۱۴). علاوه بر این، مقادیر pH نیز به میزان خفیفی در هر گروه از فرآورده‌های پلاکتی حین نگهداری به تدریج کاهش یافته است اما اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد و مقادیر آن در محدوده الزامات کنترل کیفی ($pH \geq 6.2$) بود (نمودار ۱) (۱۵). مقادیر مربوط به میانگین و انحراف معیار آزمایش اندازه‌گیری مقادیر pH در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین شمارش پلاکت در نمونه‌های اشعه دیده و ندیده (کنترل) حین نگهداری ($n = 5$)

پلاکت	اشعه ندیده (کنترل)						اشعه دیده					
	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری
میانگین ($\times 10^6$ / mL)	۱۲۰۶	۱۱۴۶	۱۱۲۱	۱۰۵۹*	۹۸۱*	۱۱۰۳	۱۱۸۴	۱۱۲۷	۱۱۱۴	۱۰۳۲*	۹۲۹*	۸۵۴
انحراف معیار	۱۳۸	۱۵۵	۱۵۸	۱۸۰	۱۷۳	۱۶۱	۱۳۷	۱۴۷	۱۴۹	۱۷۰	۱۹۳	۱۵۹

* $p < 0.05$



نمودار ۱: مقایسه pH بین نمونه‌های اشعه دیده و ندیده (کنترل)

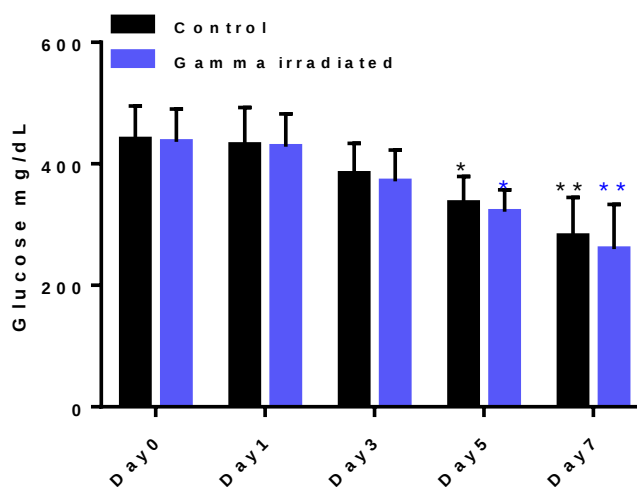
($p < 0.05$:* و $p < 0.01$:**، $n=5$)

نمودار ستونی pH در نمونه‌های اشعه دیده (رنگ آبی) نسبت به نمونه‌های اشعه ندیده (رنگ سیاه) را در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵ و ۷ نگهداری نمایش می‌دهد. ستاره‌های سیاه و آبی رنگ نشان‌دهنده اختلاف آماری در روزهای معین در مقایسه با روز صفر نگهداری است.

جدول ۲: مقادیر pH در نمونه‌های اشعه دیده و ندیده (کنترل) حین نگهداری (n=5)

اشعه ندیده (کنترل)						اشعه دیده					
۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری
۷/۵۳	۷/۵۳	۷/۳۷	۷/۲۶*	۷/۱۹**	۷/۳۷	۷/۵۰	۷/۴۲	۷/۳۲	۷/۲۰*	۷/۱۴**	۷/۳۱
۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۱	۰/۱	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۱	۰/۱	۰/۱۱	۰/۰۹

(p<0/01:** و p<0/05:* n=5)



نمودار ۲: مقایسه غلظت گلوکز بین نمونه‌های اشعه دیده و ندیده (کنترل)

(p<0/01:** و p<0/05:* n=5)

نمودار ستونی غلظت گلوکز در نمونه‌های اشعه دیده (رنگ آبی) نسبت به نمونه‌های اشعه ندیده (رنگ سیاه) را در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵ و ۷ نگهداری نمایش می‌دهد. ستاره‌های سیاه و آبی رنگ نشان دهنده اختلاف آماری در روزهای معین در مقایسه با روز صفر نگهداری است.

