

فعال شدن پلاکتی و تولید اینترلوکین - ۸ در فرآورده‌های متراکم پلاکتی تهیه شده

به روش پلاسمای غنی از پلاکت و بافی کوت

پژمان بشکار^۱، دکتر علی اکبر پورفتح اله^۲، دکتر مژگان شایگان^۳، محمدرضا آخوند^۴

چکیده

سابقه و هدف

تهیه فرآورده‌های پلاکتی به روش پلاسمای غنی از پلاکت ممکن است باعث فعال شدن پلاکت‌ها و ترشح مواد موجود در گرانول‌های آن‌ها مثل ترومبوگلوبولین بتا، LDH و بیان CD62P شود. پلاکت‌هایی که طی روند تهیه فعال شوند، وقتی وارد محیط *in vivo* گردند دیگر کارایی لازم را جهت عملکرد انعقادی خود ندارند. لذا اندازه‌گیری شاخص‌های فعال شدن پلاکتی مثل CD62P سطح پلاکت‌ها، ترومبوگلوبولین بتا و غیره جهت اندازه‌گیری درصد پلاکت‌های فعال شده در فرآورده‌های پلاکتی طی روند تهیه، و مقایسه این دو روش تهیه یعنی پلاسمای غنی از پلاکت و بافی کوت مفید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه تعداد ۱۵ فرآورده به روش PRP، ۱۵ فرآورده به روش BC و ۱۵ واحد خون کامل که مورد هیچ گونه دستکاری قرار نگرفته بودند به عنوان گروه کنترل انتخاب و تا سه روز نگهداری شده و از نظر درصد بیان CD62P در سطح پلاکت‌ها و نیز غلظت فرم محلول آن، درصد سلول‌های CD14 مثبت و سطح اینترلوکین - ۸ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری CD62P سطحی و CD14 از آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی و کتزوگه شده با مواد فلورسانس و به روش فلوسیتومتری و برای اندازه‌گیری غلظت CD62P محلول و اینترلوکین - ۸ از روش الیزا استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین شمارش پلاکتی در هر دو روش تفاوت چندانی نداشت، اما آلودگی گلبول‌های سفید در واحدهای تهیه شده به روش PRP بسیار بیشتر از واحدهای تهیه شده به روش BC بود. در روش PRP در مدت نگهداری ۳ روزه، کاهش اندک CD62P سطحی، افزایش شکل محلول آن و IL-8 مشاهده گردید و درصد ظهور CD14 در این فرآورده تغییر محسوسی نشان نداد. در روش BC طی نگهداری سه روزه، CD62P سطحی و محلول و غلظت IL-8 افزایش و نیز درصد ظهور CD14 سطح منوسیت‌ها از ۰/۴ تا ۰/۱ کاهش نامحسوسی نشان دادند.

نتیجه‌گیری

ارتباط نزدیکی بین سطح اینترلوکین - ۸ و شمارش گلبول‌های سفید در فرآورده‌ها وجود دارد. در روش PRP ساتریفوژ با دور سنگین باعث تجمع و چسبندگی و لذا فعال شدن پلاکتی می‌شود. اما در روش BC چون هیچ گونه چسبندگی پلاکتی به وجود نمی‌آید، فعال شدن پلاکتی کمتر صورت می‌گیرد.

کلمات کلیدی: پلاکت، پلاسمای غنی از پلاکت، CD14، CD62P، IL-8

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۸

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

۳- PhD ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- کارشناسی ارشد آمار حیاتی - دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

امروزه فرآورده‌های متراکم پلاکتی (PCs = Platelet Concentrates) به دو روش پلاسمای غنی از پلاکت (PRP= Platelet Rich Plasma) و بافی‌کوت (BC= Buffy Coat) تهیه می‌شوند. در روش PRP، از خون کامل طی یک مرحله سانتریفوژ با دور سبک، PRP تهیه کرده و سپس در مرحله دوم، سانتریفوژ با دور سنگین منجر به ایجاد تکه پلاکتی در ته کیسه می‌شود که پس از گذشت یک ساعت در دمای اتاق، تکه پلاکتی از هم جدا شده و به عنوان فرآورده متراکم پلاکتی تا سه روز نگهداری می‌شود (۵-۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در طی این روش میزان بالایی از لاکتات دهیدروژناز (LDH)، ترومبوگلوبولین بتا (β -TG) و CD62P از پلاکت‌ها ترشح می‌شود که نشان دهنده فعال شدن پلاکت‌ها می‌باشند (۳-۱). اما در روش بافی‌کوت، لایه بافی‌کوت طی یک مرحله سانتریفوژ با دور سنگین از گلبول‌های قرمز و پلاسمای بدون پلاکت (Poor Platelet PPP= Plasma) جدا شده و پس از سوسپانسیون مجدد، با دور سبک سانتریفوژ می‌شود که گلبول‌های سفید و قرمز باقی‌مانده، در ته کیسه ته‌نشین شده و مایع فوقانی آن به عنوان فرآورده متراکم پلاکتی به کیسه دیگر منتقل می‌شود. در این روش تکه پلاکتی تهیه نمی‌شود و لذا فعال شدن پلاکت‌ها طی تهیه‌سازی کمتر صورت می‌گیرد (۱۲-۱).

گزارش‌های متعددی پیرامون افزایش غلظت سایتوکین‌ها، به ویژه، IL-8، IL-6، IL-1 و $TNF\alpha$ در طی نگهداری فرآورده‌های پلاکتی وجود دارد. منبع عمده سایتوکین‌ها در فرآورده‌های متراکم پلاکتی، گلبول‌های سفید و به ویژه منوسیت‌ها محسوب می‌شوند، تعداد بیش از ۳۰۰۰ گلبول سفید در میکرولیتر برای افزایش سایتوکین‌ها در فرآورده‌های پلاکتی نیاز است. لذا کاهش گلبول‌های سفید در این فرآورده‌ها باعث کاهش تولید سایتوکین‌ها می‌شود. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که میزان آلودگی گلبول‌های سفید در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش بافی‌کوت بسیار کمتر از مقدار آن در فرآورده‌های تهیه شده به روش PRP می‌باشد، لذا سایتوکین‌های التهابی نیز در این فرآورده‌ها کمتر تجمع

می‌یابند (۱۷-۱۳، ۵، ۳، ۱).

در این مطالعه CD62P سطحی و محلول در پلاکت‌های تهیه شده به دو روش مذکور مقایسه شدند و با اندازه‌گیری ایترلوکین - ۸ رابطه بین گلبول‌های سفید و فعال شدن پلاکت‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تعداد ۴۵ واحد خون کامل از اهداکنندگانی که جهت اهدای خون در پایگاه آموزشی، منطقه‌ای انتقال خون تهران پذیرش شدند، جمع‌آوری گردید. هر واحد به میزان نهایی 45 ± 450 میلی‌لیتر خون به همراه ضد انعقاد CPDA-1 و در مدت ۷ تا ۹ دقیقه جمع‌آوری شد. ضمناً یک لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جهت انجام CBC تهیه شد. ۴۵ واحد خون به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند. تعداد ۱۵ فرآورده به روش BC، ۱۵ فرآورده به روش PRP و تعداد ۱۵ واحد خون کامل به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند.

تهیه فرآورده‌های پلاکتی به روش PRP:

واحدهای خون کامل جهت تهیه PRP-PC به روش معمول در پایگاه انتقال خون تهران، ابتدا با دور سبک ($g \times 2100$) و به مدت ۴ دقیقه در دمای تنظیم شده $22^\circ C$ سانتریفوژ شدند که حاصل آن گلبول‌های قرمز فشرده و پلاسمای غنی از پلاکت بود. پس از انتقال پلاسمای غنی از پلاکت به یکی از کیسه‌های اقماری و باقی ماندن گلبول‌های قرمز در کیسه اولیه، کیسه حاوی گلبول قرمز جدا گردید و سپس در مرحله دوم پلاسمای غنی از پلاکت با دور بالا ($g \times 4000$) و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شد. حاصل این مرحله یک تکه پلاکتی در ته کیسه و پلاسمای فاقد پلاکت یا دارای مقدار کمی پلاکت در قسمت بالای کیسه می‌باشد که پلاسمای فاقد پلاکت به کیسه دیگری انتقال داده می‌شود و تکه پلاکتی به همراه ۵۰ تا ۷۰ میلی‌لیتر پلاسمای باقی‌مانده در کیسه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و در محلی ساکن قرار داده شد تا تکه پلاکتی به آرامی از هم جدا شود و پلاکت‌ها به صورت سوسپانسیون تک سلولی درآیند. سپس فرآورده

پلاکتی در آزیاتور در دمای 22°C به مدت ۳ روز نگهداری می‌شود (۱۴-۱۲، ۳، ۱).

تهیه فرآورده‌های پلاکتی به روش BC:

خون کامل درون کیسه‌های چهارتایی جمع‌آوری شده، سپس با دور سنگین ($4000 \times g$) به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله سه لایه درون کیسه تشکیل شد. سطحی‌ترین لایه پلاسمای فاقد پلاکت یا دارای پلاکت اندک بود که این لایه به یکی از کیسه‌های اقماری انتقال داده شد. لایه میانی که لایه بافی کوت می‌باشد، حاوی پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید بوده و این لایه نیز توسط دستگاه جداکننده به کیسه دیگر منتقل گردید. البته مقداری از گلبول‌های قرمز هم به همراه این لایه انتقال داده شد. سپس مقداری ($70\text{cc} - 50\text{cc}$) پلاسما از کیسه حاوی پلاسمای فاقد پلاکت به کیسه حاوی لایه بافی کوت برگردانده شد. نهایتاً کیسه‌های گلبول‌های قرمز فشرده و پلاسمای فاقد پلاکت (PPP) جدا شده، بافی کوت درون پلاسما به حالت سوسپانسیون در آمده و سپس مرحله دوم سانتریفوژ با دور پایین ($360 \times g$) به مدت ۴ دقیقه انجام شد. در پایان مایع فوقانی آن که پلاسمای غنی از پلاکت می‌باشد به کیسه چهارم منتقل و باقی مانده آن که گلبول‌های سفید به همراه مقداری RBC می‌باشد جدا گردیده و دور ریخته شد (۱۶-۱۰، ۵، ۲). در این روش تکه پلاکتی ایجاد نمی‌گردد و لذا پس از تهیه می‌توان آن را درون آزیاتور ۲۲ درجه به مدت ۳ روز نگهداری نمود. یکی از اهداف این تحقیق بررسی اثر مراحل تهیه فرآورده پلاکتی بر روی فعال شدن پلاکتی بوده است، لذا تعداد ۱۵ واحد خون کامل به عنوان فرآورده‌ای که هیچ گونه تغییری در پلاکت‌های آن اعمال نمی‌شود، جمع‌آوری گردیده و به مدت ۳ روز نگهداری شد.