(کنترل) توسط دستگاه اتوآنالیزور بیوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت گلوکز در هر دو گروه فرآورده پلاکتی حین نگهداری کاهش یافته است. همان‌طور که در نمودار ۲ مشخص است کاهش غلظت گلوکز در روز پنجم نگهداری در مقایسه با روز صفر در هر دو گروه معنادار است (p<0/05) و در روز هفتم با شدت بیشتری کاهش یافته است (p<0/01). اما کاهش غلظت گلوکز بین دو گروه اشعه دیده و کنترل معنادار نیست. مقادیر مربوط به میانگین و انحراف معیار آزمایش اندازه‌گیری غلظت گلوکز در جدول نشان داده شده است (جدول ۳).

نمودار ۳ حاکی از افزایش فعالیت LDH حین نگهداری در هر دو گروه فرآورده پلاکتی اشعه دیده و ندیده (کنترل)

به منظور بررسی اثر اشعه گاما بر کیفیت پلاکت‌های استحصالی (حرکت گردابی) حین نگهداری، هر دو فرآورده پلاکتی در مقابل نور مورد ارزیابی چشمی قرار گرفت. حرکت گردابی در تمام فرآورده‌های هر دو گروه حین نگهداری حفظ شد (نمره ۳). همچنین، اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشد).

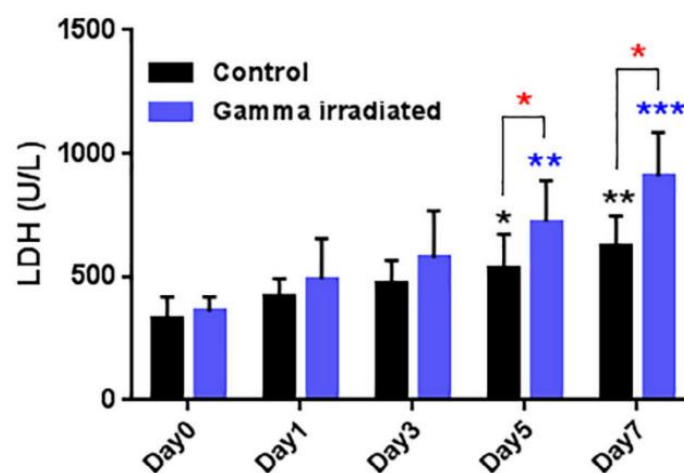
اثر اشعه گاما بر وضعیت متابولیسم پلاکتی حین نگهداری:

به منظور بررسی اثر اشعه گاما بر وضعیت متابولیسم پلاکتی حین نگهداری، تغییرات غلظت گلوکز و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ هر دو گروه فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده

جدول ۳: مقادیر غلظت گلوکز (mg/dL) در فرآورده‌های پلاکتی حین نگهداری (n=۵)

گلوکز	اشعه ندیده (کنترل)						اشعه دیده					
	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری
میانگین	۴۴۰	۴۳۱	۳۸۴	۳۳۶*	۲۸۱**	۳۷۴	۴۳۶	۴۲۸	۳۷۱	۳۲۱*	۲۶۰*	۳۶۳
انحراف معیار	۵۵	۶۱	۵۰	۴۴	۶۴	۵۵	۵۴	۵۴	۵۱	۳۶	۷۳	۵۴

(n=۵، *p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱)



نمودار ۳: مقایسه فعالیت LDH بین نمونه‌های اشعه ندیده و دیده حین نگهداری

جدول ۴: مقادیر فعالیت LDH (U/L) در فرآورده‌های اشعه ندیده و دیده حین نگهداری (n=۵)

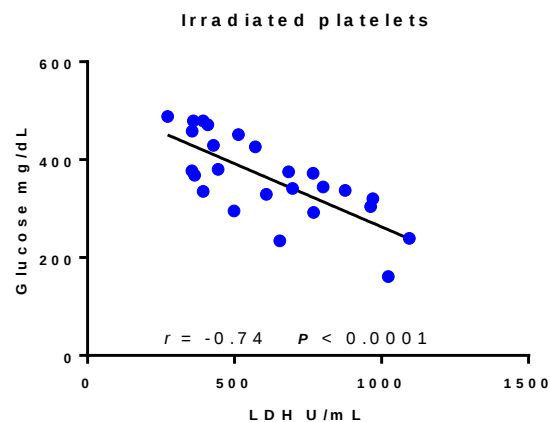
LDH	اشعه ندیده (کنترل)						اشعه دیده					
	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری	۰ روز	۱ روز	۳ روز	۵ روز	۷ روز	حین نگهداری
میانگین	۳۲۹	۴۱۹	۴۷۵	۵۳۶*	۶۲۳**	۴۷۶	۳۵۸	۴۴۸	۵۷۵	۷۲۲**	۹۰۸***	۶۰۲
انحراف معیار	۹۰	۷۲	۹۲	۱۳۵	۱۲۵	۱۰۳	۶۰	۱۶۵	۱۹۱	۱۶۸	۱۷۹	۱۷۲