نمونه‌گیری از کورد:

هنگام جداسازی کیسه‌ها، کیسه حاوی فرآورده پلاکتی را به همراه ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر کورد (Cord) جدا نموده، سپس جهت نمونه‌گیری از کیسه‌ها، در شرایط استریل و در کنار شعله پس از برگرداندن محتوای درون کورد توسط

Ruller به داخل کیسه حاوی فرآورده پلاکتی و مخلوط کردن آن، انتهای کورد را در کنار شعله توسط قیچی و پنس باز نموده و مقدار ۲-۱ سی‌سی فرآورده را دور ریخته تا pH مسیر درون کورد با pH فرآورده پلاکتی یکسان شود. سپس مقدار ۵ تا ۷ سی‌سی فرآورده را درون لوله آزمایش ریخته و پس از آن کورد را از ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر مانده به انتهای آن ابتدا با بست آلومینیوم مسدود نموده و سپس در همین شرایط کورد را توسط سیلر مسدود می‌کنیم. در این روش هیچ گونه آلودگی و یا اکسیژن به داخل کیسه وارد نخواهد شد و لذا محیط کیسه هم چنان بسته خواهد ماند.

نمونه‌گیری از فرآورده‌های پلاکتی در روزهای صفر (روز تهیه فرآورده)، روز یک (یک روز پس از تهیه فرآورده) و روز ۳ که سه روز پس از تهیه فرآورده پلاکتی می‌باشد انجام شد. از نمونه‌های کنترل فقط در روزهای صفر و ۳ نمونه‌گیری شد.

کنترل کیفی واحدهای PC

با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm)، pH تمام نمونه‌ها در روزهای صفر، یک و سه اندازه‌گیری شد. شمارش پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید و قرمز به روش دستی و توسط لام نئوبار انجام گرفت.

لوله‌های حاوی خون EDTA دار جهت شمارش کامل سلول‌های خونی توسط دستگاه سیس‌مکس و مقایسه تعداد پلاکت‌ها و تخمین میزان پلاکت‌های درون فرآورده متراکم پلاکتی مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور بررسی آلودگی باکتریایی فرآورده‌های متراکم پلاکتی، از تعدادی از واحدها به صورت راندوم در روز ۳ در شرایط استریل، کنار شعله کشت گرفته شد. جهت کشت از محیط‌های بلادآگار و ائوزین متیلن بلو استفاده و تا سه روز در دمای 37°C قرار داده شد. تمامی واحدهای بررسی شده از نظر آلودگی باکتریایی منفی بودند.

بررسی CD62P به روش فلوسایتومتری:

ابتدا تمام مواد و کیت‌ها به دمای اتاق رسانده شد. روش آزمایش طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (داکو)

انجام گرفت، ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۹۹۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط کرده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه حاصل را درون لوله های پلاستیکی ریخته و ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی کنژوگه با PE (فایکوارترین)، به آن افزوده شد. سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۴°C و تاریکی قرار داده شد. در پایان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر پارافرمالددید جهت فیکس کردن سلول ها به آن افزوده و توسط دستگاه (پارتک، PAS3) شمارش گردید (۲۰-۱۸، ۱۶، ۱۲).

بررسی فلوسایتومتری CD14 در سطح سلول های موجود در فرآورده های پلاکتی:

برای اندازه گیری CD14 طبق بروشور کیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را درون لوله های مربوطه ریخته و یک لوله هم جهت کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی CD14 کنژوگه شده با FITC (فلوئوروایزو تیوسیانید) به آن افزوده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر پارافرمالددید به آن افزوده و توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شد. CD14 آنتی ژن سطح منوسیت ها می باشد و منوسیت ها به عنوان منبع تولید کننده IL-8 مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفتند. جهت مشخص کردن قطعی جمعیت پلاکتی در جریان به کار رفته برای CD62P، از آنتی بادی منوکلونال CD61 استفاده شد، که ۹۹ درصد جمعیت سلولی از نظر CD61 نیز مثبت بودند.

اندازه گیری IL-8 محلول در پلاسما:

برای سنجش کمی IL-8 از کیت ایترلوکین ۸ انسانی (روش) و روش الیزا استفاده شد که کمترین مقدار قابل ردیابی آن ۶/۲ pg/ml بود. ایترلوکین ۸ انسانی یک روش Enzyme - Linked Immunosorbant است که برای ارزیابی کمی IL-8 انسانی در شرایط *in vitro* در سرم، مایع مغزی نخاعی و کشت سلول استفاده می شود.

اندازه گیری CD62P محلول به روش الیزا:

جهت اندازه گیری مقدار CD62P محلول انسانی در

نمونه های گرفته شده از فرآورده ها، از کیت الیزا (آمریکا - P-selectin) استفاده شد. اندازه گیری CD62P به روش ایمونواسی، یک الیزای فاز جامد با مدت زمان ۱:۲۵ ساعت می باشد. اساس این آزمایش، روش ایمونواسی ساندویچی است که یک آنتی بادی منوکلونال اختصاصی جهت CD62P در ته میکروپلیت پوشانده شده و نمونه ها به همراه یک آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی دیگر علیه CD62P کنژوگه با پراکسیداز به میکروپلیت اضافه می شود. پس از برداشتن آنتی بادی های کنژوگه باند نشده طی سه مرحله شستشو، سوبسترای مناسب اضافه شده که رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت CD62P در نمونه می باشد (۲۰-۱۸، ۱۶، ۱۲).

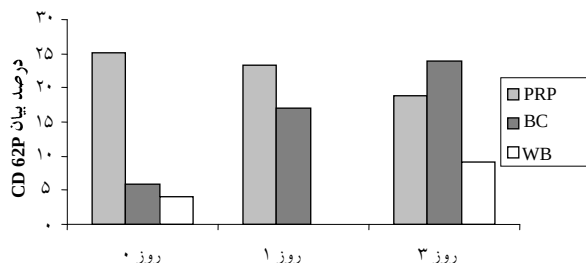
جهت تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون های زیر استفاده شد:

- آزمون فریدمن جهت مقایسه و وجود تفاوت معنی دار بین روزها (به دلیل همبستگی بین مشاهدات)
- آزمون کروسکال والیس جهت مقایسه گروه ها در هر روز
- آزمون من ویتنی جهت مقایسه دو گروه در هر روز (مقایسه PRP و BC)
- آزمون ویلکاکسون رتبه علامت دار جهت مقایسه دو روز برای هر گروه (مثلاً PRP در روز یک و سه)
- ضریب همبستگی اسپیرمن جهت بررسی ارتباط بین دو متغیر (ارتباط بین IL-8 و شمارش گلبول های سفید در PRP)

یافته ها

در نتایج به دست آمده از مراحل کنترل کیفی واحدهای پلاکتی مشخص گردید که شمارش پلاکتی واحدها، تفاوت قابل ملاحظه ای ندارند و تنها در PRP-PC کمی بیشتر از BC-PC است. استاندارد شمارش پلاکتی در یک واحد، $10^{11} \times 18-4$ می باشد. نتایج شمارش پلاکت و گلبول های سفید و میزان pH در جدول شماره ۱ ذکر شده است. مقایسه میان شمارش پلاکتی واحدهای پلاکتی با میزان پلاکت های موجود در یک واحد خون کنترل در روز صفر و نیز نمونه های CBC هر واحد مشخص می کند که تقریباً ۸۵ تا ۹۰ درصد پلاکت های موجود در یک واحد

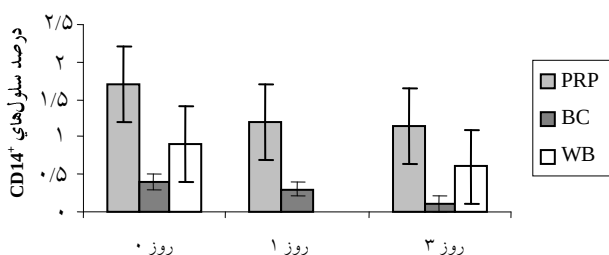
گروه کنترل مشهود است ($p=0/001$). در شکل شماره ۱ CD62P سطح پلاکت‌ها در هر سه گروه مقایسه شده‌اند.



شکل ۱: مقایسه بیان CD62P در سطح پلاکت‌ها در سه گروه (واحد = درصد)

در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP در روز صفر، ۱/۷ درصد سلول‌های شمارش شده توسط دستگاه فلوسایتومتری از نظر CD14 مثبت بودند که احتمالاً منوسیت می‌باشند. این میزان در روز سه به ۱/۲ درصد رسیده است و این اختلاف با $p=0/06$ معنی‌دار می‌باشد. در BC-PC، میزان این سلول‌ها در روز صفر ۰/۴ درصد و در روز سه ۰/۱۱ درصد بودند ($p=0/001$). این میزان در خون کامل در روز صفر ۰/۹ درصد و در روز سه، ۰/۶ درصد بود. ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین نتایج حاصل از فلوسایتومتری با نتایج حاصل از شمارش افتراقی در تعداد منوسیت‌ها وجود دارد و می‌توان نتیجه گرفت که میزان منوسیت‌ها در BC-PC بسیار کمتر از مقدار آن در PRP-PC است، هم چنین در روز صفر، اختلاف آماری بین دو گروه PRP-PC و BC-PC وجود دارد ($p=0/001$). در شکل شماره ۲ سلول‌های CD14 مثبت در سطح پلاکت‌ها در هر سه گروه نشان داده شده‌اند.