(n=۵، *p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱)

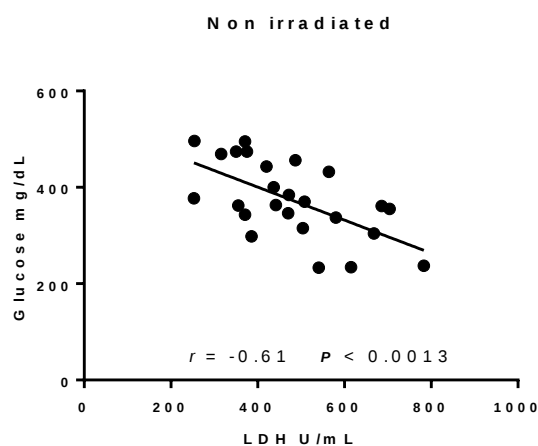
اندازه‌گیری فعالیت LDH در جدول نشان داده شده است (جدول ۴).

نمودار ستونی میزان فعالیت LDH در نمونه‌های اشعه دیده (رنگ آبی) نسبت به نمونه‌های اشعه ندیده (رنگ سیاه) را در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵ و ۷ نگهداری نمایش می‌دهد. ستاره‌های سیاه و آبی رنگ نشان دهنده اختلاف آماری در روزهای مشخص در مقایسه با روز صفر

است. افزایش فعالیت LDH در روز پنجم و هفتم نگهداری در هر دو گروه فرآورده‌های اشعه دیده (به ترتیب، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$) و کنترل (به ترتیب $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$) در مقایسه با روز صفر معنادار است. علاوه بر این، افزایش فعالیت LDH در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با فرآورده‌های اشعه ندیده (کنترل) معنادار است ($p<۰/۰۵$). میانگین و انحراف معیار



نمودار ۵: ارتباط بین سطح گلوکز و فعالیت LDH در نمونه‌های اشعه دیده حین نگهداری



نمودار ۶: ارتباط بین سطح گلوکز و فعالیت LDH در نمونه‌های اشعه ندیده (کنترل) حین نگهداری

و $r = -0.61$ مشاهده شد (نمودار ۶).

بررسی آلودگی میکروبی به روش کشت:

آلودگی باکتریایی سبب فعال شدن پلاکت، تشدید ضایعات PSL و عوارض ناشی از آن می‌گردد. بنابراین جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی و عوارض ناشی از آن می‌بایست در شرایط کاملاً استریل کار نمود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی در مراحل مختلف، فرآورده پلاکتی در روز هفتم در محیط تایوگلیکولات کشت داده شد و به مدت یک

نگهداری است در حالی که ستاره قرمز حاکی از اختلاف آماری بین نمونه‌های اشعه دیده و اشعه ندیده در روزهای مورد نظر است.

در ادامه ارتباط بین سطح گلوکز و فعالیت LDH (Glucose/LDH) طی دوران نگهداری در هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده محاسبه شد. ارتباط معکوسی بین سطح گلوکز و فعالیت LDH در فرآورده اشعه دیده ($r = -0.74$ و $p < 0.0001$) طی دوران نگهداری وجود دارد (نمودار ۵). همچنین ارتباط معکوسی بین سطح گلوکز و فعالیت LDH در فرآورده اشعه ندیده ($p < 0.0013$)

$p < 0/01$ به ترتیب در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در فرآورده اشعه ندیده در مقایسه با $p < 0/01$ و $p < 0/01$ به ترتیب در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در فرآورده اشعه دیده). افزایش فعالیت LDH در فرآورده‌های اشعه دیده بیشتر بود به طوری که این افزایش در روز ۵ و ۷ نگهداری در فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با فرآورده اشعه ندیده معنادار بود ($p < 0/05$).