غلظت CD62P محلول در روز صفر در هر سه گروه تفاوت معنی‌داری ندارد. نتایج مربوط به مقدار CD62P



شکل ۲: مقایسه سلول‌های CD14 مثبت در سه گروه (واحد = درصد)

جدول شماره ۱: میانگین ($\pm$ SD) شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید و میزان pH در فرآورده‌های پلاکتی

	PRP	BC	WB
PLT $\times 10^9/\text{Unit}$	$7/2 \pm 2/1$	$6/5 \pm 1/8$	$7/29 \pm 1/7$
WBC $\times 10^9/\text{Unit}$	$0/52 \pm 0/33$	$0/11 \pm 0/23$	$2/6 \pm 0/58$
pH روز سه	$7/13 \pm 0/13$	$7/06 \pm 0/19$	$7/17 \pm 0/14$

خون کامل، در یک واحد پلاکتی جمع‌آوری شده‌اند. طبق استانداردهای اروپایی شمارش قابل قبول گلبول‌های سفید در واحدهای پلاکتی باید در محدوده $1 \times 10^9 - 4 \times 10^9$ و میزان pH بین ۶/۴ تا ۷/۴ باشد (۱-۳).

جهت شمارش افتراقی از رسوب فرآورده‌ها گسترش تهیه شد و پس از فیکس شدن، توسط گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان دادند که ۸۰ درصد گلبول‌های سفید را لنفوسیت و مابقی را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند. درصد بسیار کمی نیز منوسیت‌ها می‌باشند. این یافته نیز با میزان سلول‌های CD14 مثبت که توسط فلوسیتومتری ارزیابی شد، تطابق داشت.

pH تمامی واحدهای پلاکتی مورد مطالعه و نمونه‌های کنترل از نظر کیفیت پلاکت تولید شده وضعیت مطلوبی داشتند و pH آن‌ها در محدوده $7/2 \pm 0/3$ بود.

بیان سطحی CD62P در پلاکت‌های حاصل از روش PRP در روزهای صفر، یک و سه به ترتیب ۲۵/۲، ۲۳/۴ و ۱۸/۸ درصد می‌باشد که این اختلاف معنی‌دار است ($p=0/04$). اما این مقدار در پلاکت‌های تهیه شده به روش BC در روز صفر ۵/۸ درصد و در روز یک ۱۷/۱ و در روز سه، ۲۳/۳ درصد می‌باشد که این اختلاف با $p=0/001$ معنی‌دار می‌باشد. میزان پلاکت‌های فعال شده در نمونه‌های کنترل در روز صفر ۴/۱ درصد و در روز سه ۹/۲ درصد است. هم چنین بین دو گروه PRP-PC و BC-PC (PC) در روز صفر اختلاف وجود دارد ($p=0/001$). اما در روز سه ذخیره سازی، تفاوتی در میزان پلاکت‌های فعال شده در دو گروه وجود ندارد. در مقایسه گروه BC-PC با گروه کنترل در روز صفر، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، در صورتی که این اختلاف در مقایسه گروه PRP-PC با

جدول شماره ۲: مقدار CD62P محلول (بر حسب نانوگرم در میلی لیتر) در سه گروه در روزهای صفر، یک و سه

گروه	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
sCD62P						
روز صفر (mean $\pm$ SD)	۸۶/۸ $\pm$ ۲۱/۵	۸۸/۳ $\pm$ ۴۴/۲	۶۴/۷ $\pm$ ۲۵	۰/۷	۰/۰۶	۰/۱
روز یک (mean $\pm$ SD)	۹۹/۵ $\pm$ ۳۵/۵	۲۲۶/۸ $\pm$ ۱۱۶/۱	*	۰/۰۰۱	*	*
روز سه (mean $\pm$ SD)	۱۱۱/۴ $\pm$ ۴۲/۶	۳۰۱/۳ $\pm$ ۱۰۰/۹	۹۲/۱ $\pm$ ۲۸/۹	۰/۰۰۰۱	۰/۲	۰/۰۰۰۱
P value مقایسه روز صفر و سه	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	*	*	*
P value مقایسه روز یک و سه	۰/۰۹	۰/۰۴	*	*	*	*

جدول شماره ۳: مقدار IL-8 (بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر) در سه گروه در روزهای صفر، یک و سه

گروه	PRP	BC	WB	P value BC , PRP	P value WB, PRP	P value WB , BC
IL-8						
روز صفر (mean $\pm$ SD)	۲۳/۴ $\pm$ ۸/۷	۱۳/۸ $\pm$ ۶/۱	۸/۵ $\pm$ ۷/۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱
روز یک (mean $\pm$ SD)	۴۷/۱ $\pm$ ۴۱/۷	۲۴/۳ $\pm$ ۱۰/۹	*	۰/۰۶	*	*
روز سه (mean $\pm$ SD)	۱۲۶/۶ $\pm$ ۲۳۷/۶	۳۸/۸ $\pm$ ۱۹/۶	۱۴/۲ $\pm$ ۵/۵	۰/۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
P value مقایسه روز صفر و سه	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲	*	*	*
P value مقایسه روز یک و سه	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	*	*	*	*

محلول در هر سه گروه در روزهای صفر، یک و سه در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که غلظت CD62P محلول در هر سه گروه طی نگهداری افزایش نشان داده‌اند و بیشترین میزان افزایش در گروه BC مشاهده شده است. تفاوتی بین PRP-PC و گروه کنترل وجود ندارد ($p=0/2$)، اما تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه BC-PC و گروه کنترل وجود دارد ($p=0/0001$).