همانند سلول‌های هسته‌دار، پلاکت‌ها در بدن از طریق دو مسیر گلیکولیز بی‌هوازی (۱۵ درصد) و فسفریلاسیون هوازی (۸۵ درصد) در میتوکندری گلوکز را متابولیزه کرده و انرژی (ATP) مورد نیاز خود را تأمین می‌کنند. اما حین نگهداری در *in vitro*، به دلیل کاهش نسبتاً محدود ذخایر اکسیژن و مواد مغذی درون کیسه، پلاکت‌ها عمده‌تاً از طریق مسیر گلیکولیز بی‌هوازی گلوکز را به اسید لاکتیک متابولیزه کرده و دو مول ATP تولید می‌کنند (۱۶). تجمع اسید لاکتیک و مصرف گلوکز حین نگهداری موجب کاهش نسبی pH در فرآورده‌های پلاکتی می‌شود (۱۱). در مطالعه ما، روند کاهشی مشابهی از سطح گلوکز در هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده حین نگهداری مشاهده شد. کاهش سطح گلوکز در روزهای پنجم و هفتم نگهداری در مقایسه با روز صفر در هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده معنادار بود ($p < 0/05$). شدت کاهش غلظت گلوکز در فرآورده‌های پلاکتی اشعه دیده بیشتر بود که به نظر می‌رسد به دلیل وضعیت استرس متابولیک ناشی از تابش اشعه گاما باشد. اما تفاوت معناداری بین دو گروه مشاهده نشد. این یافته مشابه سایر مطالعه‌ها بود (۸، ۹، ۱۷).

کاهش معنادار سطح گلوکز در روز پنجم نگهداری در فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با فرآورده‌های اشعه ندیده در نتایج ما برخلاف مطالعه مالهی و همکارانش بود (۱۱). کاهش غلظت گلوکز در مطالعه ما و سایر مطالعه‌ها همان طور که پیشتر گفته شد در ارتباط با فعالیت متابولیک پیوسته در سلول است اما علت اختلاف آن با مطالعه مالهی می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد فرآورده‌های پلاکتی مورد مطالعه ما باشد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه حاکی از کاهش سطح pH در هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و

هفته در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مطالعه مورد مثبتی مشاهده نگردید.

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری Graphpad استفاده گردید. برای مقادیر خام هر گروه میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و برای مشخص کردن منشأ تفاوت احتمالی بین نمونه‌ها (روزهای ۰، ۱، ۳، ۵ و ۷) از روش آماری تجزیه و تحلیل کروسکال والیس همراه با Dunn's multiple comparison test استفاده شد. جهت مقایسه مقادیر آزمون‌های مورد نظر بین نمونه‌های اشعه دیده و اشعه ندیده از آزمایش غیرپارامتریک Wilcoxon matched-pairs استفاده شد. در کلیه آنالیزهای آماری مقادیر $p < 0/05$ معنادار تلقی شد.

بحث

مطالعه حاضر به بررسی اثر تابش اشعه گاما بر وضعیت متابولیک پلاکت در کنسانتره‌های پلاکتی PRP-PCs حین نگهداری پرداخته است. بدین منظور تعداد مشخصی از فرآورده‌های پلاکتی در روز صفر نگهداری تحت تابش اشعه گاما قرار گرفت و تاثیر آن بر وضعیت متابولیک در مقایسه با فرآورده اشعه ندیده (کنترل) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. نتایج ما حاکی از عدم تاثیر اشعه گاما بر شاخص‌های کمی (شمارش پلاکت و pH) و کیفی (حرکت گردابی) پلاکت‌ها براساس معیارهای کنترل کیفی فرآورده‌های پلاکتی حین نگهداری بود. در مطالعه حاضر، شمارش پلاکت‌ها و مقادیر pH در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در هر دو گروه به صورت معناداری کاهش یافت ($p < 0/05$) اما تفاوت معناداری بین دو گروه یافت نشد. بررسی پارامترهای مرتبط با متابولیسم پلاکتی، کاهش معنادار غلظت گلوکز در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در هر دو فرآورده پلاکتی را نشان داد بدون اینکه تفاوت معناداری بین فرآورده‌های پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده مشاهده شود. فعالیت لاکتات دهیدروژناز میتوکندریایی در هر دو فرآورده پلاکتی حین نگهداری افزایش یافت بطوریکه این افزایش در روزهای ۵ و ۷ نگهداری در مقایسه با روز صفر در هر دو گروه معنادار بود ($p < 0/05$ و