غلظت IL-8 در روز صفر در PRP-PCs در مقایسه با روش BC به صورت معنی‌داری کمتر می‌باشد ($p=0/003$). غلظت IL-8 در هر سه گروه در روزهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج نشان دادند که غلظت IL-8 در هر سه گروه افزایش معنی‌داری داشته است و بیشترین میزان افزایش مربوط به گروه PRP بوده است.

بحث

این مطالعه نشان می‌دهد که پس از روند تهیه، پلاکت‌های به دست آمده از روش PRP نسبت به پلاکت‌های تهیه شده به روش BC در وضعیت فعال شده بیشتری قرار دارند و به نظر می‌رسد حدود یک چهارم پلاکت‌های موجود در PRP-PCs در روز صفر فعال شده و

احتمالاً در عمل در بدن فاقد کارایی لازم می‌باشد ($p<0/05$). هم چنین در فرآورده‌های پلاکتی تهیه شده به روش PRP تعداد گلبول‌های سفید بسیار بیشتر بودند، لذا ایترلوکین - ۸ که منبع عمده ترشح آن گلبول‌های سفید و به خصوص منوسیت‌ها می‌باشند، در این فرآورده‌ها در سطح بالاتری قرار داشت ($p<0/05$). پس از تهیه فرآورده‌ها از روز یک به بعد درصد پلاکت‌های فعال در PRP-PCs کمتر شده است، در صورتی که درصد پلاکت‌های فعال در پلاکت‌های تهیه شده به روش بافی کوت از روز صفر به بعد رو به افزایش بوده است.

بسیاری از محققین روش‌های تهیه پلاکتی BC و PRP را از نظر کیفیت پلاکت‌ها مورد مقایسه قرار دادند و جهت هر کدام معایب و مزایایی ذکر نمودند. لذا در کشورهای اروپایی روش تهیه پلاکت از BC، جایگزین روش PRP گردیده است، در صورتی که در کشورهای آمریکایی هنوز از PRP جهت تهیه PCs استفاده می‌کنند.

پیترز و همکاران در سال ۱۹۹۰ دو روش PRP را مقایسه نموده و گزارش کردند که میانگین شمارش پلاکتی در PCs تهیه شده به روش PRP مقداری بیشتر از شمارش پلاکتی در BC-PCs می‌باشد (۱۸).

چنین غلظت CD62P محلول در فرآورده‌های تهیه شده به روش بافی کوت در روزهای صفر، یک و سه به ترتیب $14/7 \pm 4/1$ و $22/9 \pm 64/2$ و $41/8 \pm 111$ بود (۲۵).

دایورز و همکاران در سال ۱۹۹۴ میزان CD62P محلول در مایع رویی نمونه‌های تهیه شده از کنسانتره‌های پلاکتی را اندازه‌گیری و گزارش نمودند که در هر دو روش یکسان بوده، ولی افزایش آن در BC-PCs کمتر از روش PRP-PCs می‌باشد (۲۶).

ریندرو و همکاران گزارش نمودند که افزایش IL-8 باعث فعال شدن پلاکت‌ها نیز می‌گردد. هر چه تعداد لکوسیت‌ها در فرآورده‌ها کمتر باشد میزان تجمع سیتوکین‌ها نیز کمتر خواهد بود (۲۷).

ارتباط بین شمارش بالای گلبول‌های سفید و تجمع سیتوکین‌ها، در سال ۱۹۹۵ توسط فلزل در آلمان مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده نمود که شمارش گلبول‌های سفید در BC-PCs کمتر از 3×10^9 و تجمع IL-8 بسیار اندک می‌باشد (۲۸، ۲۹).

استاک و همکارانش در سال ۱۹۹۳ طی یک تحقیق، غلظت سیتوکین‌ها را مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند که در PRP-PC غلظت اینترلوکین - ۸ در روز دوم نگهداری ۱۱۶ و در روز سه ۱۲۹۰ می‌باشد. ایشان ذکر کردند که ارتباط مستقیمی بین شمارش گلبول‌های سفید و تجمع سیتوکین‌ها مثل اینترلوکین - ۸ در فرآورده‌های پلاکتی وجود دارد که این یافته‌ها با یافته‌های ما نیز تطابق دارد ($r=0/2$ ، $p<0/05$) (۳۰).

نتیجه‌گیری

در پایان این تحقیق نشان می‌دهد که روند فعال شدن پلاکت در فرآورده‌های تهیه شده به روش پلاسما غنی از پلاکت بیشتر از فرآورده‌های تهیه شده به روش بافی کوت صورت می‌گیرد. هم چنین تعداد گلبول‌های سفید موجود در PRP-PC بیشتر از BC-PC بوده و سطح اینترلوکین - ۸ در PRP-PC بسیار بیشتر از BC-PC می‌باشد. لذا نتیجه می‌گیریم که فرآورده‌های تهیه شده به روش بافی کوت از نظر کیفیت و کارایی در سطح مطلوب‌تری قرار دارند و احتمال می‌رود واکنش‌های انتقال خون ناشی از سیتوکین‌ها

لوزانو و همکاران در تحقیقات خود نشان دادند که شمارش گلبول‌های سفید در BC-PCs بسیار کمتر از مقدار آن در PRP-PCs می‌باشد (۲۱).