اشعه ندیده حین نگهداری بود (۱۸). اما مشابه سایر مطالعه‌ها تفاوت معناداری در مقادیر pH بین پلاکت‌های دو گروه مشاهده نشد ضمن آن که سطح pH در محدوده قابل قبول الزامات کنترل کیفی سازمان انتقال خون ایران (بزرگتر یا مساوی ۶/۲) بوده است (۲۱-۱۹، ۱۷، ۹، ۸). افزایش فعالیت متابولیک حین نگهداری هم‌چنین ممکن است موجب کاهش سطح لاکتات دهیدروژناز (LDH) داخل سلولی و یا افزایش سطح این آنزیم در مایع رویی یا سوپرناتانت فرآورده پلاکتی حین نگهداری شود (۲۲). افزایش سطح LDH در سوپرناتانت ممکن است به دلیل لیز پلاکت‌ها در روزهای آخر نگهداری رخ دهد (۲۳، ۲۲، ۸). مشابه یافته‌های دیگران، نتایج ما نیز حاکی از افزایش سطح LDH خارج سلولی در سوپرناتانت هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده حین نگهداری است. با افزایش زمان نگهداری، سطح LDH در روزهای پنجم و هفتم نگهداری در مقایسه با روز صفر به صورت معنادار افزایش یافته است ($p < 0.05$). ضمن آن که افزایش سطح LDH در روزهای پنجم و هفتم نگهداری در فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با فرآورده پلاکتی اشعه ندیده معنادار بود ($p < 0.05$). ماروکو و همکارانش در مطالعه‌ای با استفاده از آزمایش‌های برپایه پروتئومیک مانند Mass اسپکترومتری کاهش نسبی سطح LDH داخل سلولی (لکه شماره ۴۷۷) را در فرآورده‌های پلاکتی اشعه دیده با اشعه گاما نشان دادند. هم‌چنین، آن‌ها گزارش کرده‌اند که تیمار فرآورده‌های پلاکتی با میراسول موجب کاهش سطح LDH داخل سلولی (لکه‌های شماره ۴۷۷، ۴۵۳ و ۱۱۷۹) حین نگهداری می‌شود. یافته‌های آن‌ها همراه با افزایش مصرف گلوکز و تجمع اسید لاکتیک به عنوان نشانه‌های استرس متابولیک ناشی از نگهداری بود (۲۲). علاوه بر ماروکو، تگوس و همکارانش نیز در مطالعه‌ای کاهش معنادار فعالیت LDH داخل سلولی را نشان داده‌اند (۲۴). افزایش سطح LDH خارج سلولی در روز پنجم و هفتم نگهداری در مطالعه ما و سایر مطالعه‌های مشابه ممکن است علاوه بر فعالیت متابولیک پیوسته به دلیل آسیب غشای سلولی در اثر افزایش مقادیر ترکیبات ROS و PSL القایی ناشی از آن، آپوپتوز، نکروز و یا هر نوع آسیب سلولی دیگر باشد که

منجر به از دست رفتن پایداری غشا می‌شود (۲۵). اشعه گاما باعث آسیب بیشتر سلولی و در نتیجه آزادسازی بیشتر LDH خارج سلولی شده است. شواهد موجود در این مطالعه هم‌چنین حاکی از یک ارتباط معکوس بین سطح گلوکز و فعالیت LDH است؛ به این ترتیب که افزایش سطح فعالیت LDH خارج سلولی می‌تواند مقادیر سطح گلوکز را کاهش دهد.