شاتیل و همکاران در سال ۱۹۸۷ پلاکت‌های فعال و عمل فعال شدن پلاکت‌ها را در خون کامل مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که در خون کاملی که هیچ‌گونه دستکاری روی آن صورت نگرفته باشد، ۴ تا ۶ درصد پلاکت‌ها فعال می‌باشند (۲۰).

مورنی و همکاران اظهار داشتند سانتیفرژ با دور سنگین و چسبیدن پلاکت‌ها در روند تهیه پلاکت به روش PRP، باعث فعال شدن و یا صدمه زدن به پلاکت‌ها و آزاد شدن محتویات گرانولی آن‌ها مثل CD62P و β ترومبوگلوبولین می‌شود (۲۲).

بیگنو و همکاران نیز در سال ۱۹۹۵ افزایش بیان CD62P را در پلاکت‌های تهیه شده به روش PRP نسبت به روش BC گزارش نمودند. آن‌ها در روز صفر مشاهده کردند که میزان افزایش سلول‌های CD62P مثبت در روش PRP نسبت به بافی کوت ۷۵ درصد بوده است. که این مقدار در روز ۳ به ۲۴ درصد رسیده است (۲۳).

لوزانو در سال ۱۹۹۹ دو روش PRP و بافی کوت را مقایسه نموده و گزارش کرد که در روش BC در روز صفر یک دوم پلاکت‌ها، CD62P را در سطح خود بیان می‌نمایند و در روش PRP در روز صفر ۲۴ درصد آن‌ها CD62P را بیان می‌کنند. این مقدار در روز سوم به ۱۲/۹ درصد می‌رسد که این کاهش به دلیل برگشتن پلاکت‌ها به فاز استراحت (ریکاوری) می‌باشد. در صورتی که در روش بافی کوت درصد بیان سطحی CD62P در روز صفر ۲/۱ درصد و در روز یک ۹ درصد می‌باشد، ایشان نیز ذکر نمودند که درصد پلاکت‌های CD62P مثبت در روز سه در هر دو روش یکسان است (۲۱).

فراپتی و همکاران و شاتیل و همکاران نیز افزایش میزان CD62P محلول را در PRP-PCs از روزهای ۲ تا روز ۵ نگهداری گزارش نمودند (۲۴). طی تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ توسط بوک و همکاران صورت گرفت، شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید در BC-PCs، به ترتیب $11 \times 10^9 \pm 0/8$ و $10^9 \times 1/04 \pm 1/1$ گزارش شد. هم

در استفاده این فرآورده کمتر اتفاق خواهد افتاد.

تشکر و قدردانی

این پروژه تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات انتقال خون ایران صورت پذیرفته است، بدین وسیله از مسؤولین مرکز تحقیقات و شورای پژوهشی به خاطر

پشتیبانی و حمایت مالی از اجرای این طرح و همکاران اداره کل منطقه‌ای انتقال خون استان تهران که در تهیه نمونه‌های پلاکتی همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

- 1- Wright JH. The histogenesis of blood platelets. *J Morphol* 1990; 21: 263.
- 2- Fox JE. The Platelet cytoskeleton. *Tromb Haemost* 1993; 70: 884-94.
- 3- Hott JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol* 1985; 22: 151-63.
- 4- Heaton Wal, Rebull P, Pappalettera M. A comparative analysis of different methods for routine blood componet preparation. *Transfusion Med Rev* 1997; 11: 116-29.
- 5- Blumberg N, Hicks GL, Kisher Wh. Association of ABO mismatched platelet transfusions with morbidity and mortality in cardiac surgery. *Transfusion* 2001: 790.
- 6- Anderson KC, Ness PM. Scientific basis of transfusion medicin, implication for clinical practice. Philadelphia: Saunders; 2000.
- 7- Heal JM, Rowe JM, McMican A. The role of ABO mathching in platelet transfusion. *Eur J Haematol* 1993; 50: 110-7.
- 8- Fujihara M, Takahashi TA, Ogiso C, Hosoda M, Ikebuchi K, Sekiquchi S, *et al.* Generation of |IL-8 in stored apheresis platelet concentrates and the preventive effect of prestorage ultraviolet B radiation. *Transfusion* 1997; 37: 468-75.
- 9- Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004; 20; 109(15): 1819-22.
- 10- Steinhardt MM, Kirchner H. Impact of storage at 22C and citrate anticoagulation on the cytokine of mononuclear leukocyte . *Vox Sang* 1998; 75: 12-7.
- 11- Christopher D, Hillger , Lesilie E, Siberstein, Nees PM, Anderson KC. Blood banking and transfusion medicine. 2003: 219.
- 12- Simon TL, Dzik Wh, Snyder EL, Stowell Ch, Strauss RG. Rossi's principles of transfusion medicine. Philadelphia: Lippincott Williams, Wilkins; 2002: 232-47.
- 13- Sweeney JD, Holme S, Moroff G. Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion* 1994; 34: 777-83.
- 14- Voll RE, Herman M, Roth EA. Immunosuppressive effects of apoptotics cells. *Nature* 1997; 390: 350-1.
- 15- James LM, Ferra MD. The febrile platelet transfusion reaction, a cytokine shower. *Transfusion* 1995; 35: 80-90.
- 16- Aye MT, Palmer DS, Chulivi A, Hashemi S. Effect of platelet concentrates on the accummlation of cytokins and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1999: 150-5.
- 17- Wadhava M, Krailadsiri P, Dilyer P, Gaines Das R, Seqhatchion MJ, Thorpe R. Cytokine levels as performance indicator for while blood cell reduction of platelet concentrates. *Vox Sanq* 2002; 83; 125-36.
- 18- Fignheer R, Pieterz RNC, Dekerte D, Gouwerok CWN, Dekker WJA, Roos O, *et al.* Platelet activation during preparation of platelet concentrates. *Transfusion* 1990; 30(7): 634-638.
- 19- Christensen LL, Grunner N, Rudiye N. Comparison of the level of cytokine mRNA in buffy coat-derived platelet concentrates prepared with or without cell reduction. *Transfusion* 1995; 35: 940-60.
- 20- Shattille SJ, Cunningham M, Hoxie A. Detection of activated platelet in whole blood using flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-15
- 21- Lozane M, Estebanell E, Cid J, Diaz M, Mazzara R, Ordines A, *et al.* Platelet concentrates prepard and stored under currently optimal conditions. *Transfusion* 1999; 39: 951-4.
- 22- Murphy S, Heaton WA. Platelet production in the old world. *The New Transfusion* 1996; 36: 751-54.
- 23- Mrowiec ZR, Gelbart T, Oleksowicz L, Dutcher JP, De leon-Fernandez M, Lalezari P, *et al.* A novel technique for preparing improved buffy coat platelet concentrates. *Blood cells, Molecules and Disease* 1995: 21: 25-33.
- 24- Frabetti F, Tazzari PL, Musiani D, Bontadini A, Matteini C, Roseri L, *et al.* White cell apoptosis in platelet concentrates. *Transfusion* 2000; 40: 160-7.
- 25- Kluter H, Schlenke P, Muller - Stienhardt M, Paulsen M, Kirchner H. Impact of buffy-coat storage

- on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 1997; 37: 363-9.
- 26- Divers SG, Kannan K, Stewart RM. Quantitation of CD62P and soluble CD62p for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995; 35: 292-6.
- 27- Henry M, Rinder, Ault KA. Platelet activation and its detection during the preparation of platelet for transfusion. *Transfusion Medicine* 1998; 12 (4): 241.
- 28- Gwozdz A. Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. *Vox Sang* 2004; 87(4): 257-63.
- 29- Flegel WA, Wiesneth M, Stampe D, Koevner. Low cytokine contamination in buffy coat derived platelet concentrates without filtration. *Transfusion* 1995; 35: 917-20.
- 30- Snyder SG. Storage of platelet concentrate. In: Harris JR, editor. *Blood separation and plasma fractionation*. New York: Wiley - Liss; 1990: 100-20.

Platelet activation and IL-8 production in platelet concentrates prepared by buffy coat and PRP method

Beshkar P.¹(MS), Pourfathollah A.A.¹(PhD), Shaiegan M.²(PhD), Akhound M.R.¹(MS)

¹Tarbiat Modarres University

²Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center

Abstract

Background and Objectives

The process of platelet concentrate production by plasma rich (PRP) method could activate the platelet and granules secretion of beta thromboglobulin, LDH and CD62P. Platelets activated during the preparation process do not have sufficient efficiency for hemostasis in vivo. It seems that platelet preparation by buffy coat method has an ability less than PRP to activate the platelet. Measuring platelet activation indices, such as CD62P expression and beta thromboglobulin, is a useful means to evaluate the percentage of activated platelet concentrates and compare the two methods of buffy coat and PRP.

Materials and Methods

In this experimental study, 15 concentrates were prepared via PRP method and 15 via BC method; 15 intact blood units were also considered as control group. The percentages of CD62P expression, soluble CD62P concentrates, IL-8 level, and CD14 positive cells were evaluated. Special monoclonal antibodies that conjugated with fluorescence dye in flow cytometric method were used for CD62P and CD14. ELISA method was used for evaluation of soluble CD62P and IL-8.

Results

The average platelet count in both methods showed no significant difference, but WBC contamination rate in PRP-PCs was more than BC-PCs. In PRP-PCs, we found a little decrease in CD62P expression and increase in soluble form and IL-8 level during reservation time. The level of CD14 showed no significant difference in these components. In BC method during the three day reservation, expression of CD62P, its soluble form, and IL-8 concentrates increased and the level of monocyte surface CD14 showed slight decrease ranging from 0.4 to 0.1.

Conclusions

It is concluded that there is a close relationship between IL-8 and WBC count in platelet concentrates. In PRP method in contrary to BC method, high speed centrifuge causes adhesion, aggregation and platelet activation.

Key words: Platelet, Platelet rich plasma, CD62P, IL-8, CD14.
SJIBTO 2007; 4(1): 41-50

Received: 11 July 2006

Accepted: 17 Feb. 2007

Correspondence: Pourfathollah A.A., PhD of Immunology, Tarbiat Modarres University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030.
E-mail: Pourfa@modares.ac.ir