مطالعه‌های متعددی حاکی از آن است که نگهداری طولانی مدت فرآورده‌های پلاکتی در آزمایشگاه با کاهش شمارش پلاکت‌ها همراه است که می‌تواند به دلیل آسیب پلاکت‌ها رخ دهد (۲۶). هر گونه آسیب پلاکتی اعم از متابولیک و اکسیدان که بتواند باعث القای آپوپتوز و یا افزایش ماکروویکولاسیون و کاهش اندازه پلاکت‌ها شود، منجر به کاهش شمارش پلاکت طی نگهداری خواهد شد (۱۱). در مطالعه ما نیز نگهداری پلاکت‌ها همراه با کاهش چشمگیر و معنادار شمارش پلاکت‌ها از روز پنجم نگهداری در هر دو فرآورده پلاکتی اشعه دیده و اشعه ندیده است اما کماکان در محدوده قابل قبول الزامات کنترل کیفی قرار دارند. در این راستا نشان دادیم که تابش اشعه گاما موجب کاهش بیشتر شمارش پلاکت‌ها می‌شود اما مشابه سایر مطالعه‌ها، کاهش شمارش پلاکت بین دو گروه از نظر آماری معنادار نبود (۲۱، ۱۹، ۱۰-۸). این یافته عکس مطالعه مالهی و همکارانش است که به کاهش معنادار شمارش پلاکت در روز پنجم نگهداری در فرآورده‌های اشعه دیده در مقایسه با فرآورده‌های اشعه ندیده اشاره کرده‌اند. این امر ممکن است به دلیل تعداد فرآورده‌های پلاکتی بیشتر مورد مطالعه مالهی نسبت به مطالعه ما باشد (۱۱).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، کیفیت فرآورده‌های پلاکتی اشعه دیده در مقایسه با فرآورده‌های اشعه ندیده با کمترین تفاوت به خوبی حین نگهداری حفظ می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای رضا رنجبر از پایگاه انتقال خون

پایگاه تشکر می‌نماید.

استان تهران و هم چنین از بخش تابش اشعه گاما این

References:

- 1- Schubert P, Devine DV. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfusion* 2010; 8(Suppl 3): s69.
- 2- Ohito H, Nolle KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011; 44(3): 321-5.
- 3- Seghatchian J, Krailadsiri P. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? *Transfus Apher Sci* 2001; 24(1): 103-5.
- 4- Garraud O, Cognasse F, Tissot JD, Chavarin P, Laperche S, Morel P, *et al.* Improving platelet transfusion safety: biomedical and technical considerations. *Blood Transfus* 2016; 14(2): 109.
- 5- Hosseini E, Ghasemzadeh M, Nassaji F, Jamaat ZP. GPVI modulation during platelet activation and storage: its expression levels and ectodomain shedding compared to markers of platelet storage lesion. *Platelets* 2017; 28(5): 498-508.
- 6- Agarwal P, Ray V, Choudhury N, Chaudhary R. Effect of pre-storage gamma irradiation on red blood cells. *Indian J Med Res* 2005; 122(5): 385-7.
- 7- Anderson KC, Goodnough LT, Sayers M, Pisciotto PT, Kurtz SR, Lane TA, *et al.* Variation in blood component irradiation practice: implications for prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* 1991; 77(10): 2096-102.
- 8- Tynngård N, Studer M, Lindahl TL, Trink M, Berlin G. The effect of gamma irradiation on the quality of apheresis platelets during storage for 7 days. *Transfusion* 2008; 48(8): 1669-75.
- 9- Zimmermann R, Schmidt S, Zingsem J, Glaser A, Weisbach V, Ruf A, *et al.* Effect of gamma radiation on the *in vitro* aggregability of WBC-reduced apheresis platelets. *Transfusion* 2001; 41(2): 236-42.
- 10- Lin J, Tzeng C, Hao T, Hu H, Tsai Y, Lin C, *et al.* Influence of gamma irradiation and storage on apheresis platelets. *J Formos Med Assoc* 2001; 100(2): 101-5.
- 11- Mallhi R, Biswas A, Philip J, Chatterjee T. To study the effects of gamma irradiation on single donor apheresis platelet units by measurement of cellular counts, functional indicators and a panel of biochemical parameters, in order to assess pre-transfusion platelet quantity and quality during the shelf life of the product. *Med J Armed Forces India* 2016; 72(1): 19-26.
- 12- Sweeney J, Holme S, Moroff G. Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion* 1994; 34(9): 779-83.
- 13- Singh RP, Marwaha N, Malhotra P, Dash S. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *Asian J Transfus Sci* 2009; 3(2): 86-94.
- 14- Harmening DM. *Modern blood banking & transfusion practices*. 7th ed. Philadelphia: FA Davis; 2018. p.346.
- 15- Kakaiya R, Aronson CA, Julleis J. Whole Blood Collection and Component Processing at Blood Collection Centers. In: Roback JD. *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2011. p. 187-226.
- 16- Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VMJRb. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol* 2014; 2: 206-10.
- 17- Van Der Meer P, Pietersz R. Gamma irradiation does not affect 7-day storage of platelet concentrates. *Vox Sang* 2005; 89(2): 97-9.
- 18- Nodeh FK, Hosseini E, Ghasemzadeh M. The effect of gamma irradiation on platelet redox state during storage. *Transfusion* 2021; 61(2): 579-93.
- 19- Rock G, Adams G, Labow R. The effects of irradiation on platelet function. *Transfusion* 1988; 28(5): 451-5.
- 20- Moroff G, George V, Siegl A, Luban N. The influence of irradiation on stored platelets. *Transfusion* 1986; 26(5): 453-6.
- 21- Read E, Kodis C, Carter C, Leitman S. Viability of platelets following storage in the irradiated state. A pair-controlled study. *Transfusion* 1988; 28(5): 446-50.
- 22- Marrocco C, D'Alessandro A, Girelli G, Zolla L. Proteomic analysis of platelets treated with gamma irradiation versus a commercial photochemical pathogen reduction technology. *Transfusion* 2013; 53(8): 1808-20.
- 23- Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009; 41(2): 105-13.
- 24- Tegos C, Beutler E. Platelet glycolysis in platelet storage: I. The glycolytic enzymes. *Transfusion* 1979; 19(2): 203-5.
- 25- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018(6).
- 26- Akahat J, Sripa P, Thanukarn T, Jaroonsiramaneekul T, Mongkunkhamchaw N, Punikorn K. Quality of Blood Components for Transfusion in Blood Transfusion Centre, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. *Srinagarind Medical Journal* 2016; 31(5): 118-21.

Original Article

The effect of gamma-irradiation on platelet metabolic state in PRP-platelet concentrates during storage

Kiani Nodeh F.¹, Ghasemzadeh M.¹, Hosseini E.¹

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

Abstract

Background and Objectives

Gamma irradiation (GI) of platelet concentrates (PCs) is done to prevent the risk of Transfusion associated graft versus host disease (TA-GVHD). However, some of studies indicate a lower post-transfusion responses and aggravation of platelet storage lesion (PSL) after GI. In this study, the effect of GI on the platelet metabolic status in stored PRP-PCs was investigated.

Materials and Methods

in our experimental study, 10 PRP-PC were randomly obtained from Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO). Then, two ABO- and D matched PRP-PC units were pooled and split into two bags, one kept as control while other was gamma-irradiated with 30 Gray. Within 7-day storage, glucose concentration and LDH activity were measured by enzymo-colorimetric method. PLT count and pH were measured using a hematology whole blood analyzer and the pH meter, respectively. Swirling was evaluated by visual assessment. Statistical data were analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test and Wilcoxon Mached-Pair test. P values of less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Swirling was maintained in both groups throughout the storage period. Platelet count significantly decreased on Days 5 and 7 of storage but there was no significant difference between irradiated and non-irradiated PCs. Glucose decreased whilst LDH activity increased during storage period. The increments of LDH activities were significant on Days 5 ($P<.05$) and 7 of storage ($P<.01$) in non-irradiated groups.

Conclusions

The quality of irradiated PCs is well maintained throughout the storage period, with minimal difference in metabolic parameters compared to non-irradiated PLTs.

Key words: Gamma Rays, Platelet-Rich Plasma, Graft vs Host Disease

Received: 8 Feb 2023

Accepted: 1 Mar 2023

Correspondence: Hosseini E., PhD in Hematology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88699531; Fax: (+9821) 88699531
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au